

T. C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

Dianthus orientalis PANKREAS KANSERİNDEKİ İNVAZYON ve METASTAZ
ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI

DR. BURAK SEVİNÇ

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2024

T. C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

***Dianthus orientalis* PANKREAS KANSERİNDEKİ İNVAZYON VE METASTAZ
ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

DR. BURAK SEVİNÇ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ.DR.MEHMET AYKUT YILDIRIM

KONYA, 2024

TEŞEKKÜR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki asistanlık eğitimim boyunca cerrahi sanatının inceliklerini bize aktaran, her türlü bilgi ve becerilerini bizden esirgemeyen başta tez danışmanım Doç.Dr.Mehmet Aykut YILDIRIM olmak üzere Prof. Dr. Şakir TEKİN, Prof. Dr. Süleyman Şakir TAVLI, Prof. Dr. Mehmet Metin BELVİRANLI, Prof. Dr. Celalettin VATANSEV , Prof. Dr. Faruk AKSOY, Prof. Dr. Ahmet TEKİN, Prof. Dr. Mehmet ERİKOĞLU, Prof. Dr. Tevfik KÜÇÜKKARTALLAR, Prof. Dr. Murat ÇAKIR, Doç. Dr. Mustafa ŞENTÜRK, Doç. Dr. Selman ALKAN, Dr. Öğr. Üy. Alper VARMAN, Dr. Öğr. Üy. Ömer KİŞİ'ye, tezin çeşitli aşamalarında yardımları sonucu büyük mesafe kaydetmemde emeği olan Çocuk İmmünoloji ve Alerji Bilim Dalı öğretim üyesi Öğr. Gör. Dr. Mehmet KARASELEK'e, KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üy. Tuğçe DURAN'a, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üy. Serkan KÜÇÜKTÜRK'e, bitki ekstraktlarının temininde yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Gökhan Zengin'e,

Asistanlık süreci boyunca çalışmaktan büyük keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma, hemşire, personel ve sekreter arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi asistanlık sürecinde de benden hiçbir desteği esirgemeyen, sevgilerini her zaman hissettiren başta anneme, babama ve ablama olmak üzere tüm aile üyelerime,

Fakülte hayatım ve sonrasındaki asistanlık sürecimde her zaman destek olan, iyi günde ve kötü günde, hastalıkta ve sağlıkta hayatı paylaşmaktan mutluluk duyduğum değerli eşime

En kalbi ve samimi duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

***Dianthus orientalis* PANKREAS KANSERİNDEKİ İNVAZYON VE METASTAZ ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

DR. BURAK SEVİNÇ

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2024

Amaç: Pankreas kanseri ileri derece ölümcül bir malign hastalıktır. Pankreas kanseri tedavisinin hastalık evresine bağlı olarak cerrahi teknikler mevcut olup beraberinde birden fazla sistemik tedavi seçenekleri mevcuttur (Mizrahi ve ark. 2020). Hastaların tedavisinde kullanılan sistemik kemoterapötikler kanser hücrelerinin apoptozunu sağlayabilir, proliferasyonunu engelleyebilir, metastatik özelliklerini baskılayabilir veya hücre ölüm yollarını uyararak etki gösterebilmektedir. Pankreas kanserinin tedavisinde hem sentetik hem de bitkisel kaynaklı ilaç araştırmaları halen devam etmektedir. Bununla birlikte neoadjuvan kemoterapide ilaç toksisite veya perioperatif komplikasyonların artışına sebep olma gibi dezavantajları mevcuttur. Pankreas kanserinde adjuvan ve neoadjuvan yeni ajanların çıkması hastalara sunulacak tedaviler için ileri derece önem arz etmektedir. Klinik kullanımda olan ilaçların çoğunluğu bitkisel kaynaklı olup *dianthus* türleri de içerdiği fenolik bileşikler ile antikanserojen bir ajan olabilecek potansiyele sahiptir. Bununla birlikte literatürde bu bitki ile yapılmış az sayıda veri bulunmaktadır. Bu çalışmada *Dianthus orientalis* ekstraktının pankreas kanser hücre hattındaki olası antikanser, antiproliferatif ve antimetastatik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod: Çalışmada Panc-1 ve BxPC-3 olmak üzere iki farklı pankreas hücre hattı kullandı. *Dianthus orientalis* ekstraktlarının sağlıklı hücrelerdeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla HEK-293 sağlıklı embriyonik böbrek hücre hattı kullanıldı. Çalışma için *Dianthus orientalis* ekstraktlarının uygulanıp uygulanmadığı duruma göre; Panc-1 hücre hattına *Dianthus orientalis*'in uygulandığı grup *DiO-[P+]*, uygulanmadığı grup *DiO-[Pneg]*, BxPC-3 hücre hattına *Dianthus orientalis*'in uygulandığı grup *DiO-[Bx+]*, uygulanmadığı grup *DiO-[Bxneg]* HEK293 hücrelerine *DiO* ekstraktlarının uygulandığı grup *DiO-[HEK+]* ve uygulanmadığı grup *DiO-[HEKneg]* olmak üzere gruplar oluşturuldu. Panc-1, BxPC-3 ve HEK-293 hücreleri %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1

penisilin/streptomisin (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Mediu) kültürü ortamında T75 flasklarda 37°C ve % 5'lik CO₂'li ortamda kültüre edildi. Hücrelerin bu ekstrakta duyarlılığı tetrazolyum indirgenme (MTT) methoduyla analiz edildi. RT-PZR yöntemi ile *Bax*, *Bad*, *p50*, *Bak*, *Apaf-1*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Casp6*, *Casp9*, *Casp3*, *Casp12*, *Casp2*, *p50*, *Bak*, *Apaf-1*, *MMP7*, *MMP9*, *VIM*, *SNAIL*, *N-Cadherin*, *Beta-Catenin*, *ZEB1*, *ACTA2*, *DDR2*, *SNAI2*, *SNAI1*, *PALB2*, *CHEK2*, *CDH1*, *TWIST1* gen ekspresyonları analiz edildi.

Bulgular: Çalışmamızda Panc-1 ve Bx-PC3 Pankreas kanseri hücre hattında *Dianthus orientalis* ekstraktı ile tedavi edilen grupta *SNAI1* *PALB2* ve *CHEK2* ekspresyonları anlamlı olarak up-regüle idi. Bx-PC3 hücre hattında *CHD1* ekspresyonu anlamlı olarak down-regüle idi . Apopitoz analizinde tedavi grubunda kontrol grubuna göre artmış apopitoz oranı görüldü.

Sonuçlar: MTT analiz sonucunda göre IC₅₀ dozu 48 saatte 250 µg olarak tespit edildi. Çalışmamız pankreas hücre hattında uygulanan *Dianthus orientalis* ekstraktı için invazyon ve metataz üzerine bazı genlerde anlamlı farklılıklar tespit edildi. Proapoptik genler ile kaspaz yolağındaki başlatıcı ve efektör kaspaz aktivasyonu sağlayarak apopitoz yolağını aktive ettiğini gösterdi, apopitoz analizindeki kontrole göre artmış apopitoz oranı ekspresyon sonuçlarını da destekler nitelikteydi. Sonuç olarak pankreas kanseri hücrelerine *Dianthus orientalis* ekstraktının anlamlı antikanserojen etkinliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas, Apopitoz, Metastaz, *Dianthus orientalis*, Antikanserojen

ABSTRACT

IN VITRO INVESTIGATION OF INVASION AND METASTASIS EFFECTS OF *DIANTHUS ORIENTALIS* IN PANCREATIC CANCER

DR.BURAK SEVİNÇ

MASTER THESIS

KONYA, 2024

Aim: Pancreatic cancer is a highly lethal malignant disease. Treatment of pancreatic cancer has multiple systemic treatment options, including surgical techniques, depending on the stage of the disease (Mizrahi ve ark. 2020). Systemic chemotherapeutic treatments used in the treatment of patients can cause the apoptosis of cancer cells, prevent their proliferation, suppress their metastatic properties, or act by stimulating cell death pathways. However, neoadjuvant chemotherapy has disadvantages such as toxicity or increased perioperative complications. The emergence of new adjuvant and neoadjuvant agents in pancreatic cancer is of great importance for the treatments offered to patients. The majority of drugs in clinical use are of plant origin, and *Dianthus* species also have the potential to be anticancer agents with the phenolic compounds they contain. However, there are few data on this plant in the literature. Therefore, the study aimed to evaluate the possible anticancer, antiproliferative and antimetastatic effects of *Dianthus orientalis* extract on the pancreatic cancer cell line.

Material and Method: Two different pancreatic cell lines were used in the study: Panc-1 and BxPC-3. HEK-293 healthy embryonic kidney cell line was used to evaluate the effect of *Dianthus orientalis* extracts on healthy cells. Depending on whether *Dianthus orientalis* extracts are applied for the study or not; The group in which *Dianthus orientalis* was applied to the Panc-1 cell line was DiO-[P+], the group in which it was not applied was DiO-[Pneg], the group in which *Dianthus orientalis* was applied to the BxPC-3 cell line was DiO-[Bx+], the group in which it was not applied was DiO-[Bxneg] HEK293 Groups were created: DiO-[HEK+], the group in which DiO extracts were applied to the cells, and DiO-[HEKneg], the group in which DiO extracts were not applied. Panc-1, BxPC-3 and HEK-293 cells are T75

in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) culture medium containing 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 1% penicillin/streptomycin (100 µg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin). It was cultured in flasks at 37°C and 5% CO₂. The sensitivity of cells to this extract was analyzed by the tetrazolium reduction (MTT) method. Bax, Bad, p50, Bak, Apaf-1, Bcl-2, Bcl-XL, Casp6, Casp9, Casp3, Casp12, Casp2, p50, Bak, Apaf-1, MMP7, MMP9, VIM, SNAIL with RT-PCR method, N-Cadherin, Beta-Catenin, ZEB1, ACTA2, DDR2, SNAI2, SNAI1, PALB2, CHEK2, CDH1, TWIST1 gene expressions were analyzed.

Findings: In our study, SNAI1, PALB2 and CHEK2 expressions were significantly up-regulated in the group treated with *Dianthus orientalis* extract in the Panc-1 and Bx-PC3 Pancreatic cancer cell line. In the apoptosis analysis, an increased rate of apoptosis was observed in the treatment group compared to the control group.

Results: According to the MTT analysis result, the IC₅₀ dose was determined as 250 µg in 48 hours. In our study, significant differences were detected in some genes on invasion and metastasis for the *Dianthus orientalis* extract applied to the pancreas cell line. It showed that it activated the apoptosis pathway by activating pro-apoptotic genes and the initiator and effector caspase in the caspase pathway. The increased rate of apoptosis compared to the control in the apoptosis analysis also supported the expression results. As a result, significant anticarcinogenic activity of *Dianthus orientalis* extract against pancreatic cancer cells was demonstrated.

KeyWords: Pancreas, Apoptosis, Metastasis, *Dianthus orientalis*, Anticancer

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Pankreas Kanseri.....	4
2.1.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	4
2.1.2 Pankreas Kanseri Patolojisi	5
2.1.3 Pankreas Kanseri Tedavi	6
2.3 <i>Dianthus orientalis</i>	7
2.4 Apoptoz , Metastaz ve İnvazyon	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1 <i>Dianthus orientalis</i> ve Ekstraktlarının Elde Edilmesi.....	11
3.2 Materyal	11
3.2.1 Hücre Kültürü	11
3.2.2 Sitotoksikite Analizi	12
3.2.3.Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	12
3.2.4. Akan Hücre Ölçer Analizi	14
4. BULGULAR.....	15
4.1. Hücre Kültürü Sonuçları	15
4.2. MTT Analiz Sonuçları.....	15
4.3. RT-PZR Analiz Sonuçları	16
4.4. Akan Hücre Ölçer Analiz Sonuçları	17
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	18
6.KAYNAKLAR.....	22

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Pankreas kanseri insidansı ve mortalitesi	5
Şekil 2.2: Pankreas kanseri prevalansı	5
Şekil 2.3:İnvaziv pankreas karsinomunun üç farklı morfolojik yolu	6
Şekil 2.4 : <i>Dianthus orientalis</i> dış görünümü	8
Şekil 4.1 : Panc-1, BxPC-3 ve HEK293 hücre hatlarına DiO uygulama sonrası X10 ışık mikroskopi görüntüsü	14
Şekil 4.2 : Panc-1 ve BxPC-3 hücre hatlarına DiO uygulama sonrası MTT analiz sonuçları	14
Şekil 4.3 : Panc-1 ve BxPC-3 hücre hatlarına <i>DiO</i> uygulama sonrası metastaz ve invazyon gen ekspresyon değişiklikleri	15
Şekil 4.4 : Panc-1 ve BxPC-3 hücre hatlarına DiO uygulama sonrası apoptoz ve kaspaz gen ekspresyon değişiklikleri.	16
Şekil 4.5 : DiO uygulama sonrası akan hücre ile apoptoz analiz sonuçları	16

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1 : Çalışma kapsamında apopitoz, kaspaz, metastaz ve invazyonda rol oynayan genlere ait primer dizileri	132
---	-----

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μ G/ML : Mikrogram/Mililitre

AJCC :American Joint Committee on Cancer

APAF-1 : Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1

ATM : Ataksi Telenjektazi Mutated

BAX : Bcl-2 ile İlişkili X Proteini

BCL-2 : B Hücreli Lenfoma Geni-2

BCL-XL : B hücreli lenfoma geni-ekstra büyük

BRCA2 : Breast CAncer 2

CDH1 : E-Cadherin 1

CDH2 : E-Cadherin 2

CDX-2 : Transkripsiyon Faktörü

CHEK2 : Checkpoint Kinaz 2

DDR2 : DNA Hasar Yanıtı

DPC4 : Pankreas Kanserinde Silinmiş 4. Lokus

DNA : Deoksiribonükleik Asit

EGF : Epidermal Büyüme Faktörü

FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü

FSP1 : Fibroblast-Specific Protein-1

HER2/NEU : Human Epidermal Reseptör 2

HGF : Hepatosit Büyüme Faktörü

IGF-1 : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

KRAS : KirstenRat Sarkoma Viral Onkogen Homolog

MAPK : Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz

MMP7 : Matriks Metalloproteinaz-7

MMP9 : Matriks Metalloproteinaz-9

MTT : 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

P16INK4A : Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü

P53 : Apoptozun-Tümör-İlişkili Proteini -53

PALB2 : Partner andLocalizer of BreastCancer 2

PDAK : Pankeatikduktal Adenokarsinomları

PNET : Pankreatik Nöroendokrin Tümörler

RAF : Ras Aktive Edici Faktör

SNAI2 : Zincfinger Protein

TWIST1 : Related Protein 1.

TGF-B : Transforme Edici Büyüme Faktör-Beta

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ZEB1 : Zincfinger E-Box-Bindinghomeobox 1

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Pankreas kanserleri, henüz tam kür kemo-tedavisi olmayan son derece agresif yıkıcı ve mortal seyreden bir insan malignitesidir (Slack, 1995). İnvaziv seyreden pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC)'lar; invaziv seyretmeyen öncül oluşumlardan , pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), intraduktal papiller musinöz neoplazi (IPMN) ve musinöz kistik neoplazi (MCN) gelişerek oluşur. Non-invaziv lezyonlardan invaziv karsinoma dönüşüm görülmektedir (Yoshida ve ark., 2022). American Cancer Society verilerinde elde edilen bilgilere göre, 2019 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 56.000 civarı yeni pankreas kanseri vakası teşhis edilmiş olup tahmini 45.000 vakanın ölüme neden olması ile akciğer kanserinden ve kolorektal kanserden sonra ölüme neden olmada üçüncü sırada yer aldığı tespit edilmiştir (Siegel ve ark., 2020). Pankreas kanseri gelişimi ile ilişkili risklerde tip 2 diyabet, obezite, genetik faktörler, mikroflora, tütün mamülleri kullanımını ve alkol tüketimi gibi durumlar yer almaktadır (Mizrahi ve ark., 2020). Pankreas kanseri tedavisinde hastalığın evresine bağlı olarak cerrahi ile beraber birden fazla sistemik kemoterapötik ajan seçeneği mevcuttur (Mizrahi vd., 2020).

Bitkisel ilaçlar ile kanser hücre proliferasyonu inhibisyonu yapılarak, DNA onarım mekanizması ile apoptoz uyarılarak ve hücre döngüsü durdurularak etki gösterebilmekte ve bu eşsiz terapötik özellikleri sayesinde kanser ilaç araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2019).

Kanser tedavilerinde kullanılan sistemik kemoterapötik ajanlar, kanser hücrelerinin apoptozuna neden olabilir, metastatik ve invazif özelliklerini engelleyebilir veya çeşitli hücre ölüm yollarını uyararak etki gösterebilmektedir. Apoptoz, 1972 yılında Kerr ve ark. tarafından tanımlandığı programlanmış hücre ölümüdür (Kerr ve ark., 1972). Ayrıca, radyoterapi ve kemoterapi tedavileri için kanser tedavilerinde uyarılan hücre ölüm yoludur. Apoptoz, hücre içi stresör faktörler tarafından uyarılan intrinsik yol veya ölüm reseptörleri aktivasyonu ile tetiklenen ekstrinsik yol ile meydana gelebilir. Mitokondri ile sitokrom c salınımı, intrinsik yol için kritik bir süreçtir. *Bcl-2* protein ailesi (antiapoptotik protein *BCL2* ve proapoptotik protein *BAD* gibi) bu süreçte mitokondriyal membranlarda geçirgenliği değiştirerek sitokrom c'nin mitokondrilerden sitozole salınması işleminde önemli rol oynar. Tümör baskılayıcı protein *p53*, hücrelerde DNA hasarı olması durumunda *BAX* gibi proapoptotik genleri aktivasyonunu sağlar. Sitokrom c, sitozolde *Apaf-1* proteiniyle kompleks oluşturur sonrasında bu kompleks, başlatıcı kaspaz-9' u parçalar. Sonrasında aktive kaspazlar 3,6 ve

7 hücre ölümünü indüklemek için aktive edilir. Ancak hücre yüzeyindeki ölüm ligandlarının ve ölüm reseptörlerinin aktivasyonu dışsal yolda önemlidir (Wuest ve ark., 2019a). Bundan ötürü çalışmalarda kullanılacak olan ajanların etkinliğinin değerlendirmesi işleminde apopitoz (*Bax, Bcl-2, p50, Bad, Apaf-1, Bak, Bcl-XL*) ve kaspaz aktivasyonunda (*Casp9, Casp2, Casp3, Casp6, Casp12*) rol alan gen ekspresyonlarının değerlendirilme işlemi ileri derece önemlidir. İlave olarak pankreas kanserini de içeren birçok kanser türünün metastatik veya invazif özellikte olması tedaviyi zorlaştıran önemli sebeplerden biridir. Metastaz ve invazyon birçok gen tarafından kontrol edilir. Bu genler *ATM, PALB2, CHEK2, EMT, CDH1, CDH2, MMP7, MMP9, SNAI2, VIM, SNAIL, VEGF, ZEB1, TWIST1, E-Cadherin, N-Cadherin, Beta-Catenin, DDR2, Alpha-SMA, FSP1* şeklindedir. Kullanılan kemoterapötik ajanların bu gen ekspresyonundan bazıları arttırmak bazıları da azaltmak suretiyle etki ederek kanser hücrelerinin metastazını ya da invazyonunu engellerler.

Bundan dolayı çalışmalarda kullanılacak ajanların etkinliklerinin değerlendirmesi işleminde apopitoz (*Bak, Apaf-1, Bax, Bad, p50, Bcl-2, Bcl-XL*), kaspaz aktivasyonunda (*Casp6, Casp9, Casp2, Casp3, Casp12*), metastaz da (*ATM, PALB2, CHEK2*) ve invazyon da (*SNAI2, VIM, CDH1, CDH2, MMP7, MMP9, E-Cadherin, N-Cadherin, SNAIL, VEGF, ZEB1, TWIST1, Beta-Catenin, DDR2, Alpha-SMA, FSP1*) rol oynayan gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

Mevcut kullanılan kanser ilaçlarının %70'inden fazlası doğal bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. (vinkristin, topotekan, taksol, vinblastin, irinotekan vb.) Antikanser ajan olarak dünya genelinde birçok kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Shukla & Mehta, 2015). *Dianthus* türleri tanenler, saponinler, alkaloidler, fenolik bileşikler ve siklik peptitler içeriğinden zengindir (Aliyazicioglu ve ark., 2017). *Dianthus* türleri anti-inflamatuar ajan, diüretik, balgam söktürücü ve immün sistem destekleyici olarak kullanılmaktadır (Turan ve ark., 2017). Turan ve ark. *Dianthus carmelitarum*'un dimetil sülfoksit (DMSO)'da hazırlanmış ekstraktın kolon kanser hücre hattında antikanser etkisi hakkında araştırıldığı çalışmada, kolon kanser hücrelerinde sağlıklı kolon hücreleriyle karşılaştırılmasında 3.6 kat daha fazla sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. (Turan ve ark., 2019) Naghibi ve ark. *Dianthus orientalis* ekstraktı etkisinin human karaciğer, kolon, akciğer ve meme kanser hücre hattında olabilecek antikanser etkileri araştırıldığı çalışmalarında, anlamlı bir sitotoksik etki olmadığını lakin konsantrasyona bağlı sitotoksik etki ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Naghibi ve ark., 2014). Bu çalışma *Dianthus orientalis* ekstraktının sadece sitotoksik etkilerini içermekte sinyal yolları üzerinde

herhangi bir değerlendirme bulunmamaktadır. Kullanılan sitotoksik doz da 100µg/mL olup daha yüksek dozlar kanser hücrelerine uygulanmamıştır (Naghbi ve ark., 2014). *Dianthus chinensis* ile ilgili başka bir çalışmada akciğer ve kolon kanser hücre hattı üzerinde bu bitki ekstraktının sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2016). Araştırıldığı üzere literatürde *Dianthus orientalis* türünün antikanserojen etkilerinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup metastatik ve invazif özelliklerinin araştırıldığı çalışma bulunmamaktadır. İlave olarak bu çalışmalar da kullanılan bitki türleri Türkiye’de yetişen bitki türleri değildir. Bitki türlerinin içerikleri yetiştiği bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Çalışmada Türkiye’de doğal olarak yetişen *Dianthus orientalis*’den elde edilen ekstraktlar kullanılacaktır. *Dianthus orientalis*’in içerdiği fenolik bileşikler sebebiyle antikanser etkisinin çıkabileceği düşünülmektedir. Bu sebepten dolayı çalışmada *Dianthus orientalis* ekstraktının değişik konsantrasyonlarının pankreas kanserinin hücre hattındaki apoptotik, metastatik ve invazif etkilerinin araştırılması planlandı.

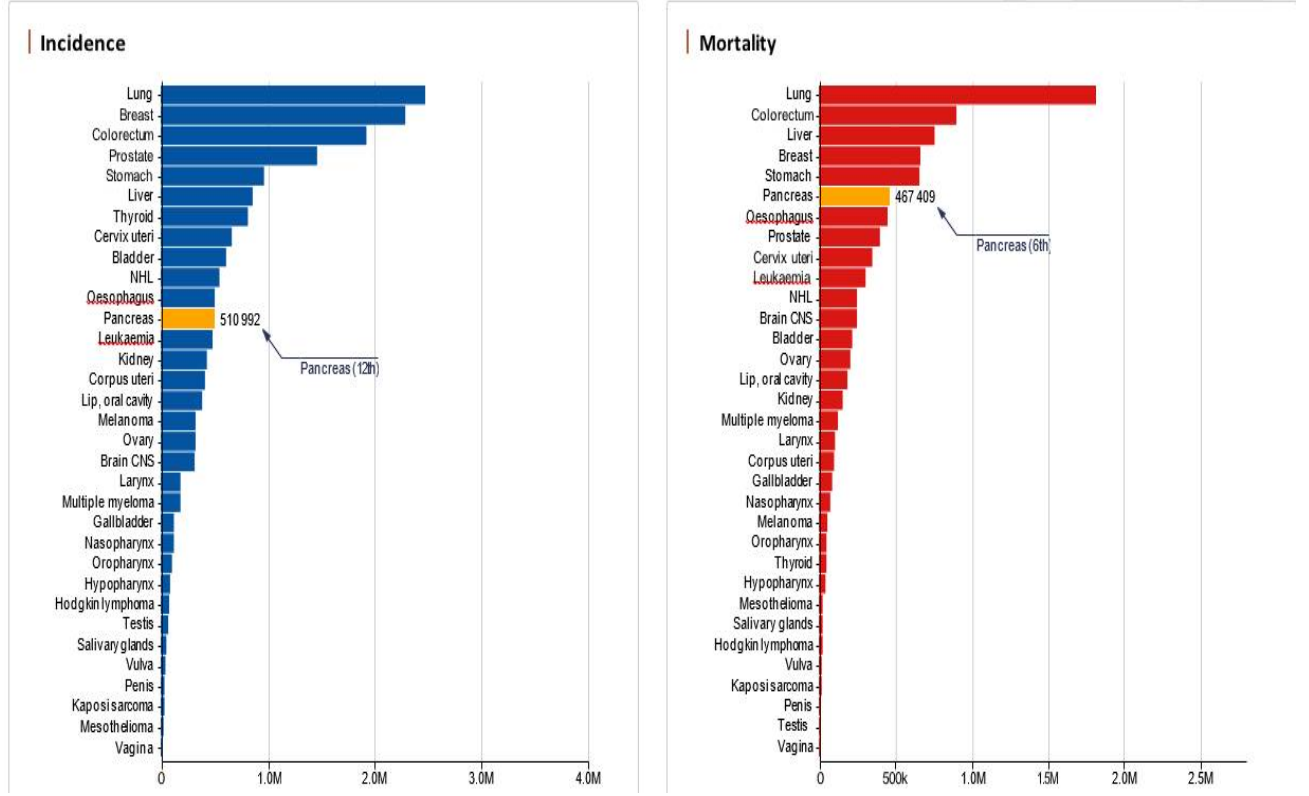
2.GENEL BİLGİLER

2.1.Pankreas Kanseri

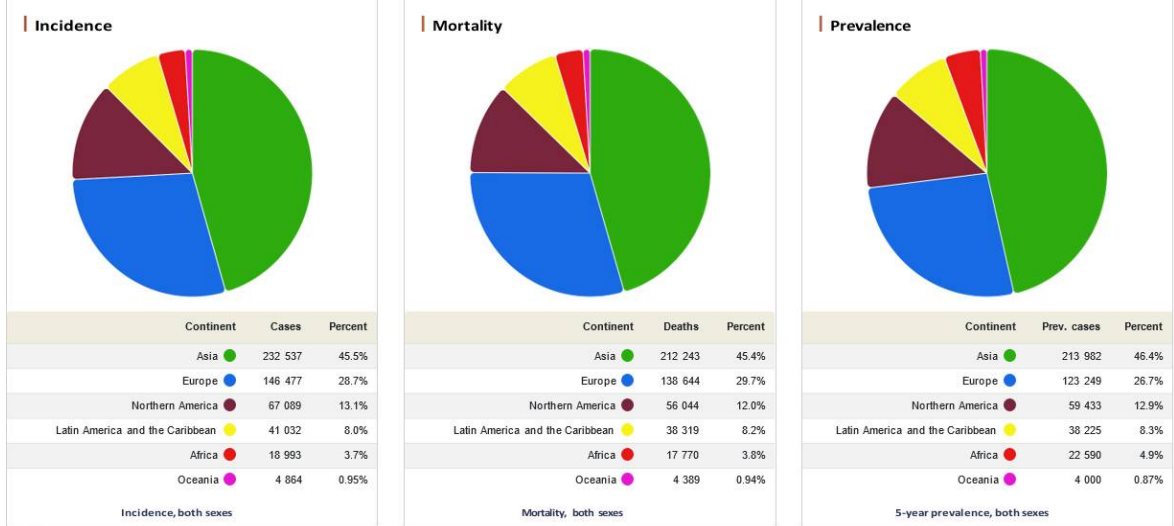
Pankreas kanseri endokrin ve ekzokrin şeklinde ikiye gruplandırılmaktadır. Pankreasın nöroendokrin tümörleri (PNET), pankreas malignitelerinin %7-10'unu kapsamaktadır. Pankreasın nöroendokrin tümörleri (PNET), adacık hücresi tümörleri diye adlandırılabilir (Phan ve ark., 2015). PNET'ler içinde, insülinomalar %42, gastrinomalar %24, glukagonomalar %14, VIPomalar %10, somatostatinomalar %6 oranında görülmekle beraber diğer ektoptik ve çoklu hormon salgılayan neoplazmalar çok daha enderdir (Klimstra, 2007). Ekzokrin pankreas neoplazileri pankreas kanserlerinde en sık görülen malignite olmakla beraber çoğunluğu pankreas başında lokalizedir ve patolojik olarak duktal adenokarsinomdur. Pankreas adenokarsinomlarının ortalama %60-70'i pankreasın başında ortaya çıkar, geri kalanı gövdede (%15) ve kuyrukta (%15) bulunur (McGuigan ve ark., 2018). Pankreatik tümörlerin oldukça fazlasını oluşturan pankreatik duktal adenokarsinomları (PDAK) pankreatik tümörlerle eş anlamlı olarak isimlendirilmektedir. (Mpillla ve ark., 2020)

2.1.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Pankreas kanserinin ABD'de 5 yıllık sağ kalım oranı %10 olup mortalite ve morbiditesi yüksek bir kanser türüdür (Mizrahi ve ark., 2020). Ek olarak pankreas kanseri geç farkedilen bir malignite olup buna bağlı olarak da ölüm oranları yüksektir (Mizrahi ve ark., 2020). Son 10 yılda, pankreasa bağlı kanserlerin insidansı gelişmiş ülkelerde giderek yükselmiştir. Bunun sebebi kronik hastalıkların (obezite ,diyabet vs.) artan prevalansı ile alkol, sigara, aşırı işlenmiş fazla şeker ile beslenme, sedanter yaşam, yüksek yağlı beslenme gibi diğer risk faktörleridir (Luo ve ark., 2020). Gelişmekte olan ülkelere göre daha düşüktür (Wong ve ark., 2017). Tüm kanserler içerisinde pankreas kanseri %2' sini oluştururken, kansere bağlı ölüm sebeplerinin %4.7'sine sahiptir. Erken tanı olarak tespit edilme zorluğu olarak kanserler içerisinde birinci sıralardadır. (Sung ve ark., 2021)



Şekil 2.1: Pankreas kanseri insidansı ve mortalitesi (Global Cancer Observatory, n.d.)

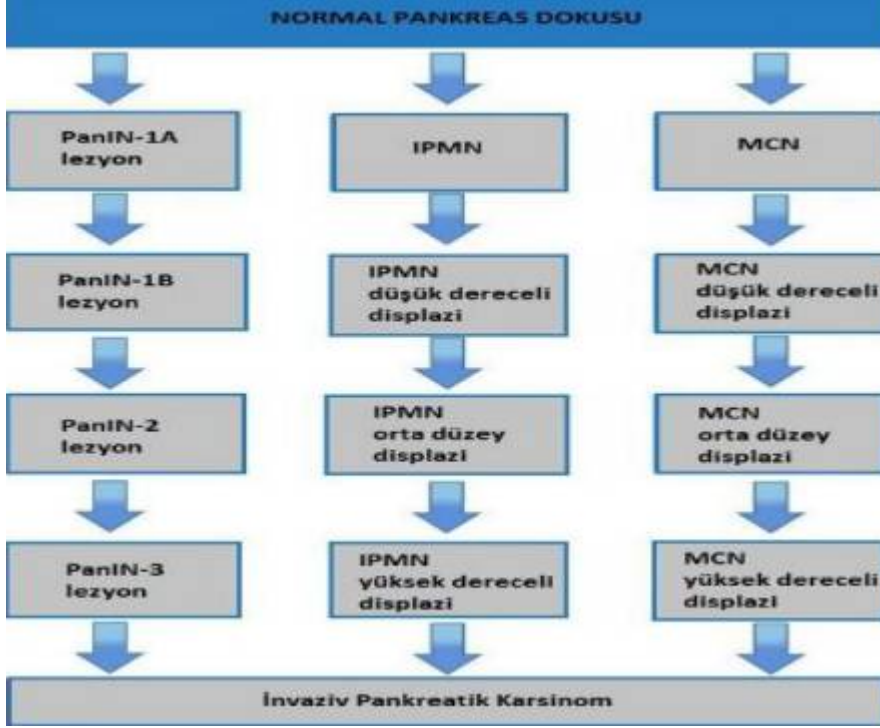


Şekil 2.2: Pankreas kanseri prevalansı (Global Cancer Observatory, n.d.)

2.1.2 Pankreas Kanseri Patolojisi

Patogenezezis ve karsinogeneziste, neoplastik invaziv olmayan lezyonlar bir dizi aşama ile invaziv lezyonlara dönüşür. Bu gelişimde pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplaziler (IPMN) ve müsinöz kistik neoplaziler (MCN) olmak üzere 3 adet öncü lezyon mevcuttur. Bu lezyonların kendilerine özgü

patolojik, klinik ve moleküler özellikleri vardır (Esposito ve ark., 2014). İnvaziv pankreas karsinomunun üç farklı morfolojik yolunun modeli şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.3) (Distler vd., 2014)



Şekil 2.3:İnvaziv pankreas karsinomunun üç farklı morfolojik yolu (Distler ve ark., 2014)

2.1.3 Pankreas Kanserinde Tedavi

Pankreas kanseri teşhisi konulan hastaların % 85-90 a yakını genelde cerrahi rezeksiyonu engelleyen bir nedene sahiptir. Pankreas kanserinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi seçenekleri mevcut olup evrelendirilmesi, hastanın performansı, hasta ve ailesinin tedavi hedeflerine göre yapılır. Pankreatik adenokarsinomda küratif tedavi cerrahidir. (Loveday ve ark., 2019) Bununla beraber küratif cerrahinin sonrasında dahi lokal ve uzak nükslerin sıklığı sebebiyle ortalama sağkalım 15-20 ay ve 5 yıllık sağkalım ise %8-15 arasındadır. Bundan dolayı cerrahi remisyona için multimodal tedavi diyebileceğimiz tam bir tedavi dizisine uyarlanmalıdır. (Lambert ve ark., 2019)

Cerrahi tedavi kapsamında 3 ana rezeksiyon tipi mevcut olup bunlar ; Whipple prosedürü (pankreatikoduodenektomi), distal pankreatektomi ve total pankreatektomidir. Bu cerrahi teknikler rezeksiyonun kapsamı ile rezeke edilen lenf nodları açısından standardize edilmiştir.

Pankreas baş ve unsinat proseteki tümörlerin cerrahi tekniği Whipple prosedürüdür. (Varadhachary ve ark., 2006) Pankreasın gövdesi ve kuyruğundaki tümörlerde teknik olarak distal pankreatektomi yapılmaktadır. Splenik ven veya arter tutulumu rezeksiyon için bir kontrendikasyon değildir. (Alexakis ve ark., 2004)

Pankreas kanserlerindeki genişletilmiş lenf nodu diseksiyonunun faydalı olduğuna dair bir kanıt yoktur. Standart lenf nodu diseksiyonu; sağ taraflı çölyak arter lenf düğümü, hepatoduodenal ligaman, portal ven, ana hepatik arter ve SMA'in sağ yarısındaki lenf nodlarının diseksiyonunu içerir. (Seufferlein ve ark., 2012)

Evre 0 (in situ karsinoma), 1A, 1B ve 2A pankreas kanseri tedavisinde cerrahi rezeksiyon ilk ve en iyi tedavidir. (Schlick ve ark., 2021) Evre 2 ve Evre 3 pankreas kanserlerinin lokalizasyonuna göre neoadjuvan tedavi ve sonrasında rezeksiyonlu yöntemler uygulanmaktadır. (Schlick ve ark., 2021)

Evre 4 metastatik kanser için en yaygın tedavi kemoterapidir, ancak klinik araştırmalar ek seçenekler sunabilir. (Schlick ve ark., 2021)

Pankreas kanserinin tedavisinin belli sınırlarda kalması ve sağkalım oranlarının düşük olmasından dolayı yeni tedavi yaklaşımları önem arz etmektedir. Kanser hücreleri üzerine daha etkili yok etme yöntemleri nüksünü azaltabilen yeni ilaçlara şiddetle ihtiyaç vardır.

2.3 *Dianthus orientalis*

Dianthus cinsi dünyada tahmini 300 e yakın tür içermektedir ve genel olarak Kuzey Yarımküre'nin ılıman ve soğuk kuşaklarında yayılım göstermektedir (Tong ve ark., 2012). Türkiye'de 76 türünün var olduğu ve bunlardan 33 türünün endemik olduğu bildirilmektedir (Hamzaoğlu ve ark., 2015)

Yarkaranfili (*Dianthus orientalis*) Karanfilgiller (Caryophyllaceae) ailesinden bir türdür. Türkiye'de Yukarı Fırat, Erzurum-Kars, Doğu Karadeniz, Yukarı Murat-Van, Hakkari, Adana alt bölgelerinde doğal yayılış göstermektedir. 500-3160 metre yükseklikler arasında; taşlık yamaçlar, uçurumlar, ve döküntü alanlarda gözlenebilir. (*Dianthus orientalis* | floranatolica, t.y.) Bilimsel olarak *Dianthus orientalis* Adams, Weber & Mohr şeklinde tanımlanır. (*Dianthus orientalis* | floranatolica, t.y.)



Şekil 2.4 : *Dianthus orientalis* dış görünümü (*Dianthus orientalis* - Wikipedia, t.y.)

Dianthus türleri tanenler, saponinler, alkaloidler, fenolik bileşikler ve siklik peptitler içeriğinden zengindir (Aliyazicioğlu ve ark., 2017). *Dianthus* türleri anti-inflamatuar ajan, diüretik, balgam söktürücü ve immün sistem destekleyici olarak kullanılmaktadır (Turan ve ark., 2017). Faydalı biyolojik etkilerinden dolayı geleneksel tedavide üriner enfeksiyon, menopoz, bel soğukluğu, öksürük ve kanser tedavilerinde kullanılmaktadırlar (Turan ve ark., 2017). *Dianthus carmelitarum*'un dimetil sülfoksit (DMSO)'da hazırlanmış ekstraktın kolon kanser hücre hattında antikanser etkisi hakkında araştırıldığı çalışmada, kolon kanser hücrelerinde sağlıklı kolon hücreleriyle karşılaştırılmasında 3.6 kat daha fazla sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Turan ve ark., 2019). Naghibi ve ark. *Dianthus orientalis* ekstraktı etkisinin insan karaciğer, kolon, akciğer ve meme kanser hücre hattında olabilecek antikanser etkileri araştırıldığı çalışmalarında anlamlı bir sitotoksik etki olmadığını lakin konsantrasyona bağlı sitotoksik etki ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Naghibi ve ark., 2014). Bu çalışma *Dianthus orientalis* ekstraktının sadece sitotoksik etkilerini içermekte sinyal yolları üzerinde herhangi bir değerlendirme bulunmamaktadır. Kullanılan sitotoksik doz da 100µg/mL olup daha yüksek dozlar kanser hücrelerine uygulanmamıştır (Naghibi ve ark., 2014). *Dianthus orientalis* ile

ilgili başka bir çalışmada akciğer ve kolon kanser hücre hattı üzerinde bu bitki ekstraktının sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (Lee vd ark., 2016) *Dianthus superbus*'un etanollü ekstraktının petrol eter, etil asetat, bütanol ve su fraksiyonlarının insan karaciğer kanseri (HepG2 ve Bel-7402) ve serviks kanseri (HeLa) hücre serilerinde sitotoksik etkisini araştırmışlar ve en iyi sonuçların etil asetat fraksiyonunda elde edildiğini göstermişlerdir (Yu ve ark., 2007)

2.4 Apoptoz , Metastaz ve İnvazyon

Apoptozis terimi ilk defa 1972 de kullanılmıştır. Kerr ve arkadaşları fizyolojik olarak ölen hücre çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatinlerin parçalarını görmüş ve organellerin korunduğunu tespitleyerek bu olayı büzüşme nekrozu olarak tanımlamıştır .(Vet&Derg, 2008) Tümör baskılayıcı genler, özellikle hücre siklusu denetim noktalarında rol alanlar ve DNA tamir genleri, siklus esnasında ortaya çıkabilecek genetik hasarları ortadan kaldırarak veya hasara uğrayan hücrelerin apoptozisine neden olarak kanserli hücrelerin ortaya çıkmasını önlemeye çalışırlar.

Kanser hücrelerinde metastaz pek çok biyokimyasal ve moleküler faktör tarafından yönlendirilen bir süreçtir. Metastaz kanser tedavilerinde yüksek oranda sınırlayıcı bir faktör olup kanserden ölümlerin %90'ından sorumludur (Reymond ve ark., 2013). Metastaz, lokal invazyon (epitelyal-mezenkimal geçiş), intravazasyon, dolaşımda sağkalım, ekstravazasyon (transendotelyal migrasyon/diapedez), mikrometastaz oluşumu ve metastatik koloni oluşumu gibi basamakları içermektedir (Özkara ve ark., 2020). Tümör hücrelerinde ekstravazasyon metastaz için anahtar basamaklardan biridir ve moleküllerde ufak farklılıklar olsa da tüm süreç temel olarak lökositlerde olduğu gibi, yuvarlanma, adezyon ve transmigrasyondur (diapedez). İntegrinler gibi hücre adezyon molekülleri ve Jam proteinleri gibi hücreler arası bağlantılar ekstravazasyon aşamasında kilit rollere sahiptir (Özkara ve ark., 2020). Kanser hücreleri onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör gen inaktivasyonları, hücrenin kontrolsüz çoğalması, kontak inhibisyonun kaybolması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması gibi malign özellikler kazanmasına yol açar (Kleinsmith, 2014).

Çalışmalarda kullanılacak ajanların etkilerini değerlendirmede apoptoz (*Bak, Apaf-1, Bax, Bad, p50, Bcl-2, Bcl-XL*), kaspaz aktivasyonu (*Casp6, Casp9, Casp2, Casp3, Casp12*), metastaz (*ATM, PALB2, CHEK2*) ve invazyon da (*SNAI2, VIM, CDH1, CDH2*,

MMP7, MMP9, E-Cadherin, N-Cadherin, SNAÏL, VEGF, ZEB1, TWIST1, Beta-Catenin, DDR2, Alpha-SMA, FSP1) rol oynayan gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi önemlidir

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 *Dianthus orientalis* ve Ekstraktlarının Elde Edilmesi

Dianthus orientalis (*DiO*) türü ekstraktların Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden temin edilmiştir. Bitki türüne ait ekstraktlar sadece etanol ve etanol/su karışımından oluşan çözücü içinde iki farklı çözücüde çözülür halde kullanılmıştır. *Dianthus orientalis*'in etanol çözücüsü içinde çözünen ekstraktlar *DiO-[E]*, etanol/su çözücüsü içinde çözünen ekstraktlar ise *DiO-[ES]* olarak isimlendirilmiştir.

3.2 Materyal

Çalışmada Panc-1 ve BxPC-3 olmak üzere iki farklı pankreas hücre hattı kullandı. *DiO* ekstraktlarının sağlıklı hücrelerdeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla HEK-293 sağlıklı embriyonik böbrek hücre hattı kullanıldı. Her üç hücre hattı da ATCC'den temin edildi [American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA temin edildi). Çalışma için *DiO* ekstraktlarının uygulanıp uygulanmadığı duruma göre; Panc-1 hücre hattına *Dianthus orientalis*'in uygulandığı grup *DiO-[P+]*, uygulanmadığı grup *DiO-[Pneg]*, BxPC-3 hücre hattına *Dianthus orientalis*'in uygulandığı grup *DiO-[Bx+]*, uygulanmadığı grup *DiO-[Bxneg]* HEK293 hücrelerine *DiO* ekstraktlarının uygulandığı grup *DiO-[HEK+]* ve uygulanmadığı grup *DiO-[HEKneg]* olmak üzere gruplar oluşturuldu.

3.2.1 Hücre Kültürü

Panc-1, BxPC-3 ve HEK-293 hücreleri %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 penisilin/streptomisin (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Mediu) kültürü ortamında T75 flasklarda 37°C ve % 5'lik CO₂'li ortamda kültüre edildi. Hergün düzenli olarak kontrolleri yapıldı ve proliferasyonun yeterli olduğu aşamada hücreler yeni besiyerlerine pasajlandı. Yeterli sayıya (6x10⁶) ulaşan hücrelerin bir kısmı sitotoksite analizi yapılmak üzere kullanıldı. Yeterli sayının belirlenmesi için hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı için; 10 µl hücre süspansiyonu, 10 µl %0.04 trypanblue ile karıştırıldı ve boya + hücre karışımından 20 µl alınıp lama yerleştirildi hücre sayım cihazında (Hemocytometer, Thermo Fisher) hücre sayımı yapılarak hücre sayısı ve hücreler tespit edildi. Arta kalan hücreler ise çalışmanın devamında uygulanılacak analizlerde kullanılmak üzere %10 dimethylsulfoxide (DMSO) içeren FBS içinde protokolüne uygun olarak kriyoprezervasyonu yapılarak -80°C de muhafaza edildi.

3.2.2 Sitotoksisite Analizi

Sitotoksisite analizi için *DiO* ekstraktları 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ve 1000 μM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Hücrelerin bu ekstrakta duyarlılığı tetrazolyum indirgenme (MTT) metoduyla analiz edildi. Bu amaçla kültür ortamlarındaki hücreler kültür ortamlarından fiziksel şekilde kaldırıldıktan sonra hücre sayısı ml'de 1×10^6 olacak şekilde süspanse edildi ve 96'lık plakelere ekimi yapıldı. Hücrelerin üzerine 100 μL hazırlanan dilüsyonlardaki *DiO-[E]* ve *DiO-[SE]* çözeltileri ilave edildi. Absorbans okumalarda negatif kontrol sağlaması için sadece medyumun bulunduğu üç kuyucuk ayrıldı. Daha sonra hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C ve % 5 CO_2 'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 10 μL MTT boyası ilave edilip 2-4 saat kadar inkübe edilip spektrofotometrede (mikrotiterplatereaderde) 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Ölçüm sonrası hücrelerin %50'sini öldüren doz (IC_{50}) belirlendi. Bu işlemlerin hepsi bütün gruplara uygulandı.

3.2.3.Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Primer Dizaynı

RT-PZR yöntemi ile *Bax*, *Bad*, *p50*, *Bak*, *Apaf-1*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Casp6*, *Casp9*, *Casp3*, *Casp12*, *Casp2*, *p50*, *Bak*, *Apaf-1*, *MMP7*, *MMP9*, *VIM*, *SNAIL*, *N-Cadherin*, *Beta-Catenin*, *ZEB1*, *ACTA2*, *DDR2*, *SNAI2*, *SNAI1*, *PALB2*, *CHEK2*, *CDH1*, *TWIST1* gen ekspresyonları analiz edildi. Bu amaçla bu genlere ait primerler IDT PrimerQuest online program kullanılarak dizayn edildi. Dizayn edilen primerler Tablo 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.1 : Çalışma kapsamında apoptoz, kaspaz, metastaz ve invazyonda rol oynayan genlere ait primer dizileri

Genler	Forward	Reverse
<i>PALB2</i>	CGTTGCGAAGCCCTGTGTTT	TCACCTTCCAGGAACCTGCC
<i>CHEK2</i>	CTGAGGCTGCGGAGAGTGTG	TGGCATCGTGCTGGTAGAGG
<i>CDH1 (E Cadherin)</i>	TGGGCTGGACCGAGAGAGTT	GCCCAGGGGACAAGGGTATG
<i>MMP7</i>	GTGGGAACAGGCTCAGGACTA	TCTGCAACATCTGGCACTCCA
<i>MMP9</i>	ATCCAGTTTGGTGTCGCGGA	ACCGAGTTGGAACCACGACG
<i>SNAI2</i>	CGAACTGGACACACATACAGTGATT	TCCACACAGTGATGGGGCTG
<i>VIM</i>	GCAGGTGGACCAGCTAACCA	TCTCCTCCTGCAATTTCTCCCG
<i>VEGFA</i>	GTGCCCCGCTGCTGTCTAATG	CCTCGGCTTGTACATCTGC
<i>ZEB1</i>	ACTAAGGAGGCTGCTGGCAA	AGAAAGGCGACGGGCTGAC
<i>TWIST1</i>	GGCCGAGACCTAGATGTCATT	GGCCTGTCTCGCTTTCTCT
<i>DDR2</i>	CATCCTCCCTTTCTGTTTGC	CCCTTGATGGAGGCTTTGAGA
<i>ACTA2</i>	GCCGCTCCCAGGCTAGAG	ATGGGAGGGGAGAGCCTGAT
<i>Beta-catenin</i>	GGAGACGGAGGAAGGTCTGA	GTCCAACCTCCATCAAATCAGCTTG
<i>SNAI1</i>	GGACCCACACTGGCGAGAAG	TGTGGAGCAGGGACATTCCGG
<i>Bax</i>	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>Bad</i>	CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG	CCCATCCCTTCGTCGTCT
<i>Bak1</i>	CATCAACCGACGCTATGACTC	GTCAGGCCATGCTGGTAGAC
<i>p53</i>	CAGCACATGACGGAGTTGT	TCATCCAAATACTCCACACGC
<i>Bcl-2</i>	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	CGGTTCAAGTACTCAGTCATCC
<i>Bcl-XL</i>	GAGCTGGTGGTTGACTTTCTC	TCCATCTCCGATTCAGTCCCT
<i>APAF-1</i>	AAGGTGGAGTACCACAGAGG	TCCATGTATGGTGACCCAT
<i>Casp2</i>	AGCTGTTGTTGAGCGAATTGT	AGCAAGTTGAGGAGTTCCACA
<i>Casp3A</i>	CATGGAAGCGAATCAATGGACT	CTGTACCAGACCGAGATGTCA
<i>Casp9</i>	CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC	GCATTTCCCCTCAAACCTCTCAA
<i>Casp12</i>	AACAACCGTAACTGCCAGAGT	CTGCACCGGCTTTTCCACT
<i>Casp6</i>	GAGGAGGGCAAGGTGTCTGG	GTTTTCTTCCCCACCTGCCG
<i>GAPDH</i>	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCAT

RNA İzolasyonu

Uygun doz ve süresi sonunda kontrol ve tedavi grubundaki hücreler kültür ortamında alınıp santrifüj edildikten 500 µl QIAzol (Qiagen, India) içine süspanse edildi. Ardından kloroform ile faz ayrımı yapıldı. Faz ayrımından sonra RNA çöktürüldü ve %70'lik etanol ile yıkanıp kurutulduktan sonra DNase/RNase-free su içinde çözüldü. RNA konsantrasyonları belirlendikten sonra cDNA sentezi yapıldı.

cDNA Sentezi

cDNA sentezi, cDNA sentez kiti ile prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. [cDNA Synthesis Kit with RNaseInh. (High Capacity) (A.B.T™, Turkey) kullanılarak]

RT-PZR Reaksiyonu

RT-PZR reaksiyonu SYBR Green Master Mix (HibriGen, 2x SYBR Green Master Mix. Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Her gen için RT-PZR karışımı, 5 µL 2X SYBR Greenmaster mix, 5 pMolforward ve reverse primer ve 2 µL cDNA içeren toplam 10 µL hacimde RT-PZR reaksiyonu kuruldu. RT-PZR profili, 95 °C'de 10 s ilk denatürasyonundan,

ardından 95 °C'de 15 s süreyle denatürasyon ve 57 °C'de 30 s süreyle elongasyon basamaklarından oluştu. Bu aşamada 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. RT-PZR reaksiyonu varlığında QuantStudio 3 qPCR sistemi ile (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analizler

Normallizasyon için β -actin housekeeping geni kullanıldı. Gen ifadelerindeki değişiklikler Livak'ın $\Delta\Delta CT$ yöntemi ile tespit edildi. Öncelikle çalışılan tüm genler *GAPDH* ile normalize edilerek ΔCT hesaplandı. Ardından *DiO* uygulanan tedavi grubu *DiO* uygulanmayan kontrol grubundan çıkarılarak $\Delta\Delta CT$ değeri elde edildi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri hesaplandı ve fold-change (kat değişikliği) elde edildi. ΔCT değerleri kullanılarak Student T-test yapıldı ve gen ekspresyonlarındaki anlamlılık seviyeleri belirlendi. $p < 0,05$ 'lik temel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences yazılımı, versiyon 21 (IBM SPSS Corp.; Armonk, NY, ABD) ile gerçekleştirildi. Gen ifadelerindeki değişiklikler VolcanoR online biyoinformatik program ile görsel şekle getirildi (Goedhart and Luijsterburg 2020).

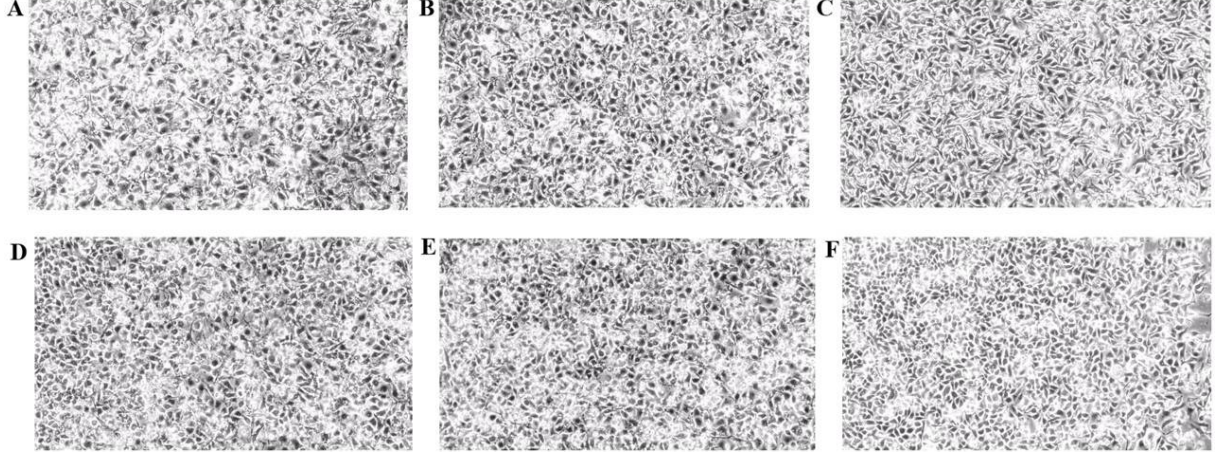
Akan Hücre Ölçer Analizi

Çalışma kapsamında Panc-1 ve BxPC-3 pankreas kanser hücre hatlarına *DiO-[E]* ve *DiO-[SE]* ekstraktların uygulanan hücrelerde akan hücre ölçer ile apoptoz analizi yapıldı. Bu amaçla APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with Propidium iodide (PI) (BioLegend, BioLegend Inc., San Diego) kullanıldı. Sadece Annexin V pozitif olan hücreler erken apoptozu, sadece PI pozitif hücreler nekrozu, her ikisi de pozitif olan hücreler geç apoptozu ifade etmektedir. Kit prosedürüne uygun olarak hücre yüzey boyaması yapıldı. Gerekli inkübasyon ve yıkama adımlarının ardından Beckman Coulter (Beckman Coulter Life Science, USA) akan hücre ölçer cihazında hücre sayımı yapılıp Kaluza (Beckman Coulter Life Science, USA) programı ile de akan hücre ölçer analizleri gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Sonuçları

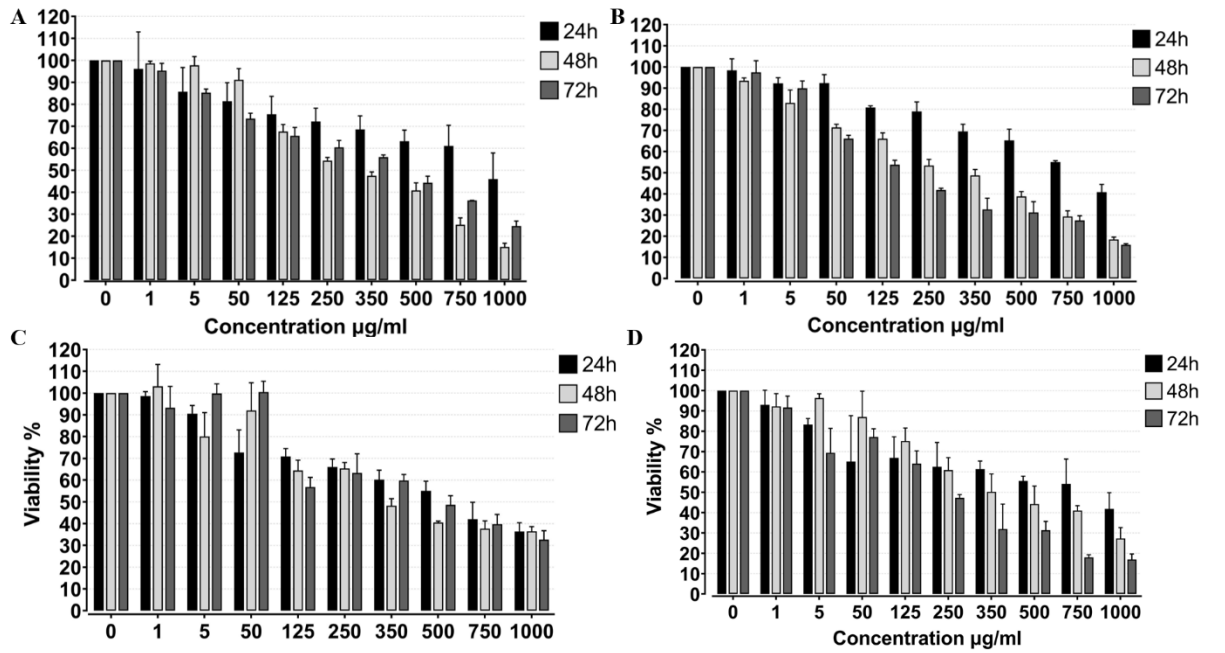
Şekil 4.1’de Panc-1, BxPC-3 ve HEK293 hücre hatlarına *DiO-[E]* ve *DiO-[SE]* uygulama öncesi ve sonrası ışık mikroskopi görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 4.1 : Panc-1, BxPC-3 ve HEK293 hücre hatlarına DiO uygulama sonrası X10 ışık mikroskopi görüntüsü (A. Panc-1 hücre hattına DiO uygulama öncesi, B. BxPC-3 hücre hattına DiO uygulama öncesi, C. HEK293 hücre hattına DiO uygulama öncesi, D. Panc-1 hücre hattına DiO uygulama sonrası, E. BxPC-3 hücre hattına DiO uygulama sonrası, F.HEK293 hücre hattına DiO uygulama sonrası).

4.2. MTT Analiz Sonuçları

Şekil 4.2’de farklı doz ve zamanlardaki MTT analiz sonuçları gösterildi. MTT analiz sonucunda göre IC₅₀ dozu 48 saatte 250 µg olarak tespit edildi.



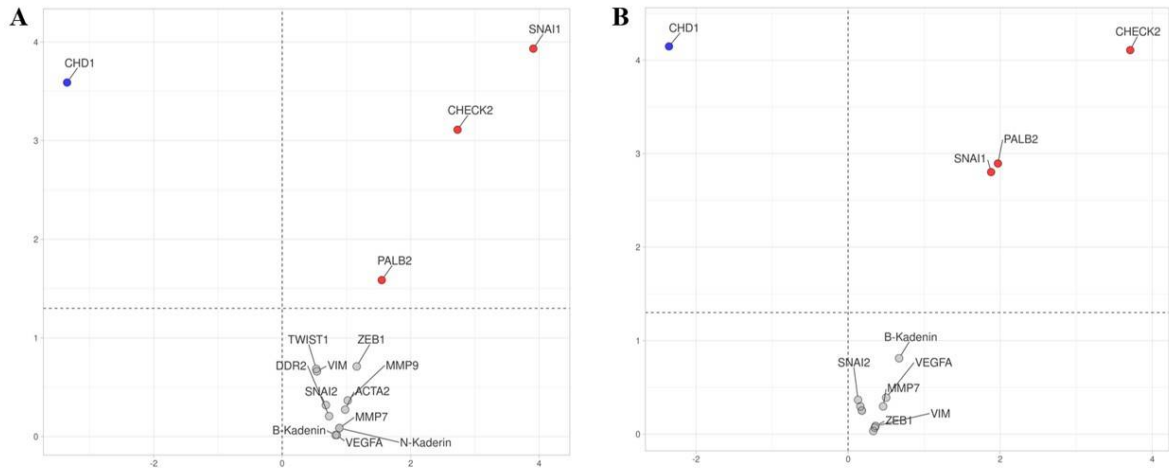
Şekil 4.2 Panc-1 ve BxPC-3 hücre hatlarına DiO uygulama sonrası MTT analiz sonuçları

4.3. RT-PZR Analiz Sonuçları

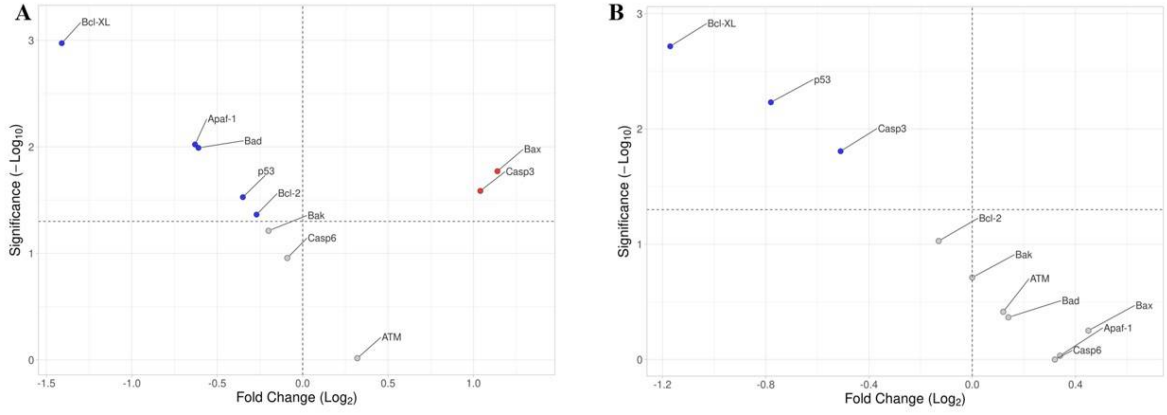
Panc1 and BxPC-3 hücrelerine belirlenen doz ve sürede *DiO* uygulama sonrası *MMP7*, *MMP9*, *VIM*, *SNAIL*, *N-Cadherin*, *Beta-Catenin*, *ZEB1*, *ACTA2*, *DDR2*, *SNAI2*, *SNAI1*, *PALB2*, *CHEK2*, *CDH1* ve *TWIST1* ekspresyonlarına ait değişiklikler Şekil 4.4'de gösterildi.

Panc-1 pankreas hücre hattında *DiO*-[*P+*] ve *DiO*-[*Pneg*] uygulama sonrası metastaz ve invazyon yolağında rol oynayan genler açısından karşılaştırıldı. *DiO*-[*P+*] uygulanan grup ile uygulanılmayan grup karşılaştırıldığında; *MMP7* (1.85-fold), *MMP9* (2.02-fold) *VIM* (1.54-fold), *N-Cadherin* (1.85-fold), *Beta-Catenin* (1.77-fold), *ZEB1* (2.23-fold), *ACTA2* (1.98-fold), *DDR2* (1.66-fold), *CDH1* (10.19-fold) ve *TWIST1* (1.44-fold) gen ekspresyonları açısından *CDH1* ($p < 0.001$) dışında anlamlı bir fark yoktu. Bu gen ekspresyonlarından Buna karşın *SNAI1* (15.03-fold; $p < 0.001$), *PALB2* (2.92-fold; $p = 0.026$) ve *CHEK2* (6.63-fold; $p = 0.001$) ekspresyonları anlamlı olarak up-regüle idi (Şekil 4.3A).

Bx-PC3 pankreas hücre hattında *DiO*-[*Bx+*] ve *DiO*-[*Bxneg*] uygulama sonrası metastaz ve invazyon yolağında rol oynayan genler açısından karşılaştırıldı. Panc-1 hücre hattındaki benzer sonuçlar elde edildi. Buna göre *DiO*-[*Bx+*] ve *DiO*-[*Bxneg*] karşılaştırıldığında; *SNAI1* (3.68-fold; $p = 0.002$), *PALB2* (3.91-fold; $p = 0.001$), ve *CHEK2* (13.08-fold; $p < 0.001$) ekspresyonları anlamlı olarak up-regüle iken *CDH1* (5.12-fold; $p < 0.001$) ekspresyonu anlamlı olarak down-regüle idi (Şekil 4.3B).



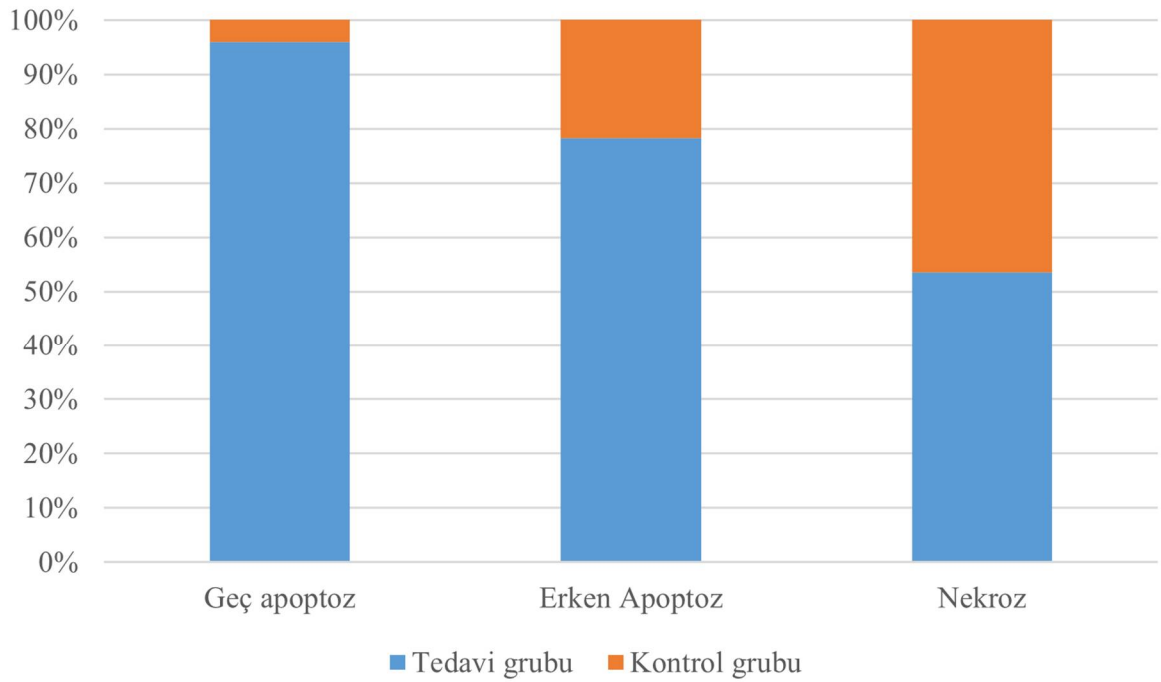
Şekil 4.3 : Panc-1 ve BxPC-3 hücre hatlarına *DiO* uygulama sonrası metastaz ve invazyon gen ekspresyon değişiklikleri (A. Panc-1 hücre hattına *DiO* uygulamas onrası, B. BxPC-3 hücre hattına *DiO* uygulama sonrası). Kırmızı renk, İstatistiksel olarak anlamlı olan up-regüle genleri; mavi renk, İstatistiksel olarak anlamlı olan donw-regüle genleri; gri renk, istatistiksel olmayan değişiklikleri ifade etmektedir.



Şekil 4.4 : Panc-1 ve BxPC-3 hücre hatlarına DiO uygulama sonrası apopitoz ve kaspaz gen ekspresyon değişiklikleri (A. Panc-1 hücre hattına DiO uygulama sonrası, B. BxPC-3 hücre hattına DiO uygulama sonrası). Kırmızı renk, İstatistiksel olarak anlamlı olan up-regüle genleri; mavi renk, İstatistiksel olarak anlamlı olan donw-regüle genleri; gri renk, istatistiksel olmayan değişiklikleri ifade etmektedir.

4.4. Akan Hücre Ölçer Analiz Sonuçları

DiO uygulama sonrası apopitotik etki akan hücre ölçer yöntemi ile de değerlendirildi. Buna göre kontrol grubunda *DiO-[Pneg]* ve *DiO-[Bxneg]* erken apopitoz oranı sırasıyla % 0.09 ile %0.07 , geç apopitoz oranı % 0.55 ile % 0.68, ve nekrotik hücre oranı %2.05 ile % 3.1 olarak belirlendi. Pankreas hücre hattında *DiO* uygulanan grupta *DiO-[P+]* ve *DiO-[Bx+]* sırasıyla erken apopitoz oranı %49.39 ile %3.6 geç apopitoz oranı %2.26 ile % 60.92 ve nekrotik hücre oranı %4.62 ile %35.17 olarak tespit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 : DiO uygulama sonrası akan hücre ile apopitoz analiz sonuçları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pankreas kanserleri tanı esnasında metastaz ve invazyon şiddetine bağlı inoperabilite oranı yüksek olması ve operable hastalarda cerrahi tedavilerin büyüklüğü, cerrahi tedavi sonrasında da sağkalım oranının düşük olması sebebi ile oldukça agresif seyretmektedir. Bu nedenle hem operasyon öncesi hem de operasyon sonrasında onkolojik tedavi verimliliği oldukça önem arz etmektedir. Son yıllarda, kanser tedavisinde yapılan yoğun araştırmalar, kanser terapileri için umut verici potansiyel taşıyan yeni ajanların keşfedilmesine yol açmıştır. Pankreas kanserinin tedavisinde çeşitli bitkilerin uzun süredir kullanıldığı bilinmekle birlikte, bu hastalığın yönetiminde bitki bazlı ajanlar üzerine daha fazla araştırmaya duyulan ihtiyaç inkar edilemez. Pek çok bitki, pankreas kanseri tedavisindeki potansiyelleri için literatürde araştırılmış olsa da çalışmamız bildiğimiz kadarıyla *Dianthus orientalis* pankreas kanseri üzerine etkinliği araştırılan ilk çalışmadır. Çalışmamızda pankreas kanserine yönelik iki farklı pankreas hücre hattı Panc-1 ve BxPC-3 kullanıldı ve antikanserojen etkinlikleri araştırıldı. Pankreas hücrelerinde apoptoz oranı, sitotoksik etki, invazyon ve metastazda rol oynayan gen ekspresyonlarındaki değişiklikler değerlendirildi. Bulgularımız, metastaz ve invazyon yollarında yer alan gen ekspresyonlarını modüle ederek pozitif bir etki gösterdiğini, ilk kez ortaya koymuştur.

Dianthus türlerinin kaempferide, kaempferol, apigenin, luteolin ve kuersetin gibi fenolik bileşikler ve bunların glikozid türevleri yönünden zengin oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiş olup (Obmann, Werner, ve ark., 2011; Obmann, Zehl, ve ark., 2011), bu bileşiklerin çeşitli kanser hücreleri üzerinde antikanser özellikler sergilediklerine dair literatürler de mevcuttur (Ravishankar ve ark., 2013). Buradan hareketle *Dianthus orientalis* ekstraktının sitotoksik etkinliğinin içerdiği bu fenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. *Dianthus* türleri hakkında yapılan bir takım çalışmalarda *dianthus carmelitarum* ekstraktının kolon kanserinde TPC değeri 100 g numune başına $784,8 \pm 40,3$ mg gallik asit eşdeğeri ve sinapik asit ve benzoik asit ekstrakttaki majör fenolikler olarak tespit edildi. *Dianthus carmelitarum* ekstraktı 3,6 kat sitotoksik etki gösterdi (Turan ve ark., 2019). *Dianthus chinensis*'in etanolü ekstraktının insan akciğer kanseri (H1299) ve kolon kanseri (HCT-116) hücre serilerinde 250-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Lee ve ark., 2016). *Dianthus orientalis* için yapılan tek bir çalışmada ise bitkinin metanolü ekstraktlarının insan HepG2, MCF-7, A549 ve kolon kanseri (HT-29) hücre serilerinde 100 µg/mL konsantrasyona kadar herhangi bir sitotoksik

etki göstermediğini bildirirlerken (Naghibi ve ark., 2014) , *Dianthus orientalis* ekstraktının sadece sitotoksik etkilerini içermekte olup sinyal yolları ve apoptoz üzerinde herhangi bir değerlendirme bulunmamaktadır. Kullanılan sitotoksik doz da 100µg/mL olup daha yüksek dozlar kanser hücrelerine uygulanmamıştır (Naghibi ve ark., 2014) Literatürde *Dianthus orientalis* ekstraktı için pankreas kanser hücreleri ile yapılmış in vivo ya da in vitro çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda *Dianthus orientalis*'in molekülünün in vitro olarak pankreas kanseri hücre hatlarında tümör proliferasyonunu inhibe edebildiği ve apoptozu indükleyebildiği gösterilmiştir. Ayrıca MTT analiz sonuçlarında IC₅₀ dozu 48 saatte 250 µg olarak tespit edildi. Çalışmamız *Dianthus orientalis*'in pankreas kanseri üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

Çalışmamızda metastaz ve invazyon yolları için Panc-1 ve Bx-PC3 pankreas hücre hatlarında metastaz ve invazyon yollarında *SNAIL*, *PALB2* ve *CHEK2* ekspresyonları anlamlı olarak up-regüle iken Bx-PC3 pankreas hücre hattında *CHDI* ekspresyonu anlamlı olarak down-regüle idi. Bununla beraber apoptoz oranlarında da *Dianthus orientalis* uygulanan grupta anlamlı yükseklik görüldü. Bu durumda *Dianthus orientalis*'in *SNAIL*, *PALB2* ve *CHEK2* ekspresyonları anlamlı olarak artırarak kanser hücre ilerlemesini durdurabileceği düşünüldü.

Bitkisel ilaçlar ile kanser hücre proliferasyonu inhibisyonu yapılarak, DNA onarım mekanizması ile apoptoz uyarılarak ve hücre döngüsü durdurularak etki gösterebilmekte ve bu eşsiz terapötik özellikleri sayesinde kanser ilaç araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2019). Mevcut kullanılan kanser ilaçlarının %70'inden fazlası doğal bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. (vinkristin, topotekan, taksol, vinblastin, irinotekan vb.) (Shukla & Mehta, 2015). Bitkisel ekstraktların in vitro antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde pek çok yöntem kullanılmakta olup, çalışmalarda en az iki bağımsız yöntem yer verilmesi gerektiği önerilmektedir (Nuutila ve ark., 2003). *Dianthus* türleri Caryophyllaceae ailesine mensup tıbbi bitkiler olup alkaloidler, tanninler, saponinler, siklik peptidler ve fenolik bileşiklerce zengin oldukları bildirilmektedir (Gou ve ark., 2011). Çeşitli *Dianthus* türlerinin in vitro sitotoksik, apoptotik etkisini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır; *Dianthus* türleri hakkında yapılan bir takım çalışmalarda *Dianthus carmelitarum* ekstraktının normal kolon hücrelerine kıyasla insan kolon kanseri hücrelerine seçici sitotoksik etki (3,6 kat) gösterdiği, ekstraktın WiDr hücrelerinde MMP'nin azalması yoluyla S fazında hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indüklediği tespit edilmiş (Turan

ve ark., 2019). Gene başka bir çalışmada *Dianthus chinensis* ' in insan ağız kanserinde kanser hücrelerinin büyümesini engellediği tespit edilmiş. Bunuda hücre büyümesini engelleyerek ve kaspaz bağımlı apoptozu indükleyerek oral kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemeyi başardığı görülmüştür (Shin ve ark., 2011). *Dianthus caryophyllus* çeşidi için yapılan bir çalışmada ise kaempferid triglikozidinin, ligand bağlama bağımlı östrojen reseptörü aktivasyonu tarafından aracılık edilen bir mekanizma aracılığıyla doğal ve östrojen reseptörü beta aşırı ekspresyonu gösteren kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını engellediği kanıtlanmıştır. G(0)/G(1) hücre fraksiyonunu artırarak HCT8 hücre döngüsü ilerlemesini etkilemiştir ve östrojen reseptörü beta aşırı ekspresyonu gösteren hücrelerde iki antioksidan enzimi artırmıştır ve ve kolorektal kansere karşı koruyucu aktivitelerini anlamlı bulunmuştur (Martineti ve ark., 2010) Gene *Dianthus superbus* ' un etil asetat (EA), bütanol (Bu) ve damıtılmış su (DW) özütleri, biyoaktif bileşiklerin çıkarılması ve biyolojik aktiviteleri açısından değerlendirilmiş ve antioksidan, antikanser ve antiviral özellikleri açısından anlamlı bulunmuştur. (Kim ve ark., 2019) *Dianthus chinensis* 'nin apoptotik etkileri insan hepatosellüler karsinoma hücrelerinde araştırılmıştır. EDCL ile tedavi, apoptozu indükleyerek konsantrasyon ve zamana bağlı bir şekilde hücre büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Bu indüksiyon, kromatin yoğunlaşması, kaspazların aktivasyonu ve poli (ADP-riboz) polimeraz proteininin kesilmesi ile ilişkilendirilmiştir (Nho ve ark., 2012). Yapılan bir başka çalışmada da *Dianthus superbus* 'un hepatosellüler karsinoma hücrelerinin apoptozunu indükleyebileceğini göstermektedir (Ding ve ark., 2013).

Panc1 and BxPC-3 pankreas kanser hücrelerine belirlenen sitotoksik doz ve sürede uygulama sonrası hücre proliferasyonunda azalma olduğu belirlendi. Bu azalmanın apoptoz ve kaspaz yolağında rol oynayan gen ekspresyonunu pozitif yönde düzenleyerek gerçekleştiği gösterildi. Apoptoz, normal olarak gelişim sırasında dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için kullanılan homeostatik bir mekanizmadır (Elmore, 2007) . Ayrıca apoptoz kanser tedavisinde indüklenmiş önemli bir hücre ölüm yoludur. Apoptoz kaspazlar olarak bilinen bir proteaz ailesi tarafından yürütülür. Kaspazlar, hem başlatıcılar (kaspaz-2, 8, 9 ve 10) hem de yürütücüler (kaspaz-3, 6 ve 7) olduklarından apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alır. Apoptoz intrinsik yol veya ekstrinsik yolla meydana gelebilir. İntrinsik yolak farklı stres koşullarına yanıt olarak mitokondriyal seviyede birleşen hücre içi sinyaller aracılığıyla gerçekleşir. Genetik hasar, hipoksi, sitozolik Ca⁺ seviyesinde ki artış ve şiddetli oksidatif stres gibi durumlar intrinsik apoptoz yolağının aktivasyonuna neden olur. Proapoptotik genler olan Bcl-2 ailesinin (Bax, Bak) aktivasyonu, antiapoptotik

genler olan Bcl-2 ve Bcl-XL'nin baskılanmasına neden olur. Ayrıca tümör baskılayıcı protein p53, hücrelerde DNA hasarı olması durumunda proapoptotik gen olan Bax'ı aktive eder. Mitokondriyal dış zar geçirgenliği bozulur ve proteinler (Sitokrom c) sitozole geçer. Bu proteinler sitozolde Apaf-1 proteini ile bir kompleks oluşturur ve kaspaz yolağı aktive olarak apoptoz gerçekleşir. (Wuest vd., 2019b) (Pistritto vd., 2016). Çalışmamızda pankreas hücre hattında uygulanan *Dianthus orientalis* ekstraktı için kontrol grubuna göre artmış apoptoz oranı mevcuttur.

Bitkisel kökenli antikanser ajanları üzerine yapılan araştırmalar hızla ilerlemektedir. *Dianthus* cinsine ait türlerin, fitokimyasal içerikleri nedeniyle antikanser özellikler gösterdiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Araştırıldığı üzere literatürde *Dianthus orientalis* türünün antikanser etkilerinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup metastatik ve invazif özelliklerinin araştırıldığı çalışma bulunmamaktadır. İlave olarak diğer *dianthus* türleri ile yapılan çalışmalar da kullanılan bitki türleri Türkiye'de yetişen bitki türleri değildir. Bitki türlerinin içerikleri yetiştiği bölgeye göre de değişiklik göstermektedir. Bu çalışma *Dianthus orientalis* ekstraktının pankreas kanseri üzerine *in vitro* etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır. Bu açıdan bakıldığında, bu çalışmanın yeni farmakolojik çalışmalara ışık tutması beklenmektedir. Çalışmamızda *Dianthus orientalis* ekstraktının pankreas kanseri hücre hatları üzerindeki antikanser ve antiproliferatif etkileri, morfolojik ve moleküler düzeyde incelenmiştir. Bu bulgular *Dianthus orientalis*'in pankreas kanseri tedavisindeki terapötik potansiyelini keşfetmeye yönelik gelecekteki araştırmalar için temel oluşturmaktadır.

6.KAYNAKLAR

- Alexakis, N., Halloran, C., Raraty, M., Ghaneh, P., Sutton, R., & Neoptolemos, J. P. (2004). Current standards of surgery for pancreatic cancer. *British Journal of Surgery*, 91(11), 1410–1427. <https://doi.org/10.1002/bjs.4794>
- Aliyazıcıoğlu, R., Demir, S., Badem, M., Sener, S. O., Korkmaz, N., Demir, E. A., Özgen, U., Karaoğlu, S. A., & Aliyazıcıoğlu, Y. (2017). Antioxidant, antigenotoxic, antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Dianthus carmelitarum*. *Natural Products*, 11. www.acgpubs.org/RNP
- Dianthus orientalis* - Wikipedia. (t.y.). *Wikipedia*. https://en.wikipedia.org/wiki/Dianthus_orientalis
- Ding, C., Zhang, W., Li, J., Lei, J., & Yu, J. (2013). Cytotoxic constituents of ethyl acetate fraction from *Dianthus superbus*. *Natural Product Research*, 27(18), 1691–1694. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.763127>
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., & Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/474905>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Esposito, I., Konukiewicz, B., Schlitter, A. M., & Klöppel, G. (2014). Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: Facts, challenges and future developments. *World Journal of Gastroenterology*, 20(38), 13833–13841. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I38.13833>
- Floranatolica. (t.y.). *Dianthus orientalis*. <https://floranatolica.com/eukaria/gui/species.php?ID=Dianthus-orientalis>
- Global Cancer Observatory. (t.y.). *Global Cancer Observatory*. <https://gco.iarc.fr/en>
- Gou, J., Zou, Y., & Ahn, J. (2011). Enhancement of antioxidant and antimicrobial activities of *Dianthus superbus*, *Polygonum aviculare*, *Sophora flavescens*, and *Lygodium japonicum* by pressure-assisted water extraction. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 283–287. <https://doi.org/10.1007/S10068-011-0040-7>
- Hamzaoğlu, E., Koç, M., Büyük, I., Aksoy, A., & Aydın, S. S. (2015). Presence of *Dianthus roseoluteus* Velen. (Caryophyllaceae) in Turkey and a new species: *Dianthus macroflorus* Hamzaoglu. *Systematic Botany*, 40(1), 208–213. <https://doi.org/10.1600/036364415X686512>
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khan, T., Ali, M., Khan, A., Nisar, P., Jan, S. A., Afridi, S., & Shinwari, Z. K. (2019). Anticancer plants: A review of the active phytochemicals, applications in animal models, and regulatory aspects. *Biomolecules*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.3390/biom10010047>

- Kim, D. H., Park, G. S., Nile, A. S., Kwon, Y. D., Enkhtaivan, G., & Nile, S. H. (2019). Utilization of *Dianthus superbus* L. and its bioactive compounds for antioxidant, anti-influenza, and toxicological effects. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 125, 313-321. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.01.013>
- Kleinsmith, L. J. (2014). *Principles of cancer biology* (p. 315). Pearson Education.
- Klimstra, D. S. (2007). Noductal neoplasms of the pancreas. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*, 20(Suppl 1), 94-112. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.3800686>
- Lambert, A., Schwarz, L., Borbath, I., Henry, A., Van Laethem, J.-L., Malka, D., Ducreux, M., & Conroy, T. (2019). An update on treatment options for pancreatic adenocarcinoma. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 11, 175883591987556. <https://doi.org/10.1177/1758835919875568>
- Lee, J., Seo, Y., Lee, J., & Ju, J. (2016). Antioxidant activities of *Dianthus chinensis* L. extract and its inhibitory activities against nitric oxide production and cancer cell growth and adhesion. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45(1), 44-51. <https://doi.org/10.3746/JKFN.2016.45.1.044>
- Loveday, B. P., Lipton, L., & Thomson, B. N. (2019). Pancreatic cancer: An update on diagnosis and management. *Australian Journal of General Practice*, 48(12), 826-831. <https://doi.org/10.31128/AJGP-06-19-4957>
- Luo, W., Tao, J., Zheng, L., & Zhang, T. (2020). Current epidemiology of pancreatic cancer: Challenges and opportunities. *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, 32(6), 705-719. <https://doi.org/10.21147/J.ISSN.1000-9604.2020.06.04>
- Martineti, V., Tognarini, I., Azzari, C., Sala, S. C., Clematis, F., Dolci, M., Lanzotti, V., Tonelli, F., Brandi, M. L., & Curir, P. (2010). Inhibition of in vitro growth and arrest in the G0/G1 phase of HCT8 line human colon cancer cells by kaempferide triglycoside from *Dianthus caryophyllus*. *Phytotherapy Research: PTR*, 24(9), 1302-1308. <https://doi.org/10.1002/PTR.3105>
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment, and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 24(43), 4846-4861. <https://doi.org/10.3748/WJG.V24.I43.4846>
- Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., & Shroff, R. T. (2020). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 395(10242), 2008-2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30974-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30974-0)
- Mpilla, G. B., Philip, P. A., El-Rayes, B., & Azmi, A. S. (2020). Pancreatic neuroendocrine tumors: Therapeutic challenges and research limitations. *World Journal of Gastroenterology*, 26(28), 4036-4054. <https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I28.4036>
- Naghibi, F., Irani, M., Hassanpour, A., Pirani, A., & Moghadam, M. H. (2014). Cytotoxic effects of selective species of *Caryophyllaceae* in Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*.

- Nho, K. J., Chun, J. M., & Kim, H. K. (2012). Ethanol extract of *Dianthus chinensis* L. induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2012, 573527. <https://doi.org/10.1155/2012/573527>
- Nuutila, A. M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M., & Oksman-Caldentey, K. M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81(4), 485-493. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00476-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00476-4)
- Obmann, A., Werner, I., Presser, A., Zehl, M., Swoboda, Z., Purevsuren, S., Narantuya, S., Kletter, C., & Glasl, S. (2011). Flavonoid C- and O-glycosides from the Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor* Fisch. *Carbohydrate Research*, 346(13), 1868-1875. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2011.04.031>
- Obmann, A., Zehl, M., Purevsuren, S., Narantuya, S., Reznicek, G., Kletter, C., & Glasl, S. (2011). Quantification of flavonoid glycosides in an aqueous extract from the traditional Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor* Fisch. *Journal of Separation Science*, 34(3), 292-298. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201000698>
- Özkara, G., Öztürk, O., & Aydoğan, H. Y. (2020). Cancer and metastasis: Importance of cell adhesion molecules and cell junctions. In *Experimed*, 10(1), 38-48. Istanbul University Press. <https://doi.org/10.26650/experimed.2020.0003>
- Phan, A. T., Halperin, D. M., Chan, J. A., Fogelman, D. R., Hess, K. R., Malinowski, P., Regan, E., Ng, C. S., Yao, J. C., & Kulke, M. H. (2015). Pazopanib and depot octreotide in advanced, well-differentiated neuroendocrine tumours: A multicentre, single-group, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 16(6), 695-703. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70136-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70136-1)
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4), 603-619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(12), 2821-2831. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2013.10.004>
- Reymond, N., D'Água, B. B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 858-870. <https://doi.org/10.1038/NRC3628>
- Schlick, K., Kiem, D., & Greil, R. (2021). Recent advances in pancreatic cancer: Novel prognostic biomarkers and targeted therapy—a review of the literature. *Biomolecules*, 11(10), 1469. <https://doi.org/10.3390/biom11101469>
- Seufferlein, T., Bachet, J. B., Van Cutsem, E., & Rougier, P. (2012). Pancreatic adenocarcinoma: ESMO–ESDO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23, vii33-vii40. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds224>
- Shin, J. A., Shim, J. H., Jeon, J. G., Choi, K. H., Choi, E. S., Cho, N. P., & Cho, S. D. (2011). Apoptotic effect of *Polygonum cuspidatum* in oral cancer cells through the regulation of

- specificity protein 1. *Oral Diseases*, 17(2), 162-170. <https://doi.org/10.1111/J.1601-0825.2010.01710.X>
- Shukla, S., & Mehta, A. (2015). Anticancer potential of medicinal plants and their phytochemicals: A review. *Revista Brasileira de Botânica*, 38(2), 199-210. <https://doi.org/10.1007/S40415-015-0135-0>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Slack, J. M. W. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development (Cambridge, England)*, 121(6), 1569-1580. <https://doi.org/10.1242/DEV.121.6.1569>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Tong, Y., Luo, J. G., Wang, R., Wang, X. B., & Kong, L. Y. (2012). New cyclic peptides with osteoblastic proliferative activity from *Dianthus superbus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(5), 1908-1911. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.01.058>
- Turan, I., Demir, S., Aliyazicioglu, R., Mısır, S., & Aliyazicioglu, Y. (2017). *Dianthus carmelitarum* ekstraktının antioksidan ve sitotoksik özelliklerinin incelenmesi. *GÜFBED/GUSTIJ*, 7(1), 41-50.
- Turan, I., Demir, S., Aliyazicioglu, R., Kilinc, K., Ozer Yaman, S., Akbulut Cakiroglu, K., Kanbolat, S., Ayazoglu Demir, E., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y., & Deger, O. (2019). Dimethyl sulfoxide extract of *Dianthus carmelitarum* induces S phase arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 71(7), 1181-1188. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1598563>
- Varadhachary, G. R., Tamm, E. P., Abbruzzese, J. L., Xiong, H. Q., Crane, C. H., Wang, H., Lee, J. E., Pisters, P. W. T., Evans, D. B., & Wolff, R. A. (2006). Borderline resectable pancreatic cancer: Definitions, management, and role of preoperative therapy. *Annals of Surgical Oncology*, 13(8), 1035-1046. <https://doi.org/10.1245/ASO.2006.08.011>
- Vet, Y., & Derg, F. (2008). Apoptosis. *C. 19, Sayı 1*.
- Wong, M. C. S., Jiang, J. Y., Liang, M., Fang, Y., Yeung, M. S., & Sung, J. J. Y. (2017). Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Scientific Reports*, 7(1) <https://doi.org/10.1038/S41598-017-02997-2>
- Wuest, M., Perreault, A., Richter, S., Knight, J. C., & Wuest, F. (2019a). Targeting phosphatidylserine for radionuclide-based molecular imaging of apoptosis. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 24(3-4), 221-244 <https://doi.org/10.1007/S10495-019-01523-1>
- Wuest, M., Perreault, A., Richter, S., Knight, J. C., & Wuest, F. (2019b). Targeting phosphatidylserine for radionuclide-based molecular imaging of apoptosis. *Apoptosis*, 24(3-4), 221-244. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01523-1>

Yoshida, E., Kimura, Y., Kyuno, T., Kawagishi, R., Sato, K., Kono, T., Chiba, T., Kimura, T., Yonezawa, H., Funato, O., Kobayashi, M., Murakami, K., Takagane, A., & Takemasa, I. (2022). Treatment strategy for pancreatic head cancer with celiac axis stenosis in pancreaticoduodenectomy: A case report and review of literature. *World Journal of Gastroenterology*, 28(8), 868. <https://doi.org/10.3748/WJG.V28.I8.868>

Yu, J. O., Liao, Z. X., Lei, J. C., & Hu, X. M. (2007). Antioxidant and cytotoxic activities of various fractions of ethanol extract of *Dianthus superbus*. *Food Chemistry*, 104(3), 1215-1219. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.01.039>