

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS SENSU STRICTO KAYNAKLI HİDATİK KİST SIVISI UYGULAMASININ CACO-2 HÜCRE HATTINDA EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ VE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ

İpek BAYSAL, Serra ÖRSTEN

İ.Baysal:0000-0002-9607-4199, S.Örsten:0000- 0002-9216-5413

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, ANKARA

ÖZ

Kistik ekinokokkoz (KE), Echinococcus granulosus sensu lato'nun larva formunun neden olduğu zoonotik bir enfeksiyondur. Yapılan çalışmalar E. granulosus enfeksiyonu ile kanser arasında doğrudan ve/veya dolaylı bir ilişki olduğu öne sürmüştür; ancak, elde edilen sonuçlar farklı hücre kültürü ve/veya hayvan modellerinde hem anti-kanserojen hem de kanserojen etkisi olabileceğini göstermiştir. İnsan kolorektal adenokarsinom (Caco-2) hücrelerine etkisi daha önce değerlendirilmemiştir. Bu çalışmanın amacı, hidatik kist sıvısı uygulamasının bazı apoptotik genlerin (BCL-2, p53 ve BAX) ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) genlerinin (e-kaderin ve vimentin) ekspresyonu ve hücre proliferasyonu üzerine etkisini değerlendirerek Caco-2 hücre hattında olası anti-kanserojen veya kanserojen etkisini moleküler düzeyde aydınlatmaktır. Hidatik kist sıvısı uygulamasının sonrasında hücre proliferasyonu, apoptotik genler ve EMT gen ekspresyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için hücre proliferasyon analizi (XTT ile) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yapılmıştır. Uygulama sonrasında uygulama dozu ile orantılı olarak hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. BAX ve p53 gen ifadelerinde doza bağlı azalma ve BCL-2 gen ifadesinde artış tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra hücre kültüründe EMT gözlenmiş ve e-kaderin (CDH1) ve vimentin ekspresyonları ile moleküler düzeyde doğrulanmıştır. Bu çalışma ile hidatik kist sıvısının, Caco-2 hücre hattına uygulanması hücre proliferasyonunu doğrudan arttırdığı ve Caco-2 hücre hattının apoptoza karşı çok daha dirençli ve metastatik hale gelmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, ilk kez Caco-2 hücre hattından apoptotik yolakta hidatik kist sıvısının olası mekanizmasına ışık tutmaktadır.

Anahtar kelimeler: apoptoz, Echinococcus granulosus, epitelyal-mezenkimal geçiş, kanser, kist hidatik sıvısı

ABSTRACT

The Effect of Echinococcus granulosus sensu stricto-Derived Hydatid Cyst Fluid Application on Epithelial-Mesenchymal Transition and Apoptosis on Caco-2 Cell Line

Cystic echinococcosis (CE) is a zoonotic infection caused by the larval form of Echinococcus granulosus sensu lato. Studies suggested a direct and/or indirect relationship between E. granulosus infection and cancer; however, results showed both anti-carcinogenic and carcinogenic effects in different cell culture and/or animal models. Its effect on human colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells has not been previously evaluated. The aim of this study was elucidate the molecular mechanism underlying the possible anti-carcinogenic or carcinogenic effect of hydatid cyst fluid on Caco-2 cell line at the molecular level via evaluating the effect of its application on cell proliferation and expression of some apoptotic genes (BCL-2, p53 and BAX) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) genes (e-cadherin and vimentin). Cell proliferation analysis (using XTT) and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed to evaluate the effect of hydatid cyst fluid on cell proliferation and apoptotic and EMT gene expression, respectively. After the application, a statistically significant increase in cell proliferation was detected correlated with the application dose. A dose-dependent decrease in BAX and p53 gene expressions and an increase in BCL-2 gene expression were determined. EMT is also observed and confirmed via e-cadherin (CDH1) and vimentin expression levels. With this study, the application of hydatid cyst fluid to Caco-2 cells directly increases cell proliferation. Thus, it caused the Caco-2 cell line to become much more resistant to apoptosis and prone to metastasis. This study sheds light on the possible mechanism of hydatid cyst fluid in the apoptotic pathway from the Caco-2 cell line for the first time.

Keywords: apoptosis, cancer, Echinococcus granulosus, epithelial-mesenchymal transition, hydatid cyst fluid

İletişim adresi: Serra Örsten. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Adnan Saygun Caddesi, D-Blokları 3. Kat, ANKARA

Tel: (0312) 305 1433

e-posta: serraorsten@gmail.com

Received/Geliş: 04.01.2022 Accepted/Kabul: 27.02.2022 Published Online/Online Yayın: 29.04.2022

Atıf/Cite as: Baysal İ, Örsten S. Echinococcus granulosus sensu stricto kaynaklı hidatik kist sıvısı uygulamasının Caco-2 hücre hattında epitelyal-mezenkimal geçiş ve apoptoz üzerine etkisi. ANKEM Derg. 2022;36(1):1-8.

GİRİŞ

Patojen mikroorganizmaların neden olduğu inflamasyonun genellikle kanser gelişimini desteklediği kabul edilmekte olup, dünya genelindeki kanser vakalarının yaklaşık %15.6'sının patogeneğinde yer aldıkları tahmin edilmektedir^(18,22,25). Özellikle helmintlerin, konakta kanser gelişimi ile ilişkili etkileri araştırılmaktadır. Bu bağlamda, *Schistosoma japonicum* karaciğer ve kolorektal kanser için bir risk faktörü olarak kabul edilirken, *Clonorchis sinensis* ve *Opisthorchis viverrini* kolanjiokarsinom etkeni olarak kabul edilmektedir⁽¹⁰⁾. Bununla birlikte, *Echinococcus granulosus sensu lato*'nun da içerisinde olduğu belirli patojen türlerinin, kanser gelişimini indüklemek yerine azaltabileceğine veya tümör gerilemesini kolaylaştırabileceğine dair kanıtlar da bulunmaktadır⁽¹⁸⁾.

Kistik ekinokokkoz (KE), *E. granulosus s.l.*'nin larva formunun neden olduğu zoonotik karakterli bir enfeksiyondur⁽⁹⁾. KE dünya genelinde geniş bir dağılım göstermekte olup, özellikle Akdeniz ülkeleri, Asya ve Güney Amerika'da daha yüksek sıklıkla görülmektedir^(8,27,28). Enfeksiyonun kırsal alanda köpekler ile yakın temasta yaşayan hayvancılık ve tarım aktiviteleri ile uğraşan kişileri daha çok etkilediği bilinmektedir⁽⁸⁾. Hastalık her zaman asemptomatik olarak başlamakta ve genellikle sessiz ilerlemektedir⁽²⁰⁾. Gelişen kistlerin komşu doku üzerindeki baskıyı arttırmaları veya diğer patolojiler sonucu enfeksiyon semptomatik hale geçtiğinde klinik belirtiler özgül olmayıp, genellikle tesadüfen tanı konmaktadır⁽²⁶⁾. Hidatik kist, içi sıvı dolu bir küre şeklinde, içte germinal tabaka ve dışta laminar tabakadan oluşmaktadır. Kist sıvısı, genellikle berrak, renksiz ve kokusuz olup, antijenik bir yapı göstermektedir. Fertil kistlerde sıvı içerisinde protoskoleks yapısı görülürken, dejenere kistlerde kist sıvısında çok sayıda serbest kanca görülebilmektedir⁽¹⁾.

E. granulosus ile kanser arasındaki ilişki pek çok bağımsız grup tarafından araştırılmış ve çalışmaların çoğunda anti-kanserojen bir etkisi olduğu bildirilmiştir⁽²⁴⁾. Retrospektif bir çalışmada, KE hastalarında malign tümör gelişimi açısından bir farklılık olup olmadığı araştırılmış ve malign tümör gelişiminin bu hasta grubunda anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır⁽²⁾. Buna karşın, bazı çalışmalarda, KE'nin konak immün yanıtı ile ilişkili olarak kanserojen etkilere sahip olabileceği öne sürülmüştür. Öte yandan, çeşitli kanser türleri ile protoskoleks ve *E. granulosus*'un erişkin formları arasındaki antijenik benzerlikler, kanserle ilişkili müsin tipi O-glikosillenmiş antijenler için rapor edilmiş olup, bunların çeşitli kanserler ve parazit arasında immünolojik çapraz reaksiyonların indüklenmesinde rol oynayabilecekleri düşünülmüştür⁽³⁾. *E. granulosus*'un doğrudan veya dolaylı anti-kanser etkilerinin olabileceği ve hidatik kist sıvısının (HKS) kansere karşı immünoterapötik bir ajan olarak kullanılabilirliği öne sürülmüştür⁽²⁴⁾. Sonuç olarak, *E. granulosus*'un kanser ile ilişkisi açısından bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bu çalışmada, insan kolorektal adenokarsinom hücreleri (Caco-2) üzerinde HKS uygulamasının olası kanserojen veya anti-kanserojen (proliferasyon, apoptoz (BCL-2, p53 ve BAX)) etkisinin *in vitro* olarak araştırılması ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ek olarak, Caco-2 hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT), HKS uygulamasından sonra E-kaderin (CDH1) ve vimentin ekspresyonları kullanılarak değerlendirilmiştir. Temel olarak, bu çalışma, HKS'nin Caco-2 hücreleri üzerindeki olası kanserojen etkisini moleküler düzeyde aydınlatmayı amaçlamaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü Çalışması

Çalışmada Caco-2 (insan kolorektal adenokarsinom) hücreleri kullanılmıştır. Caco-2 hücreleri antibiyotiklerle desteklenen (100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin), %10 oranında FBS içeren DMEM/F12 besiyeri (tam besiyeri) ile süspansiyon edilerek, 37°C'de 5 % CO₂ içeren nemli atmosferde inkübe edilmiştir.

Hidatik Kist Sıvısının Mikrobiyolojik İncelenmesi

Bu çalışmada, mezbahada yapılan rutin hayvan kesimleri sonucu, hidatik kisti olduğu belirlenen bir sığır karaciğerinden aseptik koşullarda elde edilen kist sıvısı kullanılmıştır. Protoskoleks varlığını incelemek amacıyla doğrudan mikroskopik inceleme yapılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın talimatlarına uygun olarak Thermo Blood and Tissue DNA Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmıştır. Elde edilen DNA, mitokondriyal bir gen olan sitokrom oksidaz 1 (mt-CO1) geninin ~875 baz çifti bölgesini hedefleyen primer seti kullanılarak amplifiye edilmiştir⁽¹⁶⁾.

Hücre Proliferasyon Deneyi

HKS'nın, Caco-2 hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek için 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfonil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) deneyi yapılmıştır. Doksan altı kuyucuklu hücre kültürü plaklarının her bir kuyucuğuna yaklaşık 5×10^4 hücre ekilmiştir. Ekili hücreler, HKS'nın farklı sulandırılmaları (1:5, 1:3, 1:2) (h/h) ile muamele edildikten sonra, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyuya 50 µL XTT solüsyonu eklenmiş ve hücreler tekrar 37°C'de 2 saat inkübe edilmiş, sonrasında plaklar, mikropalak okuyucuda 450 nm'de okunmuştur. Sonuçlar kontrol grup değerleri kullanılarak standardize edilmiştir. XTT deneyi en az üç kez tekrarlanmıştır.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Caco-2 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına yaklaşık 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrasında Caco-2 hücrelerine HKS'nın farklı sulandırılmaları (1:5, 1:3, 1:2) (h/h) muamele edilmiş ve 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben, hücrelerden RNA ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda total RNA izole edilmiştir. Komplementer DNA (cDNA) 1 µg total RNA'dan ters transkriptaz kullanılarak sentezlenmiştir. Örneklerde kontaminasyon olmadığı negatif kontroller kullanılarak doğrulanmıştır. RT-PCR analizi 96 kuyucuklu plaklar ve SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak Viia 7 Real-Time PCR (Applied Biosystems) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonu (25 µl) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda 1:5 oranında seyreltilmiş; 5 µl örnek varlığında üçlü kontrol sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Her deneyde araştırılan genin değeri, iç kontrol geninin (housekeeping gene; GAPDH) değerine oranlanarak normalize edilmiştir. Kullanılan ileri ve geri yönlü primer çiftlerinin tamamı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışma kapsamında kullanılan primer dizileri.

Primerler	Diziler
GAPDH	F: 5'-ATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3' R: 5'-GCATCGCCCCACTTGATTTT-3'
BAX	F: 5'- CCGAGAGGTCTTTTTCCGAG-3' R: 5'- CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'
BCL-2	F: 5'- GGTGGGGTCATGTGTGTGG-3' R: 5'- CGGTCAGTACTCAGTCATCC-3'
P53	F: 5'- CAGCACATGACGGAGTTGT-3' R: 5'- TCATCCAAATACTCCACACGC-3'
E-kaderin	F:5'-TGGGCCAGGAAATCACATCCTACA-3' R:5'-TTGGCAGTGTCTCTCCAAATCCGA-3'
Vimentin	F:5'-CCAAGACACTATTGGCCGCCTGC-3' R:5'-GCAGAGAAATCCTGCTCTCCTCGC-3'

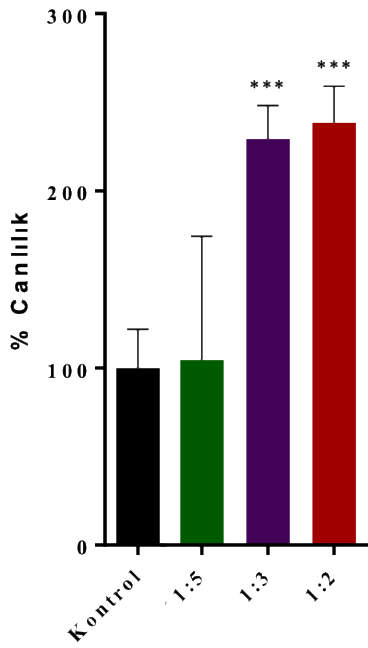
BULGULAR

Hidatik Kist Sıvısı İncelemesi

Mikroskobik inceleme sonucu, kist sıvısında protoskoleks varlığı tespit edilmiştir. Yapılan DNA dizi analizi sonucu, BLAST algoritmasına göre *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3 genotipleri) olarak belirlenmiştir.

Hücre Proliferasyon Deneyi (XTT)

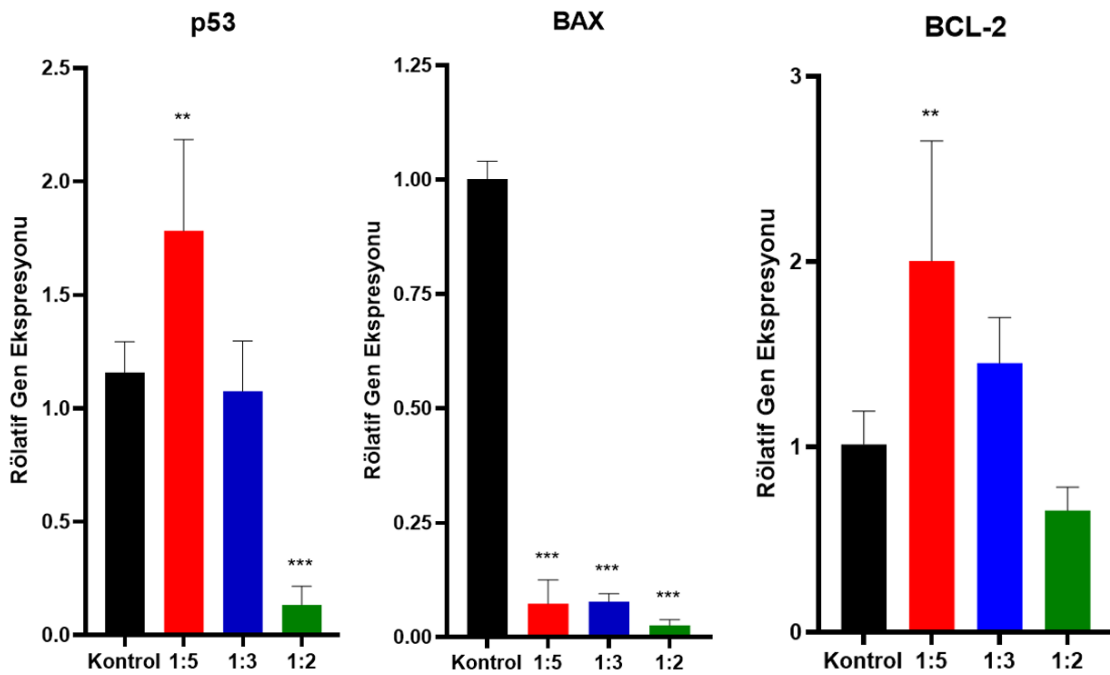
Çeşitli sulandırılmalarında HKS uygulanan Caco-2 hücreleri için XTT sonuçları Şekil 1'de verilmiştir. Sonuç olarak, *in vitro* HKS uygulamasının Caco-2 hücreleri üzerinde toksik etkisinin bulunmadığı tespit edilmiş. Buna ek olarak, HKS'nın 1:3 ve 1:2 oranında uygulanmasının hücre proliferasyonunu önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür (**P<0.001, kontrole karşı).



Şekil 1. Caco-2 hücrelerine hidatik kist sıvısı uygulaması sonrası XTT ile elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları (***) $P < 0.001$, kontrole karşı).

Apoptotik genler için RT-PCR

HKS uygulanan Caco-2 hücreleri, apoptotik yolları kontrol eden *BAX*, *BCL-2* ve *p53* gen ekspresyonları açısından değerlendirilmiştir. Rölatif gen ekspresyon seviyeleri Şekil 2'de verilmiştir.

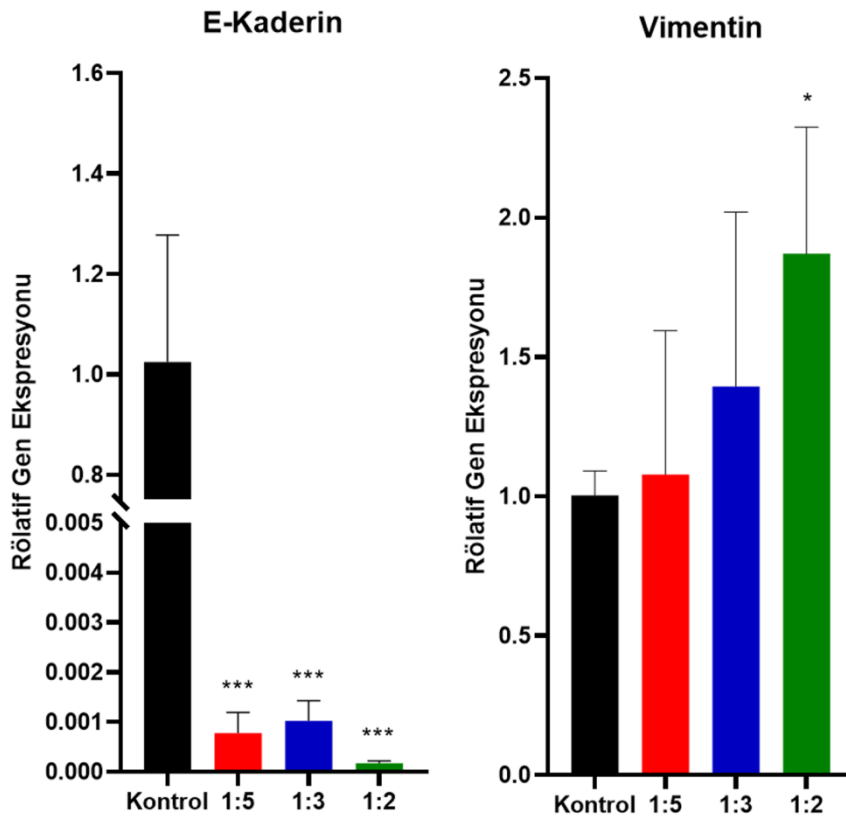


Şekil 2. Caco-2 hücrelerine hidatik kist sıvısı uygulaması sonrası rölatif *BAX*, *BCL-2*, *p53* gen ekspresyon seviyeleri (** $P < 0.01$, ***) $P < 0.001$; kontrole karşı).

Sonuçlara göre HKS 1:5 oranı uygulandığında *p53* gen ekspresyonu artış göstermiştir ($P<0.01$). Ancak; HKS hacim oranı arttırıldığında, 1:3 oranında *p53* ekspresyonu kontrol seviyesine geri dönmüş ve 1:2 oranında gen ekspresyonu önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir ($P<0.001$). *BAX* ve *BCL-2* ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, uygulamalardan sonra (1:5, 1:3 ve 1:2) *BAX* ekspresyon seviyeleri önemli azalmış ($P<0.001$) ve 1:5 oranında uygulamadan sonra *BCL-2* seviyelerinde artış gözlenmiş ($P<0.01$), 1:3 ve 1:2 uygulama için ise ekspresyon değişmeden kalmıştır. Bu doğrultuda, HKS uygulaması ile *BAX/BCL-2* oranı azalmıştır.

EMT Genleri için RT-PCR

HKS uygulaması yapılmış Caco-2 hücreleri, EMT'yi kontrol eden e-kaderin ve vimentin genlerinin ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir. Rölatif gen ekspresyon seviyeleri Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Caco-2 hücrelerine hidatik kist sıvısı uygulaması sonrası rölatif e-kaderin ve vimentin gen ekspresyon seviyeleri (* $P<0.05$, *** $P<0.001$; kontrole karşı).

RT-PCR sonuçlarına göre HKS uygulamasından sonra (1:5, 1:3 ve 1:2) hacim oranından bağımsız olarak e-kaderin seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır ($P<0.001$). 1:5 ve 1:3 oranlı uygulamalarda vimentin ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ancak 1:2 uygulama sonucunda istatistiksel olarak anlamlı olarak vimentin ekspresyonunda 2 kat artış görülmüştür ($P<0.05$).

TARTIŞMA

Günümüzde kronik enfeksiyonlar ve kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi bildiren veriler giderek artmaya devam etmektedir. *E. granulosus* enfeksiyonu ile kanser arasındaki ilişki, konuyla ilgili çelişkili raporlar nedeniyle belirsizliğini korumaktadır. Retrospektif bir çalışmaya göre, KE Türkiye'de yüksek insidans ile rastlanan bir parazitik enfeksiyon olmasına karşın solid tümürlü hastalarda çok düşük oranda bildirilmiştir⁽²⁾.

Buna karşılık, Kıbrıs'tan retrospektif bir analizde tam tersi bir sonuç rapor edilmiştir⁽¹⁹⁾. Öte yandan, farklı gruplar tarafından yapılan *in vitro* hücre kültürü ve *in vivo* hayvan çalışmalarında çelişkili sonuçlar elde edilmiş, bu nedenle *E. granulosus*'un kanserojen veya anti-kanserojen etkisi konusunda bir fikir birliği sağlanamamıştır. Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesini ve hücre sayısını değerlendiren bir çalışmada, protoskolekslerin *in vitro* olarak WEHI-164 fibrosarkom hücrelerinin ölümünü indükleyebildiği gösterilmiştir⁽³⁰⁾. Bununla birlikte, protoskolekslerin hücre ölümüne neden olduğu mekanizma ve LDH aktivitesinde gözlenen değişikliğin olası mekanizması araştırılmamıştır. Ayrıca, HKS uygulamasının fare meme kanseri (4T1) hücre hattında apoptoz indüksiyonu üzerine çalışılmış ve hidatik kist antijenleri, özellikle 78 kDa ve glikoprotein fraksiyonları, 4T1 hücrelerinde apoptozu indüklediği bildirilmiştir⁽⁶⁾. Daha sonra aynı çalışma grubu, kist hidatik sıvısının 78 kDa fraksiyonunun, 4T1 meme tümörlerine karşı bağışıklama için en etkili fraksiyon olduğunu belirlemişlerdir⁽⁷⁾. Öte yandan, yakın tarihli bir çalışma, *E. granulosus* protoskolekslerinin hepatoselüler kanser hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu destekleyebileceğini bildirilmiştir⁽²⁹⁾. Birçok rapor, kanserler ve parazitler arasında kanser oluşumuyla yakından ilişkili bazı ortak özellikler ve antijenler olduğunu göstermiştir^(10,15,18). Ayrıca, önceki çalışmalar KE ve malign tümörler arasında bir bağlantı olabileceğini gösterilmiştir^(4,5).

Bu çalışmada, Caco-2 hücrelerine HKS uygulaması sonrası, apoptoz mekanizmasının düzenleyicilerinden *p53*, *BAX* ve *BCL-2* gen ekspresyonları değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, 1:5 oranında HKS uygulandığında *p53* gen ekspresyonlarında artış olurken ($P<0.001$); HKS hacim oranı arttığında (1:3) kontrol düzeyine dönmüştür. HKS oranı 1:2 ile *p53* gen ekspresyonu önemli ölçüde azalmıştır ($P<0.001$). *p53*, tümör baskılayıcı proteindir ve stresli koşullar altında, apoptozu ve DNA onarımını teşvik ederek hücre çoğalmasını sıkı bir şekilde düzenleyip kontrol eder⁽¹¹⁾. Dolayısıyla, bu sonuç, XTT (Şekil 1) sonucuyla tutarlı olarak, *p53*'ün azalmasıyla ilişkili hücre proliferasyonunda bir artış ve apoptozda azalmayı göstermektedir. *BAX* ekspresyon seviyeleri uygulamalardan (HKS 1:5, 1:3 ve 1:2) sonra önemli ölçüde azalmıştır ($P<0,001$). HKS oranı 1:5 ile uygulandığında anlamlı artış gösterirken ($P<0.01$); 1:3 ve 1:2 oranlarında kontrole göre istatistiksel olarak değişiklik göstermemişlerdir. Sonuç olarak, *BAX/BCL-2* oranının HKS uygulaması ile azaldığı tespit edilmiştir. *BCL-2* ailesi hücre canlılığını desteklemekte (örn: *BCL-2*, *BCL-HL* ve *MCL-1*) ve hücre ölümünü kontrol eden (örn: *BAX*, *BAK* ve *BCL-XS*) üyelerden oluşmaktadır. *p53*, *BCL-2* ekspresyonunda bir azalmaya ve *BAX* ekspresyonunda bir artışa neden olarak hücrelerin apoptozu duyarlılığını kontrol edebilmektedir. *BAX* ve *BCL-2*, apoptozun en iyi bilinen düzenleyicileri olup, bu proteinlerin apoptozun kontrolünde açık antagonistik etkisi, *BAX/BCL-2* proteinlerinin hücre içi oranı, apoptoz duyarlılığının hücrel bir belirteci olarak tanımlanmaktadır^(13,14). Bu bağlamda, apoptotik bir sinyale yanıt veren bir hücre, yüksek bir *BAX/BCL-2* oranına sahip olurken, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon ve hipoksi gibi çok çeşitli hücre ölümü uyaranlarına daha duyarlı olacaktır^(21,23). Bu nedenle, *BAX/BCL-2* oranı, tümör ilerlemesini ve agresifliğini etkileyen bir parametre olarak değerlendirilmektedir. Ek olarak, bir epitel hücrenin mezenkimal hücreye dönüşmesi, morfoloji ve migrasyon özelliklerinde değişiklikler oluşmasına neden olmaktadır. EMT için e-kaderin ve vimentin en yaygın kullanılan moleküler belirteçler arasında sayılmaktadır^(12,31). Caco-2 hücre hatları, olgun bağırsak hücrelerine farklılaşma yetenekleri nedeniyle bilinmekte ve farklılaşma potansiyelleri nedeniyle *in vitro* EMT çalışmaları için sıklıkla kullanılan hücrelerdir⁽¹⁷⁾. Birçok tümör hücresi EMT sergilemektedir. Özellikle bu geçişlerde mezenkimal formdaki tümör hücreleri, epitelyal forma göre daha dirençli, invaziv ve daha kötü prognoza sahiptir. Tümörlerin epitel hücreleri, kanser gelişimi sırasında metastaza katkıda bulunan istilacı özellikler kazanmaktadır⁽¹²⁾. Bu nedenle, EMT sürecini ve düzenlenmesini araştırmak, kanser gelişiminin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacaktır. HKS uygulamasından sonra uygulamanın hacim oranından bağımsız olarak e-kaderin seviyeleri önemli ölçüde düşüş göstermiştir ($P<0.001$). Vimentin ekspresyon seviyeleri ise 1:5 ve 1:3 HKS oranlı uygulamada istatistiksel olarak değişmeden kalırken, 1:2 oranlı uygulama sonrasında vimentin ekspresyonunun önemli ölçüde (2 kat) arttığı gözlenmiştir ($P<0.05$). Böylece, HKS uygulaması sonrası, Caco-2 hücrelerinde EMT geçişi olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında ilk defa Caco-2 hücre hattına HKS uygulaması sonrasında XTT sonuçları ile tutarlı olarak, *p53*'ün azalmasıyla ilişkili hücre proliferasyonunda bir artış ve apoptozda bir azalma olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca *BAX/BCL-2* oranının azalması, uygulama sonrasında Caco-2 hücrelerinin apoptozu dirençli hale geldiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, Caco-2 hücrelerinde görülen EMT dönüşümü ile de desteklenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, Caco-2 hücrelerine HKS uygulamasının hücre proliferasyonunu arttırdığını ve apoptozu karşı direnci değiştirdiğini ve EMT ile sonuçlanarak hücrelerin daha istilacı, agresif ve kötü prognoza sahip olmasına neden olduğunu göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Mezbahadan toplanan hidatik kist sıvısının sağlanması konusunda desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Salih Maçın ve ekibine teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışma kapsamında ticari olarak elde edilen hücre hatları kullanılarak hücre kültürü ve mezbahadan elde edilen hidatik kist sıvısı kullanılmış olması nedeniyle çalışmamız için etik kurul onayı gerekmemektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Proje için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval is not required for our study, since commercially obtained cell culture lines and hydatid cyst fluid obtained from slaughterhouse were used by during the study.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial support: No financial support was received for the project.

KAYNAKLAR

1. Agudelo Higueta NI, Brunetti E, McCloskey C. Cystic echinococcosis. J Clin Microbiol. 2016;54(3):518-23.
2. Akgül H, Tez M, Unal AE, Keşkek M, Sayek I, Özçelik T. Echinococcus against cancer: why not? Cancer. 2003;98(9):1999-2000.
3. Alvarez Errico D, Medeiros A, Míguez M, et al. O-glycosylation in Echinococcus granulosus: identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. Exp Parasitol. 2001;98(2):100-9.
4. Atayde VD, Jasiulionis MG, Cortez M, Yoshida N. A recombinant protein based on Trypanosoma cruzi surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. Melanoma Res. 2008;18(3):172-83.
5. Berriel E, Russo S, Monin L, et al. Antitumor activity of human hydatid cyst fluid in a murine model of colon cancer. ScientificWorldJournal. 2013;2013:230176.
6. Daneshpour S, Kefayat AH, Mofid MR, Rostami Rad S, Yousofi Darani H. Effect of hydatid cyst fluid antigens on induction of apoptosis on breast cancer cells. Adv Biomed Res. 2019;8:27.
7. Daneshpour S, Rostamirad S, Kefayat A, Mofid M, Safavi A, Darani HY. Identifying the most effective hydatid cyst fluid fraction for anticancer vaccination of 4T1 breast tumor-bearing mice. Int J Prev Med. 2019;10:143.
8. Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis. Adv Parasitol. 2017;95:315-493.
9. Eckert J, Gemmell MA, Meslin F-X, Pawlowski ZS(ed.), WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health, Paris, France (2001).
10. Guan W, Zhang X, Wang X, Lu S, Yin J, Zhang J. Employing parasite against cancer: a lesson from the canine tapeworm Echinococcus granulosus. Front Pharmacol. 2019;10:1137.
11. Kanapathipillai M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer. Cancers (Basel). 2018;10(6).
12. Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. Cell. 2004;118(3):277-9.
13. Khodapasand E, Jafarzadeh N, Farrokhi F, Kamalidehghan B, Houshmand M. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? Iran Biomed J. 2015;19(2):69-75.
14. Kosmider B, Wojcik I, Osiecka R, et al. Enhanced P53 and BAX gene expression and apoptosis in A549 cells by cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. Invest New Drugs. 2005;23(4):287-97.
15. Li H, Song T, Shao Y, Wen H. Cystic echinococcosis accompanied by hepatocellular carcinoma in a female herdsman. Int J Clin Exp Med. 2015;8(2):2985-8.
16. Nakao M, Sako Y, Yokoyama N, Fukunaga M, Ito A. Mitochondrial genetic code in cestodes. Mol Biochem Parasitol. 2000;111(2):415-24.
17. Noguti J, Barbisan LF, Cesar A, Dias Seabra C, Choueri RB, Ribeiro DA. Review: In vivo models for measuring placental glutathione-S-transferase (GST-P 7-7) levels: a suitable biomarker for understanding cancer pathogenesis. In Vivo. 2012;26(4):647-50.
18. Oikonomopoulou K, Brinc D, Kyriacou K, Diamandis EP. Infection and cancer: reevaluation of the hygiene hypothesis. Clin Cancer Res. 2013;19(11):2834-41.
19. Oikonomopoulou K, Yu H, Wang Z, et al. Association between Echinococcus granulosus infection and cancer risk - a pilot study in Cyprus. Clin Chem Lab Med. 2016;54(12):1955-61.

20. Pawlowski Z, Eckert J, Vuitton DA, et al., editors. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment 2001.
21. Perlman H, Zhang X, Chen MW, Walsh K, Buttyan R. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(1):48-54.
22. Pisani P, Parkin DM, Muñoz N, Ferlay J. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6(6):387-400.
23. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2001;117(2):333-40.
24. Ranasinghe SL, McManus DP. Echinococcus granulosus: Cure for cancer revisited. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:60.
25. Rook GA, Dalgleish A. Infection, immunoregulation, and cancer. *Immunol Rev.* 2011;240(1):141-59.
26. Sayek I. Kist Hidatik Hastalığı: Klinik Yönleri. Altıntaş N TR, Çoker A., editor. İzmir: Hidatidoloji Derneği Yayınları; (2004).
27. Tamarozzi F, Akhan O, Cretu CM, et al. Prevalence of abdominal cystic echinococcosis in rural Bulgaria, Romania, and Turkey: a cross-sectional, ultrasound-based, population study from the HERACLES project. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(7):769-78.
28. Topluoglu S. Current situation report of cystic echinococcosis in Turkey. *Turk Hij Den Biyol Derg.* 2020;77(70):1-52.
29. Yasen A, Wang M, Ran B, et al. Echinococcus granulosus protoscoleces promotes proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Cytotechnology.* 2021;73(1):13-22.
30. Yousofi Darani H, Soozangar N, Khorami S, Taji F, Yousofi M, Shirzad H. Hydatid cyst protoscolices induce cell death in WEHI-164 fibrosarcoma cells and inhibit the proliferation of baby hamster kidney fibroblasts in vitro. *J Parasitol Res.* 2012;2012:304183.
31. Zhao XJ, Li H, Chen H, et al. Expression of e-cadherin and beta-catenin in human esophageal squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. *World J Gastroenterol.* 2003;9(2):225-32.