



KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREAS KANSERİ KÖK HÜCRESİ VE EPİTELYAL-
MEZENKİMAL TRANSİSYON ARASINDAKİ İLİŞKİDE
FENOLİK BESİN BİLEŞENLERİNDEN KERSETİN VE
RESVERATROLÜN POTANSİYEL ETKİLERİ**

Uzman Diyetisyen MUSTAFA HOCA
DOKTORA TEZİ

BESLENME VE DİYETETİK

DANIŞMAN
Prof. Dr. SEVİNÇ YÜCECAN

EŞ DANIŞMAN
Prof. Dr. SEDA VATANSEVER

2019-LEFKOŞA

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Uzm. Dyt. Mustafa Hoca

TEŞEKKÜR

Tez sürecinin her aşamasındaki yardımları ve destekleri için, pozitif enerjisiyle beni motive eden ve akademik olarak örnek aldığım danışmanım sayın Prof. Dr. Sevinç Yücecan'a,

Tez çalışması boyunca beni daima destekleyen, tecrübeleriyle katkılarını koyan ve Manisa'ya gitmeme olanak sağlayan eş danışmanım sayın Prof. Dr. Seda Vatansever'e,

Çalışmanın her aşamasında bana yol gösteren, emek vererek deneyimlerini paylaştan, hem laboratuvar hem de laboratuvar dışındaki destekleri ve katkılarından dolayı sayın Doç. Dr. Eda Becer'e,

Çalışmanın laboratuvar aşamasının gerçekleştirilmesinde, Yakın Doğu Üniversitesi (YDÜ) Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi (DESAM) ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi (MCBÜ) Hücre Kültürü Laboratuvarları sorumlularına ve çalışanlarına,

Yakın Doğu Üniversitesi DESAM Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndaki destekleri ve yardımları için Nadir Kıyak'a ve Manisa CBÜ Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndaki destekleri ve yardımları için Uzm. Hilal Kabadayı'ya,

Doktora boyunca yapmış olduğu değerli katkı ve paylaşımlarından dolayı arkadaşım Uzm. Dyt. Gülşen Özduran'a ve doktora süresince destekleri ve anlayışları için oda arkadaşlarım Uzm. Dyt. Müjgan Kuşu'ye ve Uzm. Dyt. Fatma Hacet'e ve bölümdeki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Meryem Hoca'ya, babam Taşkın Hoca'ya ve abim Mürsel Hoca'ya ve her koşulda yanımda olarak anlayış gösterip destek veren ve her türlü duyguyu paylaştığım yeğenim Mustafa İpekçioğlu'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Uzm. Dyt. Mustafa Hoca

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI	
BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA ve SİMGELER	v
ŞEKİLLER	ix
RESİMLER	x
TABLolar	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Pankreas Kanseri ve Kök Hücre Özellikleri	8
2.2. Resveratrol ve Pankreas Kanseri Kök Hücre	11
2.3. Kersetin ve Pankreas Kanseri Kök Hücre	14
2.4. Pankreas Kanseri Kök Hücre ve Epitelyal-Mezenkimal Transisyon	17
2.5. Resveratrol ve Epitelyal-Mezenkimal Transisyon	20
2.6. Kersetin ve Epitelyal-Mezenkimal Transisyon	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Reaktifler ve Hücre Uygulamaları	23
3.2. Hücre Hattı ve Hücre Kültürü	23
3.3. MiniMACS Sistemi ile Kanseri Kök Hücre İzolasyonu	23
3.4. Hücre Canlılığı ve Hücre Büyümesi Analizi	24
3.5. İmmünositokimya	25
3.6. Araştırma Türü ve Araştırma Yeri	26
3.7. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	27

4.1. CD133+ ve CD133- PANC-1 Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Boyanması	27
4.2. Hücre Canlılığı ve Sitotoksitesi	28
4.3. Hücre Morfolojisi	33
4.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	46
6. KAYNAKLAR	59
EKLER	69
Ek-1: The Effect of Resveratrol and Quercetin on Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem Cell (Makale)	69
Ek-2: The Effect of Resveratrol on Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem Cell (Sözel Bildiri)	97
Ek-3: Kersetinin Pankreatik Kanser Kök Hücresinde Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Üzerine Etkisi (Sözel Bildiri)	99
Ek-4: Özgeçmiş	101

KISALTMA ve SİMGELER

‰: Yüzde

-: Negatif

~: Yaklaşık

+: Pozitif

<: Küçüktür işareti

>: Büyüktür işareti

±: Artı-eksi işareti

≤: Küçük eşittir işareti

≥: Büyük eşittir işareti

°C: Santigrat

µM: Mikromolar

ACTA-2: Aktin alfa-2/alfa-düz kas aktin

Akt: Protein kinaz B

ALDH: Aldehit dehidrogenaz

AMPK: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz

ark.: Arkadaşları

Aβ: Amiloid-beta

BEBİS: Beslenme Bilgi Sistemi

C: Karbon

Ca⁺²: Kalsiyum

CAFs: Kanserle-ilişkili fibroblastlar

CO₂: Karbondioksit

C-terminal ucu: Karboksi-terminal ucu

DAB: Diaminobenzidin

DESAM: Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

EGCG: Epigallokateşin gallat

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT: Epitelyal-mezenkimal transisyon
ESA: Epitelyal spesifik antijen
FBS: Fetal sığır serumu
g: Gram
G₁ fazı: Geçiş fazı 1
H: Hidrojen
H₂O₂: Hidrojen peroksit
Hh: Hedgehog
HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa
HRP: Horseradish peroksidaz
H-SKOR: Histolojik-skor
IC₅₀: Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
ICAM-1: Hücreler arası adezyon molekülü-1
IFN- γ : İnterferon-gama
IL-1: İnterlökin-1
IL-1 α : İnterlökin-1 alfa
IL-1 β : İnterlökin-1 beta
IL-6: İnterlökin-6
i: Yoğunluk
KKTC: Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti
L: Litre
LPS: Lipopolisakkarit
MAPK: Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
MCBÜ: Manisa Celal Bayar Üniversitesi
MET: Mezenkimal-epitelyal transisyon
mg: Miligram
MiniMACS: Manyetik Partikül Teknolojisi
miRNA: Mikro-ribonükleik asit
ml: Mililitre
MMP: Matriks metalloproteinaz
mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
n. mutasyon: Çok sayıda mutasyon
NF-κB: Nükleer faktör-kappa B
ng: Nanogram
nm: Nanometre
N-terminal ucu: Amino-terminal ucu
O: Oksijen
-OH: Hidroksil
p: Anlamlılık derecesi
p53: Tümör proteini 53
PA: Pankreas adenokarsinomu
PANC-1: İnsan pankreas kanseri hücreleri
PBS: Fosfat tamponlu tuz
PI3K: Fosfotidil inositol 3 kinaz
RNA: Ribonükleik asit
ROT: Reaktif oksijen türleri
SD: Standart sapma
Shh: Sonic hedgehog
SIRT1: Sirtuin 1
Smad: Small mothers against decapentaplegic
SPSS 18.0: Sosyal Bilimler için İstatistik Paket Programı 18.0
TGF-β: Transforme edici büyüme faktörü-beta
TGF-β1: Transforme edici büyüme faktörü-beta 1
TNF-α: Tümör nekrozis faktör-alfa
TNF-β: Tümör nekrozis faktör-beta
vb.: Ve benzeri
VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü
YDÜ: Yakın Doğu Üniversitesi
α-SMA: Alfa-düz kas aktin
µg: Mikrogram
µl: Mikrolitre
µm: Mikrometre

μmol : Mikromol

Σ : Toplam simgesi

π : Her yoğunluktaki boyanmış hücrelerin yüzdesi

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1. Stokastik model ve kanser kök hücre modeli (hiyerarşik model)	10
Şekil 2. Kanser kök hücrelerinin özellikleri	11
Şekil 3. Resveratrolün kimyasal yapısı	12
Şekil 4. Kersetinin kimyasal yapısı	14
Şekil 5. Kanser kök hücrelerine karşı anti-kanser kök hücre ajanlarının aktiviteleri	17
Şekil 6. Epitelyal-mezenkimal transisyonun genel özellikleri	19
Şekil 7. Resveratrolün anti-kanser mekanizmaları ve EMT üzerindeki etkisi	21
Şekil 8. İnsan pankreas kanseri hücrelerinde, EGF kaynaklı migrasyonu bloke etmede kersetinin etki mekanizması	22
Şekil 9. Resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde doz-yanıt sütunları ve IC ₅₀ değerleri (24 ve 48 saat)	28
Şekil 10. Resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde doz-yanıt sütunları ve IC ₅₀ değerleri (24 ve 48 saat)	29
Şekil 11. Kersetin uygulanan CD133+ hücrelerde doz-yanıt sütunları ve IC ₅₀ değerleri (24 ve 48 saat)	30
Şekil 12. Kersetin uygulanan CD133- hücrelerde doz-yanıt sütunları ve IC ₅₀ değerleri (24 ve 48 saat)	31
Şekil 13. Resveratrol uygulanan CD133+ ve CD133- hücrelerde doz-yanıt sütunları ve IC ₅₀ değerleri (24 ve 48 saat)	32
Şekil 14. Kersetin uygulanan CD133+ ve CD133- hücrelerde doz-yanıt sütunları ve IC ₅₀ değerleri (24 ve 48 saat)	33

RESİMLER

	Sayfa
Resim 1. MiniMACS ile kanser kök hücre izolasyonu	24
Resim 2. MiniMACS ile PANC-1 hücre hattından elde edilen CD133+ kontrol (A), CD133+ hücreler (B), CD133- kontrol (C) ve CD133- hücreler (D)	27
Resim 3. İverted mikroskopta görüntülenen PANC-1 CD133+ (A-C) ve CD133- (D-F) hücreleri, resveratrol uygulanması sonrası (B, E) ve kersetin uygulanması sonrası (C, F)	34
Resim 4. Standart kültür şartlarında ve 10 µM kersetin ile 48 saat kültüre edilen PANC-1 CD133+ ve CD133- hücrelerinde ACTA-2, IL-1β, N-kaderin, TNF-α ve vimentin immünoreaktiviteleri (A-T)	44
Resim 5. Standart kültür şartlarında ve 5 µM resveratrol ile 24 saat kültüre edilen PANC-1 CD133+ ve CD133- hücrelerinde ACTA-2, IL-1β, N-kaderin, TNF-α ve vimentin immünoreaktiviteleri (A-T)	45

TABLULAR

	Sayfa
Tablo 1. Bazı besinlerin resveratrol içerikleri	13
Tablo 2. Bazı besinlerin kersetin içerikleri	16
Tablo 3. 10 µM kersetin (48 saat) ve 5 µM resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerinde ACTA-2, IL-1β, N-kaderin, TNF-α ve vimentin immünoboyamaları	39
Tablo 4. 10 µM kersetin (48 saat) ve 5 µM resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerinde ACTA-2, IL-1β, N-kaderin, TNF-α ve vimentin H-SKOR değerleri	40
Tablo 5. 10 µM kersetin (48 saat) ve 5 µM resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri	41
Tablo 5. a. Kersetin CD133+ kontrol grubunda vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri	42
Tablo 5. b. 10 µM kersetin (48 saat) uygulanan CD133+ hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri	42
Tablo 5. c. 10 µM kersetin (48 saat) uygulanan CD133- hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri	42
Tablo 5. d. 5 µM resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri	43

Pankreas kanseri kök hücresi ve epitelyal-mezenkimal transisyon arasındaki ilişkide, fenolik besin bileşenlerinden kersetin ve resveratrolün potansiyel etkileri.

Öğrencinin Adı: Mustafa Hoca (Uzm. Dyt.)

Danışmanı: Prof. Dr. Sevinç Yücecan **Eş Danışmanı:** Prof. Dr. Seda Vatansever

Anabilim Dalı: Beslenme ve Diyetetik

ÖZET

Amaç: Resveratrol ve kersetin, birçok bitki türünde bulunan fitokimyasallardandır. Bu çalışmanın amacı, CD133+ ve CD133- pankreas kanseri hücrelerinde, resveratrol ve kersetinin epitelyal-mezenkimal transisyon (EMT) üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Kanser kök hücreleri (CD133+), insan pankreas kanseri hücrelerinden (PANC-1) CD133 antikoru kullanılarak Manyetik Partikül Teknolojisi (MiniMACS) sistemi aracılığı ile elde edilmiştir. CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) resveratrol ve kersetin uygulanmıştır. Hücre büyümesi ve sitotoksitesi, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi ile değerlendirilmiştir. Resveratrol ve kersetinin anti-kanser ve anti-metastatik özellikleri, CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerinde aktin alfa-2/alfa-düz kas aktin (ACTA-2), interlökin-1 beta (IL-1β), N-kaderin, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α) ve vimentin antikorları direkt olarak kullanılarak immünohistokimya ile belirlenmiştir.

Bulgular: CD133 antikoru ile boyamadan sonra, CD133+ hücrelerin yoğunluğunun CD133- hücrelerden daha fazla olduğu bulunmuştur. Kersetin uygulanan CD133+ PANC-1 hücrelerinde ACTA-2, IL-1β ve N-kaderin immünoaktivitelerinin anlamlı olarak azaldığı, TNF-α ve vimentin immünoaktivitelerinin ise anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, resveratrol uygulanan CD133+ PANC-1 hücrelerinde N-kaderin ve TNF-α immünoaktivitelerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır.

Sonuçlar: N-kaderin ve ACTA-2 immnoreaktivitelerindeki azalmanın, vimentin immünoreaktivitesindeki artıştan daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Pankreas kanseri kök hücrelerinde, kersetinin N-kaderin ekspresyonunu azaltmasından dolayı resveratroiden daha fazla epitelyal-mezenkimal transisyonu önleyebileceği öngörülmüştür. Kersetinin resveratroiden daha fazla metastazı inhibe edebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: EMT, kersetin, kök hücre, pankreas kanseri, resveratrol

Potential effects of quercetin and resveratrol, the phenolic food components, in the relationship between pancreatic cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition.

Student's Name: Mustafa Hoca (MSc, Dietitian)

Advisor: Prof. Dr. Sevinç Yücecan

Co-advisor: Prof. Dr. Seda Vatansever

Department: Nutrition and Dietetics

ABSTRACT

Objective: Resveratrol and quercetin are phytochemicals that are found in a variety of plants. The aim of this study was to investigate the effect of resveratrol and quercetin on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of CD133+ and CD133- pancreatic cancer cells.

Materials and Methods: Cancer stem cells (CD133+) were obtained from the human pancreatic cancer cells (PANC-1) by the MiniMACS system. CD133+ and CD133- PANC-1 cells were treated with different concentrations (5, 10, 25, 50 and 100 μ M) of resveratrol and quercetin. Cell growth and cytotoxicity were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Anti-cancer and anti-metastatic properties of resveratrol and quercetin were determined by immunocytochemistry using antibodies (actin alpha-2/alpha-smooth muscle actin (ACTA-2), interleukin-1 beta (IL-1 β), N-cadherin, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and vimentin).

Results: The immunostaining intensity of CD133+ cells was stronger than CD133- cells. ACTA-2, IL-1 β and N-cadherin immunoreactivities were significantly decreased, whereas TNF- α and vimentin immunoreactivities significantly increased in quercetin-treated CD133+ cells. Moreover, N-cadherin and TNF- α immunoreactivities significantly decreased in resveratrol-treated CD133+ cells.

Conclusions: The reduction in N-cadherin and ACTA-2 immunoreactivities was higher than the increase in vimentin immunoreactivity, quercetin could prevent epithelial-mesenchymal transition to a greater extent than resveratrol in pancreatic

cancer stem cells because of the reduced expression of N-cadherin. Quercetin could be more effective in inhibiting metastasis compared to resveratrol.

Key Words: EMT, quercetin, stem cell, pancreatic cancer, resveratrol

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Pankreas kanseri, diğer kanser türlerine göre minimum sağkalımı olan ölümcül bir hastalıktır (Rao ve Mohammed, 2015). Her iki cinsiyette de yetersiz tanı nedeniyle kanser ölümlerinin altında yatan yedinci nedendir (Bray ve ark., 2018). 2018'de pankreas kanserinin neden olduğu 432.242 yeni ölüm (GLOBOCAN 2018 tahminleri) oluşmuştur. Ayrıca, 2018 yılında 458.918 yeni pankreas kanseri vakası olduğu bildirilmiş ve dünya çapında 2040 yılına kadar 355.317 yeni vaka olabileceği öngörülmüştür (Rawla ve ark., 2019). Pankreas kanseri belirtileri genellikle net değildir ve ileri evrelere kadar herhangi bir belirti görülmeyebilir. Hastalığın ileri evresinde; kilo kaybı, bulantı, şiddetli karın ağrısı ve kusma görülebilir. Tüm evreler değerlendirildiğinde, 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %8'dir (American Cancer Society, 2018). Pankreas kanserinin temel risk faktörleri; diyabet ve metabolik sendrom prevalansının artmasıdır (Sancho ve ark., 2015). Pankreas kanseri, hiyerarşik olarak kanser hücrelerinden oluşan heterojen bir popülasyona sahiptir. Bu popülasyonda özellikle kanser kök hücreleri bulunmaktadır (Heeschen ve Sancho, 2016).

Birçok fitokimyasalın kanser kök hücresi aktivitesini baskılayarak koruyucu etki (anti-kanser aktivite) gösterdiği düşünülmektedir. Resveratrol ve kersetin gibi fitokimyasallar, pankreas kanserinde kök hücre aktivitesini inhibe edebilir (Gupta ve Pramanik, 2016). Resveratrol; üzüm, yer fıstığı ve üzümü meyveler gibi birçok bitki türünde bulunan polifenolik bileşiklerden biridir (Shukla ve Singh, 2011; Gupta ve Pramanik, 2016). Kersetin ise; çoğunlukla elma, soğan, yaban mersini ve kızılıçıkta bulunan diğer bir polifenolik bileşiktir (Gupta ve Pramanik, 2016). Resveratrol ve kersetin; hücre sinyal yollarını (Wnt/ β -katenin, Hedgehog, Notch), anti-apoptotik genleri/proteinleri (Bcl-2) ve EMT ile ilişkili faktörleri (β -katenin, vimentin) inhibe edici potansiyel etkilere sahiptir. Pro-apoptotik genleri/proteinleri (Bax, kaspaz 3, FOXO1), tümör baskılayıcı genleri/proteinleri (PTEN, E-kaderin), farklılaşmayı ve hücre döngüsünün durdurulmasını uyarıcı potansiyel etkileri de bulunmaktadır (Pistollato ve ark., 2015).

Kanser kök hücrelerinin kendi kendini yenileme yetenekleri vardır ve diğer türdeki malign hücrelere farklılaşma gösterebilirler (Bu ve Cao, 2012). Kanser kök hücrelerinin metastatik davranışı, hastalığın ilerlemesine neden olur. Bu nedenle daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kanser kök hücrelerinin hedef alınması önemlidir (Sancho ve ark., 2015). Kanser kök hücre aktivitesinin inhibisyonunun, kanser tedavisinde daha iyi bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir (Gupta ve Pramanik, 2016). Lee ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada; CD44+ ve CD24+ hücrelere göre CD133+ olan hücrelerin, daha yüksek oranda tümör oluşturma ve metastatik potansiyeli olduğu saptanmıştır. Bu nedenle CD133'ün pankreas kanseri kök hücrelerinde anlamlı olarak hücre yüzey belirteci olabileceği önerilmiştir. Cao ve ark. (2015), kersetinin; pankreas kanseri kök hücrelerinde CD133'ün ekspresyonunu azaltabileceğini göstermiştir. Ayrıca resveratrol; hem pankreas kanseri kök hücrelerinde hem de pankreas kanseri hücrelerinde migrasyon, invazyon ve epitelyal-mezenkimal transisyon üzerinde potansiyel inhibe edici etkilere sahiptir (Shankar ve ark., 2011; Li ve ark., 2013). Kersetinin farklı kanser hücre hatlarında (oral kanser hücreleri, meme kanseri kök hücreleri, prostat kanseri hücreleri vb.) migrasyon yeteneğini azaltabileceği, resveratrolün de çeşitli kanser hücre hatlarının (oral skuamöz hücreli karsinom, prostat kanseri hücreleri vb.) EMT yeteneğini inhibe edebileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Chen ve ark., 2013; Tsai ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016; Kim ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018).

Epitel hücrelerinin mezenkimal karakteristiğine geçişi, hücre-hücre etkileşimi veya hücre polaritesinin kaybı ile indüklenmektedir. Sonuç olarak epitel yapısı bozulmakta ve hücreler, invazyon ve migrasyon özelliklerle birlikte mezenkimal özellik kazanmaktadır. Böylece, epitelyal belirteçlerin (E-kaderin gibi) kaybı ve mezenkimal belirteçlerin (N-kaderin, vimentin ve ACTA-2 gibi) kazanılması ile hücreler yeni fenotip kazanmaktadır (Morandi ve ark., 2017).

Bu çalışmada, pankreas kanseri kök hücrelerinde resveratrol ve kersetinin anti-kanser aktivitelerini belirlemek için MTT testi ve immünohistokimya boyaması kullanılmıştır. Ayrıca pankreas kanseri kök hücrelerinde, resveratrol ve kersetin ile epitelyal-mezenkimal transisyon arasındaki ilişki hakkında bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, pankreas kanseri kök hücrelerinde

resveratrol ve kersetinin hücre canlılığı ve epitelyal-mezenkimal transisyon üzerindeki etkilerini belirlemektir.

Bu projenin ileriye yönelik hedefleri: a) Kersetin ve resveratrolün pankreas kanseri kök hücresinde ayrı ayrı veya birlikte etkilerinin belirlenmesi ve moleküler mekanizmaların ortaya konulmasıdır. b) İn vitro ortamda yapılan bu çalışmanın in vivo ortamdaki çalışmalar için ön çalışma olmasıdır. c) Klinik uygulamada kersetin ve resveratrolün metastaz üzerine etkilerinin belirlenebilmesi için ön verilerin elde edilmesidir.

Tez çalışmasındaki hipotezler şu şekildedir: Resveratrol ve kersetin, pankreas kanseri kök hücrelerinde EMT'yi önleyecek ve mezenkimal belirteçleri inhibe edecektir. Ayrıca doza ve zamana bağlı olarak resveratrol ve kersetin, kanser hücrelerinin canlılığını azaltacaktır. Böylece, resveratrol ve kersetinin anti-metastatik ve anti-kanser etkileri gösterilecektir. Pankreas kanseri kök hücrelerinde, resveratrol ve kersetin (aynı çalışma içerisinde ikisinin yer aldığı) ile epitelyal-mezenkimal transisyon arasındaki ilişki hakkında yeni bir çalışma olarak literatüre katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri ve Kök Hücre Özellikleri

Pankreas kanseri, hiyerarşik olarak kanser hücrelerinden oluşan heterojen popülasyona sahip kanser türüdür. Bu popülasyon içinde özellikle kanser kök hücrelerinin olmasından dolayı tümör oluşturma ve metastaz özelliği bulunmaktadır (Heeschen ve Sancho, 2016). Pankreas kanseri, insidansı gittikçe artan bir kanser türüdür. Temel risk faktörleri arasında; diyabet ve metabolik sendrom prevalansının artmış olması yer almaktadır (Sancho ve ark., 2015). Bu kanser türünde yüksek mortalite oranı görülmesi, ileri evrede tanı konulmasından kaynaklanmaktadır. Tanı alan hastaların %80'den fazlasında, lokal olarak gelişmiş tümör veya cerrahi olarak çıkartılamayacak metastazlar mevcuttur (Gupta ve Pramanik, 2016).

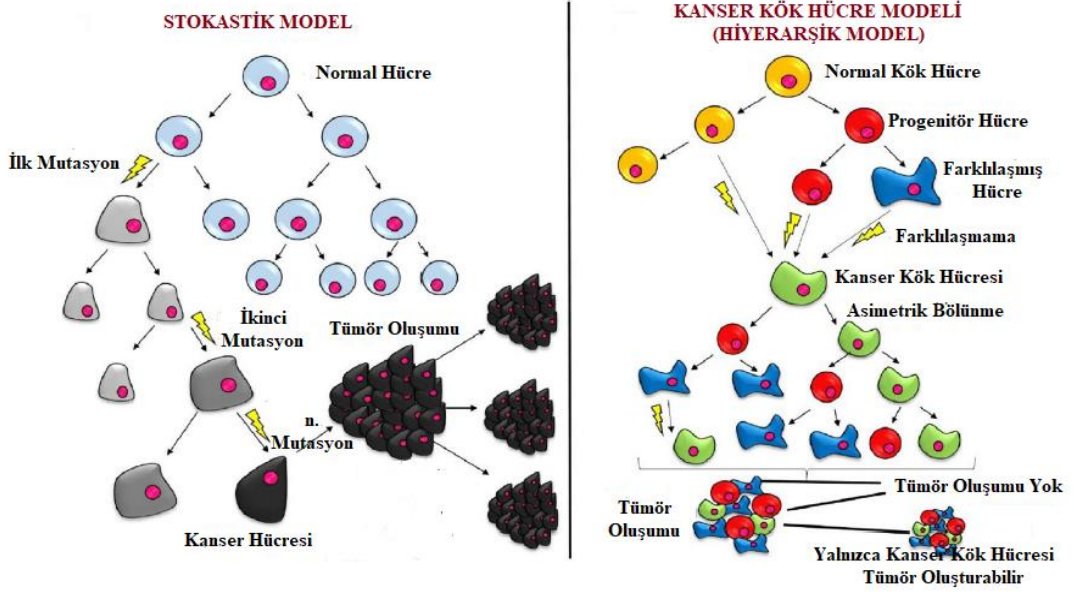
Kanser kök hücrelerinin; kendi kendini yenileyebilme, tümör oluşturabilme ve farklılaşarak çeşitli özelliklere sahip kanser kök hücreleri oluşturabilme özellikleri vardır. Bu hücreler; kanserin başlaması, progresyonu, metastazı ve reküransından sorumludur. Rekürans, kanser kök hücresinin başlıca klinik tablosudur. Kemoterapi, radyoterapi ve diğer tedavilere karşı direnç gösterilmesidir (Gupta ve Pramanik, 2016). Kanser kök hücrelerinin metastatik davranışı, hastalığın devamlılığında sorumludur. Bu nedenle daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kanser kök hücrelerinin hedef alınması önemlidir (Sancho ve ark., 2015). Kanser kök hücre aktivitesinin inhibe edilmesinin kanser tedavisinde iyi yaklaşım olabileceği düşünülmektedir. Birçok fitokimyasalın kanser kök hücre aktivitesini baskılayarak, koruyucu etki gösterdikleri (anti-kanser aktivitesi) kanıta dayalı olarak gösterilmiştir. Pankreas kanserinde kök hücre aktivitesinin inhibe edilmesinde; kurkumin, resveratrol, kersetin, kateşin gibi fitokimyasalların rolü olduğu bilinmektedir (Gupta ve Pramanik, 2016).

Kanser kök hücre belirteçleri (CD24, CD34, CD44, CD133, CD139, CD166, Epitelyal Spesifik Antijen (ESA) gibi), farklı kaynaklı kök hücrelere göre değişiklik gösterebilmektedir (Gupta ve Pramanik, 2016). Pankreas kanseri kök hücrelerinin tanımlanmasında anahtar belirteçler; CD133, Aldehit Dehidrogenaz (ALDH) ve CD24+CD44+ESA+ üçlü kombinasyonu olarak belirtilmektedir (Fitzgerald ve

McCubrey, 2014). CD24+CD44+ESA+ belirteçleri olan pankreas kanseri hücreleri, CD24-CD44-ESA- olanlara göre daha yüksek oranda tümör oluşturuca özelliğe sahiptir. CD133+ olan pankreas kanseri hücreleri, göreceli olarak gemsitabine dirençli özellik göstermektedir. Aynı zamanda diğerkanser kök hücre belirteci olan ALDH, pankreas kanseri kök hücresinde gemsitabine dirençli olarak gösterilmiştir (Gupta ve Pramanik, 2016). Lee ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada; CD133+ olan hücrelerin, CD44+ ve CD24+ hücelere göre daha yüksek oranda tümör oluşturma ve metastatik potansiyeli olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, CD133'ün pankreas kanseri kök hücrelerinde anlamlı olarak hücre yüzey belirteci olabileceği önerilmiştir.

Kanser kök hücreleri daha çok mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yolağını kullanırken, kanser kök hücresi olmayan hücreler daha çok glikoliz yolağını kullanmaktadır (Sancho ve ark., 2015). Pankreas kanseri kök hücreleri de daha çok oksidatif fosforilasyon yapma özelliğine sahip olmasından dolayı belirgin metabolik fenotip göstermektedir. Bu nedenle, sınırlı metabolik plastisite özelliğine sahiptir (Heeschen ve Sancho, 2016).

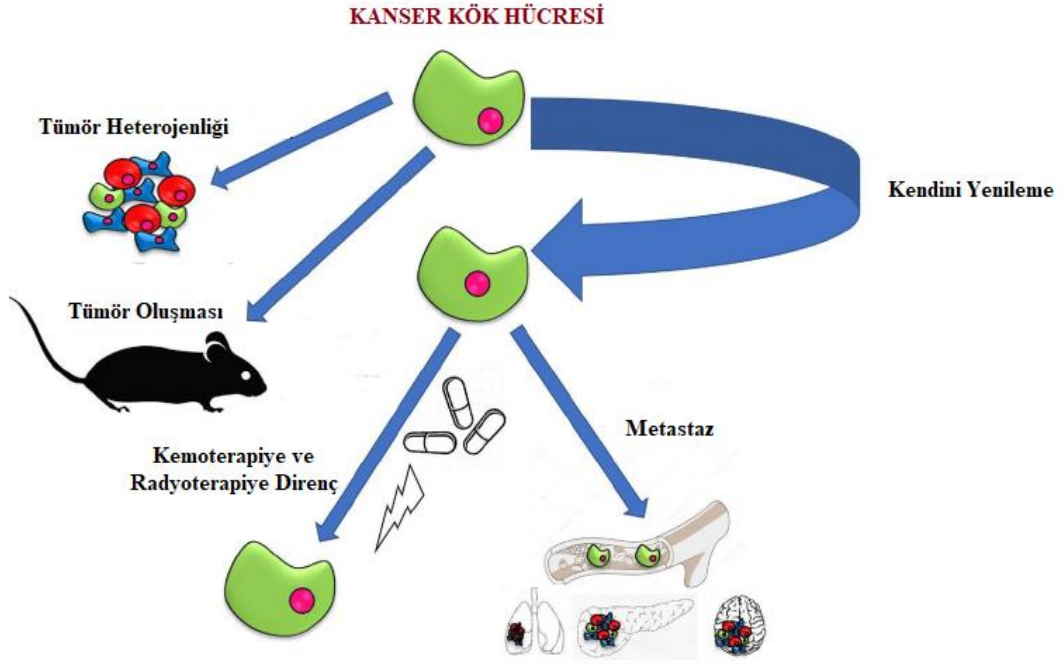
Stokastik modelde; farklı genomik veya genetik mutasyonların sonucunda tüm hücreler potansiyel olarak tümörjenik hale gelebilir. Bu modelde tümör içindeki tüm hücrelerin, yeni bir tümör ortaya çıkarmada eşit derece yeteneğe sahip olduğu tahmin edilmektedir. Hiyerarşik modelde; tümör içindeki yalnızca nadir hücre popülasyonu, kanserde heterojenliği yaratarak tümörü başlatma potansiyeline sahiptir (Şekil 1), (Cianciosi ve ark., 2018).



Şekil 1. Stokastik model ve kanser kök hücre modeli (hiyerarşik model)

(Cianciosi ve ark., 2018)

Kanser kök hücrelerindeki direncin çoklu sinyal yolları 4 başlık altında toplanabilir. Sinyal yolları şu şekilde açıklanmıştır: Transforme edici büyüme faktörü-beta (transforming growth factor-beta, TGF- β) sinyal yolağında; kanser kök hücre özelliğinin desteklenmesi, kanser kök hücre sessizliğinin uyarılması, farklılaşmamanın uyarılması, immün sistemin baskılanması, metastazın uyarılması ve kanser kök hücre-tümör mikro ortam etkileşimlerinin artması gibi olaylar gerçekleşmektedir. Wnt/ β -katenin, Hedgehog (Hh) ve Notch sinyal yollarında; kanser kök hücre özelliğinin desteklenmesi, farklılaşmamanın uyarılması ve metastazın uyarılması gibi olaylar olmaktadır. NF- κ B sinyal yolağında; kanser kök hücre özelliğinin desteklenmesi ve farklılaşmamanın uyarılması gibi olaylar meydana gelmektedir. PI3K/Akt sinyal yolağında; kanser kök hücre özelliğinin desteklenmesi, kanser kök hücre sessizliğinin uyarılması, kanser kök hücre sağkalımının desteklenmesi ve oksidatif modülatör gibi olaylar gerçekleşmektedir (Najafi ve ark., 2019).

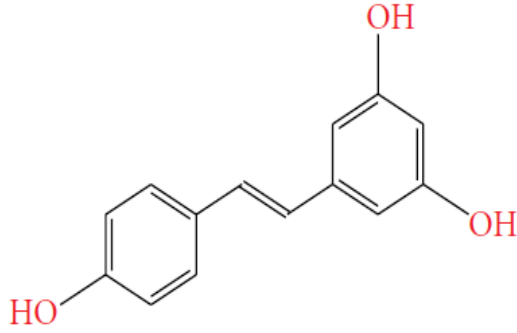


Şekil 2. Kanser kök hücrelerinin özellikleri

(Cianciosi ve ark., 2018)

2.2. Resveratrol ve Pankreas Kanseri Kök Hücresi

Resveratrol, stilben sentaz enzimi yardımıyla bitkilerde üretilen, bir stilben türevi olan stilbenoiddir. Trans- ve cis- konfigürasyonları olan, yağda çözünen bir bileşiktir. Resveratrolün suda çözünürlüğü zayıf olmasına rağmen; eter, kloroform, etanol, asetik asit ve asetonda çözünebilmektedir (Kumar ve ark., 2009). Ayrıca, cis-resveratrol izomeri kararsız yapıdadır ve kolayca ışık ile reaksiyona girerek trans-resveratrol formuna dönüşür (Abba ve ark., 2015).



Şekil 3. Resveratrolün kimyasal yapısı

(Abba ve ark., 2015)

Resveratrol; üzüksü meyveler (üzüm, çilek, böğürtlen, ahududu, yaban mersini vb.), yer fıstığı gibi birçok bitki türünde bulunan polifenolik bileşiktir (Shukla ve Singh, 2011; Gupta ve Pramanik, 2016). Kırmızı şarabın önemli bileşeni olan resveratrol, üzüm zarında bol miktarda bulunmaktadır (Scarpa ve Ninfali, 2015). Anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-kanser etkileri bulunmaktadır (Gupta ve Pramanik, 2016).

Resveratrolün pankreas kanserinde anti-tümör etkisi; hücre proliferasyonunu inhibe etme, anti-anjiyogenez ve apoptozu uyarma özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Potansiyel anti-tümör etkisini, farklı mitokondriyal sinyal yolaklarını aktive ederek göstermektedir (Gupta ve Pramanik, 2016). Hem insan hem de fareden elde edilen pankreas tümöründe, pankreas kanseri kök hücresinin kendi kendini yenileme özelliğini potansiyel olarak inhibe etmektedir (Shankar ve ark., 2011). Resveratrol, insandan elde edilen pankreas kanseri kök hücresinin yaşama ve koloni oluşturma yeteneğini inhibe ederek apoptozu uyarıcı etki gösterebilmektedir. Resveratrolün hem pankreas kanseri kök hücresinde hem de pankreas kanseri hücresinde, migrasyonu ve invazyonu inhibe etme ve epitelyal-mezenkimal transisyonu engelleyici potansiyel etkileri bulunmaktadır (Shankar ve ark., 2011; Li ve ark., 2013).

Resveratrol; hücre sinyal yolaklarını (Wnt/ β -katenin, Hedgehog, Notch), anti-apoptotik genleri/proteinleri (Bcl-2) ve EMT ile ilişkili faktörleri (β -katenin, vimentin) inhibe edici potansiyel etkilere sahiptir. Pro-apoptotik genleri/proteinleri (Bax, kaspaz

3, FOXO1), tümör baskılayıcı genleri/proteinleri (PTEN, E-kaderin), farklılaşmayı ve hücre döngüsünün durdurulmasını uyarıcı potansiyel etkilere de sahiptir (Pistollato ve ark., 2015). Resveratrol, tümörlerdeki kanser kök hücre popülasyonlarını elimine edebilir (Taylor ve Jabbarzadeh, 2017). Shankar ve ark. (2011) tarafından CD24+/CD44+/ESA+ pankreas kanseri kök hücreleri üzerinde yapılan çalışmada; 10-30 µM konsantrasyonlarda kullanılan resveratrolün, kaspaz-3/7 ile uyarılan apoptozu aktive edebildiği düşünülmüştür. Aynı zamanda 10-20 µM konsantrasyonlarındaki resveratrolün, kök hücre özelliğini sağlayan faktörleri (Nanog ve Oct-4) ve anti-apoptotik proteinleri (Bcl-2 ailesi) inhibe edebileceği bulunmuştur.

Tablo 1. Bazı besinlerin resveratrol içerikleri

Besin	Resveratrol Miktarı
Kırmızı şarap	0.1-14.3 mg/L
Beyaz şarap	0.1-2.1 mg/L
Üzüm	50-100 µg/g
Yer fıstığı	0.02-1.92 µg/g
Antep fıstığı	0.09-1.67 µg/g
Yaban mersini	~32 ng/g
Yeşil üzüm	0.016-0.318 µg/g
Siyah üzüm	0.945-1.874 µg/g
Kuru üzüm	0.0005-0.003 µg/g
Üzüm suyu (siyah)	0.087 µg/g
Üzüm suyu (yeşil)	0.0015 µg/g
Fıstık ezmesi	0.015-0.982 µg/g

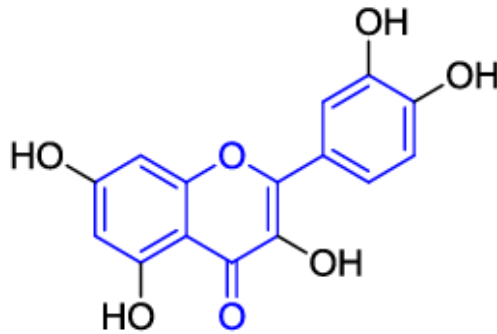
(Planas ve ark., 2011; Prakash ve Gupta, 2011)

Resveratrol bir bakır şelatörüdür ve aşırı şelasyon, kollajen oluşumu ve sinir rejenerasyonu için gerekli olan bakırın kullanılmasını engelleyebilir. Ayrıca resveratrolün mega dozlarının (500 mg'den fazla) kullanılması; anemi, aşıl topuğu tendoniti, anksiyete reaksiyonları ve parmaklarda uyuşukluk gibi yan etkilere neden olabilir (Kumar ve ark., 2009). Yetişkinler için resveratrolün günlük 150 mg alım

düzeıı, güvenlık açısından herhangi bir problem oluşturmamaktadır. Böylece, sentetik trans-resveratrolün önerilen kullanım koşulları altında alındığında güvenli olduğu sonucuna varılmıştır (European Food Safety Authority, 2016). İn vitro ve in vivo (hayvan) çalışmaları resveratrolün potansiyel etkilerini kanıtlamıştır. İnsanlar üzerinde yapılacak daha fazla araştırma, resveratrolün yaşam kalitesini arttırmada önemli bileşen olabileceğini gösterecektir (Kumar ve ark., 2009).

2.3. Kersetin ve Pankreas Kanseri Kök Hücresi

Kersetin, en bol bulunan polifenolik bioflavonoidlerden biridir ve genellikle flavonol grubunda yer almaktadır. Ayrıca kersetin, insan tarafından üretilemeyen suda çözünür pigmentler olarak da sınıflandırılmaktadır. 2 benzen halkası ve 5 hidroksil (-OH) grubu içeren kersetin, kardiyovasküler sağlığın iyileştirilmesi ve kanser riskinin azaltılması dahil olmak üzere birçok faydalı potansiyel etkilere sahiptir. Molekül formülü $C_{15}H_{10}O_7$ olan kersetinin suda çözünürlüğu zayıftır. 5 hidroksil grubunun varlığı, kersetin molekülünün lipofilik yapıda olmasını sağlar. Kersetin; eter ve metanolde çok çözünür, etanol ve asetik asitte çözünür gibi fiziksel özelliklere de sahiptir (Kumar ve ark., 2017).



Şekil 4. Kersetinin kimyasal yapısı

(Massi ve ark., 2017)

Kersetin; çoğunlukla elma, kızılıcık, yaban mersini, siyah çay, yeşil çay, soğan (ağırlıklı olarak dış halkalarda) ve brokolide bulunan polifenolik bileşiktir. Anti-

oksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser ve kardiyoprotektif etkileri bulunmaktadır (Gupta ve Pramanik, 2016; Kumar ve ark., 2017). Genelde kanser kök hücreleri apoptoza karşı dirençlidir. Kersetin, kanser kök hücrelerinde apoptotik direnci potansiyel olarak ortadan kaldırma özelliğine sahiptir (Zhou ve ark., 2010).

Genel olarak güvenli olduğu düşünülen kersetinin, baş ağrısı ve mide rahatsızlığı gibi bazı yan etkilere yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca, çok yüksek dozlarda alınan kersetinin böbreklere zarar verebileceği belirtilerek, kersetin alımının belirli aralıklarla kesilmesi önerilmektedir. Hamile ve emziren kadınların ve böbrek bozukluğu olan bireylerin fazla miktarda kersetin alımından kaçınılması gerekmektedir. Günde 1 gramdan daha yüksek doz alımının böbreklere zarar verdiği rapor edilmiştir (Kumar ve ark., 2017).

Kersetin; hücre sinyal yolları (Wnt/ β -katenin, Hedgehog, Notch), anti-apoptotik genleri/proteinleri (Bcl-2) ve EMT ile ilişkili faktörleri (β -katenin, vimentin) inhibe edici potansiyel etkilere sahiptir. Pro-apoptotik genleri/proteinleri (Bax, kaspaz 3, FOXO1), tümör baskılayıcı genleri/proteinleri (PTEN, E-kaderin), farklılaşmayı ve hücre döngüsünün durdurulmasını uyarıcı potansiyel etkilere de sahiptir (Pistollato ve ark., 2015). Del Follo-Martinez ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmanın sonucuna göre; resveratrol ve kersetinin kombine olarak kullanılmasının, kolon kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinden dolayı apoptoza neden olabileceği bulunmuştur.

Cao ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada; pankreas kanseri kök hücrelerinde kersetinin CD24 ve CD133 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Zhou ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada ise; kersetinin sülforafan ile sinerjik etki göstererek pankreas kanseri kök hücrelerinin proliferasyonunu, anjiyogenezini ve kanser kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunu azaltıcı ve apoptoza uyarıcı potansiyel etkileri saptanmıştır.

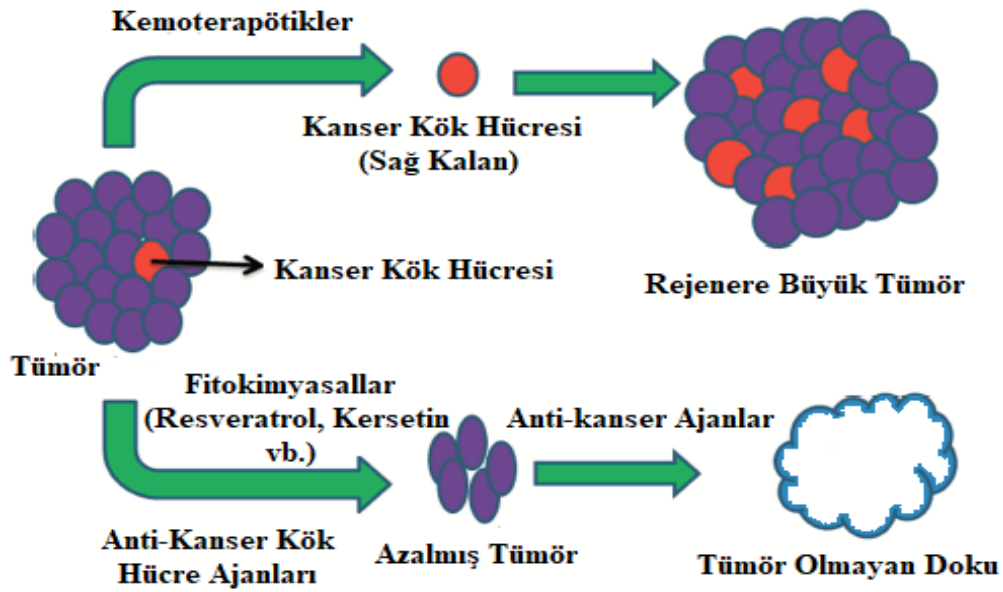
Çiğ besinin türü, işleme ve analitik yöntemlerinin standardizasyonu, besin matriksi gibi birçok faktör kersetinin miktarını ve özelliklerini etkilemektedir. Meyve ve sebze tüketimi ile diyetten günlük ortalama 15 mg ile 40 mg arasında kersetin alınabilmektedir (Kumar ve ark., 2017).

Tablo 2. Bazı besinlerin kersetin içerikleri

Besin	Kersetin Miktarı (mg/100 g)
Kakao tozu (şekersiz)	20.10
Kızılcık (çiğ)	14.00
Soğan (çiğ)	13.27
Ispanak (çiğ)	4.86
Elma (kabuklu)	4.42
Brokoli (çiğ)	3.21
Yeşil çay	2.69
Siyah çay	1.99
Kırmızı şarap	0.84

(Kumar ve ark., 2017)

Kersetin genellikle supleman olarak 50 mg ile 500 mg dozlarında, kapsül veya tablet şeklinde bulunmaktadır. Kersetin dozu, tedavi edilecek sağlık durumuna bağlı olarak önerilmektedir, fakat kersetin için standart bir doz önerilmemiştir (Kumar ve ark., 2017). Kersetin kullanımıyla ilgili olarak, insan müdahale çalışmaları (özellikle uzun süreli (>12 hafta) ve yüksek dozda supleman olarak kersetin (≥ 1000 mg/gün) uygulaması ile ilgili olan) eksikliğinden dolayı güvenlik açısından bilimsel bilgiler sınırlıdır. Bu yüzden klinik açıdan yan etkileri belirlemeye yönelik olarak müdahale çalışmalarının yapılması önerilmektedir (Andres ve ark., 2018).



Şekil 5. Kanser kök hücrelerine karşı anti-kanser kök hücre ajanlarının aktiviteleri
(Gupta ve Pramanik, 2016)

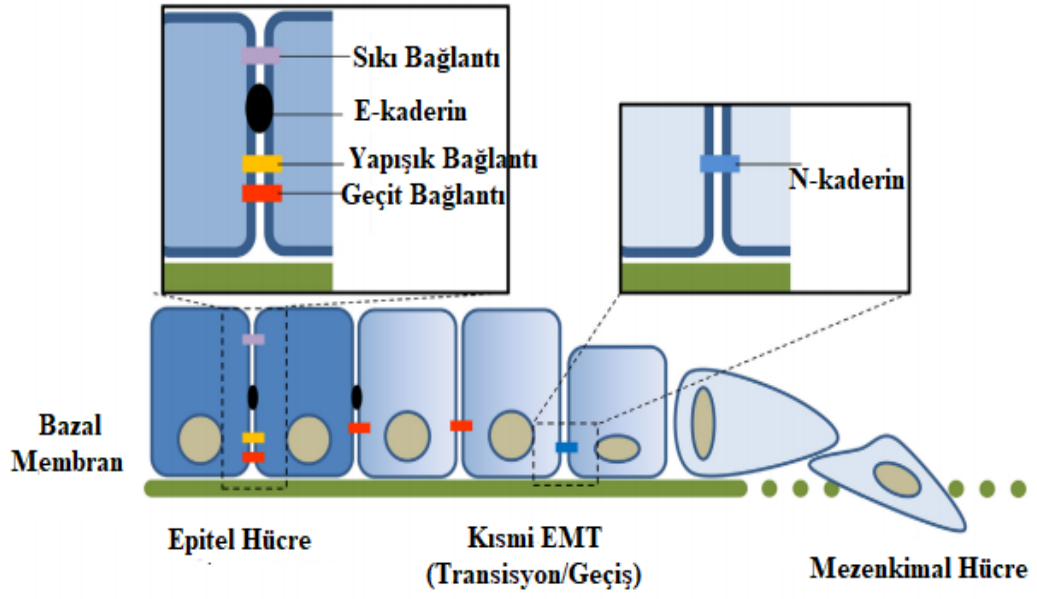
2.4. Pankreas Kanseri Kök Hücresi ve Epitelyal-Mezenkimal Transisyon

Epitelyal-mezenkimal transisyon, göstermiş olduğu farklı fonksiyonel sonuçlara göre 3 alt türde sınıflandırılmaktadır. Tip 1 EMT, mezenkimal hücreleri oluşturabilen türdür. Aynı zamanda, mezenkimal-epitelyal transisyon (MET) aracılığı ile sekonder epitel oluşumu görülebilmektedir. Embriyonik gastrulasyon ve nöral krest hücreleri ile ilişkilidir. Tip 2 EMT, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu ile ilişkili olan türdür. Tip 3 EMT ise, genetik ve epigenetik değişiklik geçiren epitelyal neoplastik hücrelerde oluşmaktadır. Neoplastik hücrelerin, kan dolaşımı yolu ile migrasyon yapabilme ve sekonder nodül oluşturabilme özellikleri vardır. Bu özellikler, kanser progresyonu klinik tablosu için önem taşımaktadır (Zhou ve ark., 2017). Tip 3 EMT, kanser hücrelerinde görülür ve tümör metastazı sırasında diseminasyon, invazyon gibi birkaç farklı aşamada önemli yere sahiptir. Metastatik tümör hücreleri, kan dolaşımı aracılığı ile migrasyon yapabilirler ve bazı durumlarda mezenkimal-epitelyal transisyon yoluyla diğer bölgelerde sekonder tümörler oluşturabilirler. Tip 3 EMT sırasında; bazı hücreler mezenkimal özellikler kazanırken, bazıları epitel özelliklerini

koruyabilmektedir. Bazı hücreler ise, tamamen mezenkimal olabilmektedir (Polireddy ve Chen, 2016).

Kanser kök hücreleri, metabolik olarak EMT fenotipi ile ilişkilendirilmektedir (Heeschen ve Sancho, 2016). EMT süreci, epitelyal özelliklere sahip hücrenin mezenkimal özelliklere sahip hücreye farklılaşması, migrasyonun kolaylaşması ve yeni odağa yerleşen hücrenin tekrar epitelyal özelliğini koruyarak metastaz yaptığı bölgede çoğalmasıdır. Bu süreç tümör gelişmesinde önem taşımaktadır. Çeşitli çevresel faktörler EMT oluşumunu uyarmaktadır. Bu faktörler; hücre-hücre iletişiminin ve hücre polaritesinin kaybı olarak sayılabilir. Migrasyon ve invazyon yapabilme yeteneklerinden dolayı, epitelyal hücre yapısının bozularak mezenkimal hücre yapısına farklılaşması gerçekleşmektedir (Morandi ve ark., 2017).

Epitelyal belirteçler; E-kaderin, klaudinler, okludinler, sitokeratin ve mezenkimal belirteçler ise; N-kaderin, vimentin, matriks metalloproteinazlar, fibronektin olarak sayılabilir (Guerra ve ark., 2017; Morandi ve ark., 2017). EMT sürecinde; epitelyal hücrede adhezyon yeteneğinde ve sıkı bağlantı proteinlerinde (klaudin 1 ve 7, okludin ve E-kaderin) azalma ve matriks metalloproteinazlarda artma meydana gelmekte, mobilite artmaktadır (Tanase ve ark., 2014). Epitelyal kanserlerden olan pankreas kanserinde EMT, kanser gelişiminin 3 majör adımı (invazyon, diseminasyon ve metastaz) ile ilişkilidir. EMT sürecinde hücreler, epitelyal hücre-hücre bağlantılarını ve apikal-bazal hücre polaritelerini kaybederler. Hücreler mezenkimal özellik kazanarak migrasyon yapabilirler (Zhou ve ark., 2017). Pankreas kanseri kök hücrelerinde; CD133'ün hipoksik şartlar altında, hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1 α) ekspresyonunu uyardığı saptanmıştır. Sonrasında N-kaderinde artışa bağlı olarak, EMT özellik görülmesine ve tümör migrasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Maeda ve ark., 2016).



EMT Uyarıcıları



Epitelyal-Mezenkimal Transisyon

F
E
N
O
T
İ
P

-Farklılaşma yeteneğinin kaybedilmesi
-Bağlantılarda ayrılma
-Apikal-bazal polaritenin kaybı
-Epitel belirteçlerin kaybedilmesi
(E-kaderin, klaudinler, sitokeratin vb.)

-Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi
-Migrasyon ve invazyon
-MMP sekresyonu
-Bazal membran degradasyonu
-Mezenkimal belirteçlerin kazanılması
(N-kaderin, vimentin, ACTA-2/ α -SMA vb.)

Şekil 6. Epitelyal-mezenkimal transisyonun genel özellikleri

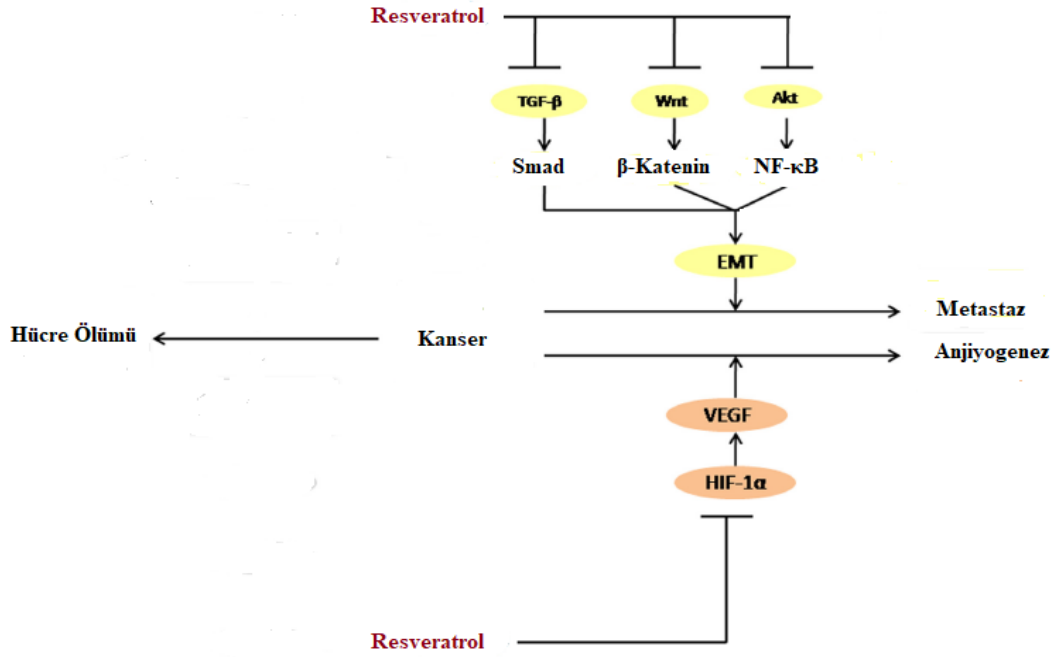
(Morandi ve ark., 2017)

2.5. Resveratrol ve Epitelyal-Mezenkimal Transisyon

Metastaz süreci karmaşıktır ve tümör oluşumu için kanser hücrelerinin primer bölgeden uzak bölgelere yayılmasını içermektedir. EMT, metastatik kaskadın başlangıç aşamasında gerekli olan durumdur. Resveratrol, EMT'yi düzenleyen birçok sinyal yolağına müdahale ederek kanser hücrelerinin motilitesini ve invazyonunu inhibe edebilmektedir (Elshaer ve ark., 2018).

Resveratrol; transforme edici büyüme faktörü-beta 1 (transforming growth factor-beta 1, TGF- β 1)/small mothers against decapentaplegic (Smad), Wnt/ β -katenin, fosfotidil inositol 3 kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt)/NF- κ B yolaklarını ve EMT'yi inhibe ederek metastazı önleyebilmektedir. Ayrıca resveratrol, HIF-1 α bağımlı vasküler endotelial büyüme faktörünü (vascular endothelial growth factor, VEGF) inhibe ederek anjiyogenezi önleyebilir (Şekil 7), (Elshaer ve ark., 2018).

Resveratrol, Hedgehog sinyal yolağı ile uyarılan EMT-ilişkili morfolojik değişiklikleri geriye döndürebilmektedir. Ayrıca resveratrol, migrasyon ve invazyonla ilişkili olan moleküllerden MMP ekspresyonunu azaltabilmektedir (Kim ve ark., 2016).



Şekil 7. Resveratrolün anti-kanser mekanizmaları ve EMT üzerindeki etkisi

(Elshaer ve ark., 2018)

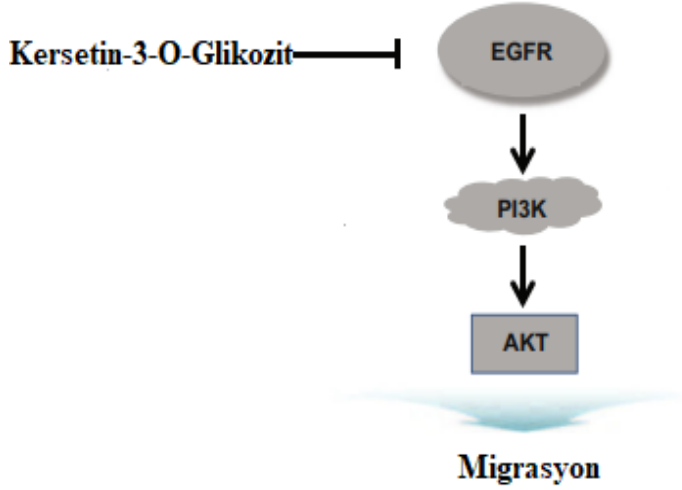
Pankreatik stellat (yıldız) hücrelerinin aktive olması, pankreas kanseri hücrelerinde malignitenin gerçekleşmesine neden olabilmektedir. Resveratrol uygulamasıyla birlikte invazyonda, migrasyonda ve α -SMA veya ACTA-2 proteininin ekspresyonunda azalma olduğu bulunmuştur (Yan ve ark., 2018).

2.6. Kersetin ve Epitelyal-Mezenkimal Transisyon

Kersetinin epidermal kanser hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, kersetinin kaderin değişimini (E-kaderinden N-kaderine) tersine çevirerek, hücre-hücre etkileşimlerinin bozulmasını önleyerek ve invazyonu inhibe ederek, EMT sürecini önleyici potansiyel bir etki gösterdiği bulunmuştur (Lin ve ark., 2011a).

Kersetin-3-O glikozit, insan pankreas kanseri hücrelerinde epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF) ile uyarılan migrasyonu inhibe edici potansiyel özellik göstermektedir. Kersetin-3-O glikozit, epidermal büyüme faktörü reseptörünü (epidermal growth factor receptor, EGFR) inhibe ederek, EGF'nin reseptörüne bağlanmasını önlemektedir. Daha sonrasında PI3K ve Akt yollarının

gelişmesine engel olarak, migrasyonu inhibe edebilmektedir (Şekil 8), (Lee ve ark., 2015).



Şekil 8. İnsan pankreas kanseri hücrelerinde, EGF kaynaklı migrasyonu bloke etmede kersetinin etki mekanizması

(Lee ve ark., 2015)

İnterlökin-6 (IL-6), EMT'yi uyararak kanser hücrelerinde invazyonu destekleyebilir. PATU-8988 pankreas kanseri hücrelerinde kersetinin (80 μ M, 24 saat) IL-6 ile uyarılan EMT'yi ve MMP sekresyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, kersetin uygulaması sonrasında E-kaderinde artma, N-kaderin ve vimentinde azalma olduğu görülmüştür. Böylece, kersetinin invazyon ve metastaz sürecini tersine çevirdiği sonucuna varılmıştır (Yu ve ark., 2017).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Reaktifler ve Hücre Uygulamaları

Resveratrol ((E)-5-(2-(4-Hidroksifenil)etenil)-1,3-benzendiol; \geq %99 saflık) (Sigma, R5010), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (PanReac AppliChem) içerisinde çözdürülmüştür. Ayrıca, kersetin (2-(3,4-Dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-1-benzopiran-4-on, 3,3',4',5,6-pentahidroksiflavon; \geq %95 saflık) (Sigma, Q4951) de DMSO içerisinde çözdürülmüştür. Resveratrol ve kersetin kullanılacağı zaman, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Capricorn Scientific, DMEM-LPA) ile dilüe edilmiştir. Etkin dozun belirlenmesi için hücrelere farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 100 μ M) resveratrol ve kersetin uygulanmıştır.

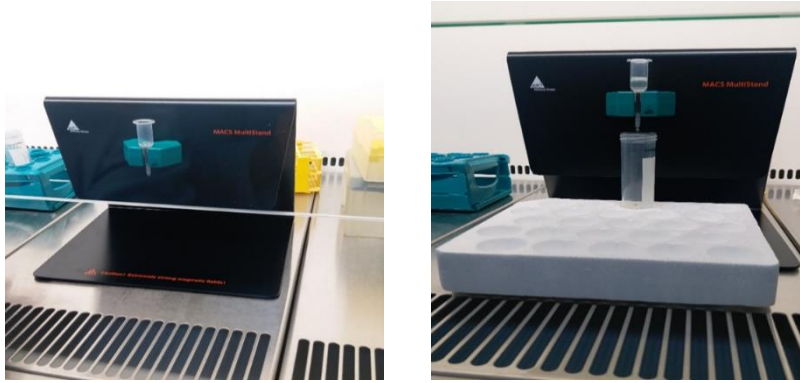
3.2. Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

Bu çalışma için, insan pankreas kanseri hücre hattı olan PANC-1 (ATCC: CRL-1469) kullanılmıştır. PANC-1 hücreleri DMEM vasatı içerisinde; %10 ısı ile inaktive edilmiş Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI-11B), %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B) ve %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B) ile hazırlanmıştır. 37°C ve %5 karbondioksit (CO₂) olan nemli ortamda hücreler kültüre edilmiştir. Kültüre edilmiş hücreler konfluent duruma ulaştığında, %0.25 tripsin-EDTA (Gibco, 1838995) solüsyonu kullanılarak sub-kültür edilmiştir.

3.3. MiniMACS Sistemi ile Kanser Kök Hücre İzolasyonu

İnsan pankreas kanseri kök hücreleri MiniMACS sistemi ile izole edilmiştir (Miltenyi Biotec, Almanya). İlk olarak, PANC-1 hücreleri tripsinizasyon yoluyla toplanmıştır (MiniMACS sisteminden geçirilen toplam hücre sayısı 2×10^8 idi.). Santrifüj işleminden sonra, süpernatant elimine edilmiş ve 60 μ l tampon (Miltenyi Biotec, Almanya, 130-100-857) ilave edilerek hücreler tekrar süspansiyon edilmiştir.

Daha sonra, 20 µl bloklama reaktifi (Miltenyi Biotec, Almanya, 130-100-857) ve 20 µl işaretlenmiş CD133 microbead antikoru (Miltenyi Biotec, Almanya, 130-100-857) eklenmiş ve 15 dakika boyunca buz üzerinde karıştırılarak hücrelerin inkübasyonu yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında, 1 ml tampon eklenerek santrifüj işlemi (10 dakika) yapılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak, 500 µl tampon eklenmiş ve pelet tekrar süspansiyon edilmiştir. Manyetik ayırma işlemi için kolon manyetik alana yerleştirilmiş ve 500 µl tampon ile kolon yıkanmıştır (Kolonlar, CD133+ hücrelerin pozitif seleksiyonu için üretilmiştir.). Hücreler CD133 antikoru ile işaretlendikten sonra, hücre süspansiyonu kolondan geçirilmiş ve CD133+ hücreler pozitif seleksiyon ile kolonda kalmıştır. Böylece, CD133- hücreler alttaki tüpte birikmiştir. Kolon manyetik alandan ayrılarak, 1 ml tampon ile kolona ait şırınga ile hızlıca yıkanmıştır. CD133+ hücreler ayrı bir tüpte toplanmıştır. Sonra, kolon en az iki kere daha 500 µl tampon ile tekrar yıkanmıştır. 10 dakika santrifüj yapılarak tampon uzaklaştırılmıştır. Hücreler vasat ile bir kez yıkandıktan sonra kültür kabına konularak kültüre edilmiştir.



Resim 1. MiniMACS ile kanser kök hücre izolasyonu

3.4. Hücre Canlılığı ve Hücre Büyümesi Analizi

Sitotoksikite analizi, MTT testi (Glentham Life Sciences, GC4568) ile değerlendirilmiştir. Stok resveratrol (Sigma, R5010) ve kersetin (Sigma, Q4951) solüsyonları, DMSO içerisinde hazırlanmıştır. Resveratrol ve kersetin kültür vasatı ile dilüe edilerek beş farklı konsantrasyon (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) için hazırlanmıştır. PANC-1 hücreleri toplanarak vasat içerisinde süspansiyon edilmiş ve 96 kuyucuklu hücre

kültürü kabına her bir kuyucuğa 5×10^3 yoğunluktaki hücre olacak şekilde ekilmiştir. Negatif kontrol satırı ne hücre ne de resveratrol veya kersetin içermezken, pozitif kontrol satırı sadece ekilmiş hücreleri içermekteydi ve tümü 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, 10 µl MTT solüsyonu her bir kuyucuğa eklenmiş ve 4 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ ortamında bekletilmiştir. Sonra, formazan kristallerini çözdürmek için 50 µl DMSO eklenmiştir. Absorbans 570 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür (VersaMax, Molecular Device, Sunnyvale, Amerika Birleşik Devletleri). Tüm deneyler, her reaktif (resveratrol ve kersetin) için üç kez yapılmıştır.

3.5. İmmünohistokimya

Hücreler, Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline, PBS) çözeltisi içinde %4'lük paraformaldehit (Sigma-Aldrich, 158127-25G) ile 30 dakika boyunca 4 °C'de fikse edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra, hücre geçirgenliğini artırmak için hücrelere %0.1 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8532) eklenerek 15 dakika boyunca bekletilmiştir. PANC-1 hücreleri PBS ile yıkanmış ve endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için hücreler oda sıcaklığında, 5 dakika boyunca, %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) (Riedel-de Haën, 70570) ile inkübe edilmiştir. PBS ile üç kere 5'er dakika yıkama yapıldıktan sonra, bloklama solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan ve PBS ile tekrar yıkandıktan sonra hücreler, primer antikorlar olan vimentin (10366-1-AP, Proteintech), ACTA-2 (14395-1-AP, Proteintech), N-kaderin (13769-1-AP, Proteintech), TNF- α (sc-52746, Santa Cruz Biotechnology) ve IL-1 β (sc-7884, Santa Cruz Biotechnology) ile bir gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. PBS ile tekrar yıkama işlemi yapıldıktan sonra (üç kere 5'er dakika), hücreler biotinlenmiş sekonder antikor (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) ile 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 100 µl Horseradish Peroksidaz (HRP)-Streptavidin kompleksi (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) kültürüne eklenmiş hücrelere eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, hücreler PBS ile yıkanmış ve immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak için hücrelere Diaminobenzidin (DAB) (ScyTek Laboratories, 38611) eklenerek 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. DAB, distile su

ile yıkanmış ve hücrelere artalan boyamanın sağlanması için Mayer's Hematoksilen solüsyonu 5 dakika boyunca uygulanmıştır. Daha sonra, kapatma vasatı ile kapatılmıştır (Merck Millipore, 1092490500, Almanya). Tüm örnekler, ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir (Olympus BX40, Tokyo, Japonya). Vimentin, ACTA-2, N-kaderin, TNF- α ve IL-1 β boyanmaları, yarı kantitatif olarak Histolojik-Skor (H-SKOR) kullanılarak derecelendirilmiştir. Aşağıdaki denkleme göre hesaplama yapılmıştır: H-SKOR= $\sum \pi (i+1)$. Denklemdaki i, boyanmanın yoğunluğunu (intensity) göstermektedir. i: 1, 2 ve 3 (sırasıyla, zayıf, orta ve güçlü) değerlerini alabilmektedir. Bunlara ek olarak π ise, her yoğunluktaki boyanmış hücrelerin yüzdesini göstermektedir (%0 ve %100 arasında değişen).

3.6. Araştırma Türü ve Araştırma Yeri

Tez çalışmasında kullanılan araştırma türü, deneysel araştırmadır. Resveratrol ve kersetin uygulanan gruplar deney gruplarını, resveratrol ve kersetin uygulanmayan gruplar ise kontrol gruplarını oluşturmaktadır. Çalışmanın laboratuvar aşamaları, YDÜ-DESAM ve MCBÜ Hücre Kültürü Laboratuvarları'nda yürütülmüştür.

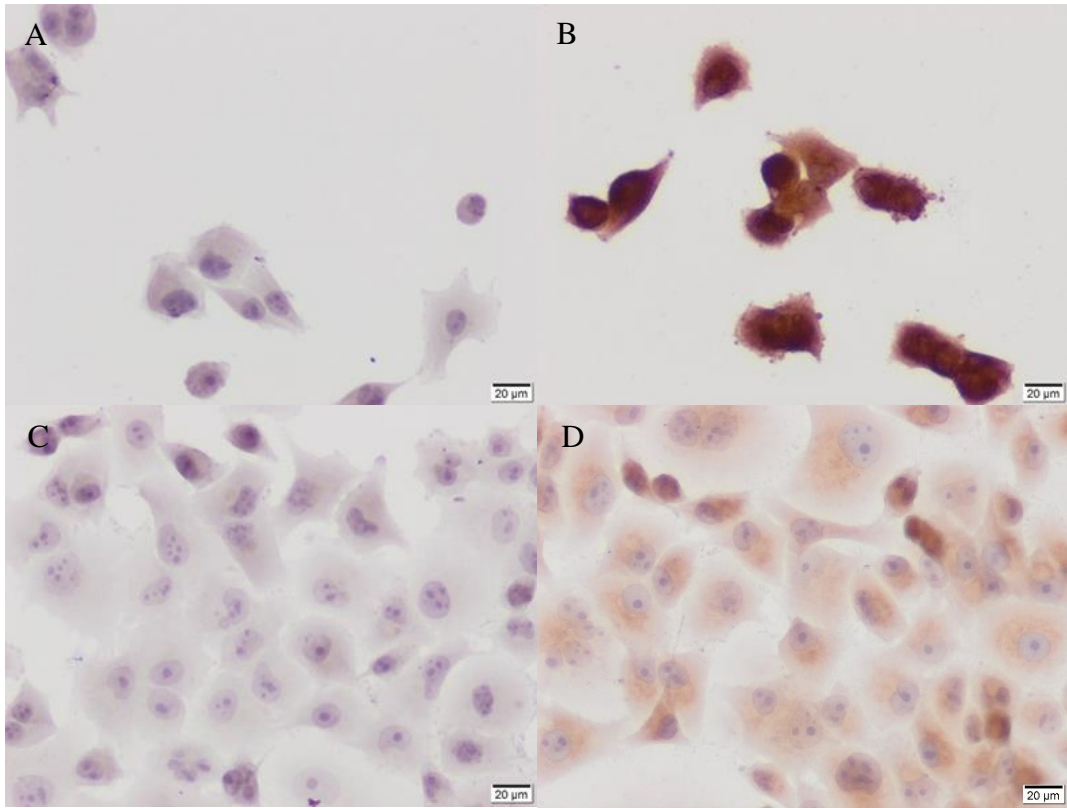
3.7. İstatistiksel Analiz

Veriler, ortalama \pm Standart Sapma (Standard Deviation, SD) olarak ifade edilmiştir. Bulgular, Sosyal Bilimler için İstatistik Paket Programı 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences 18.0, SPSS 18.0) kullanılarak analiz edilmiştir. Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testleri (hangisi uygunsa) gruplar arasındaki farklılıklar için kullanılmıştır. p değeri <0.05, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sürekli verilerin çoklu gruplar arasında karşılaştırılması için Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way Analysis of Variance, ANOVA) kullanılmıştır. İstatistiksel açıdan anlamlılık bulunduğu, ikili karşılaştırmalar için post-hoc testi olarak Tukey testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. CD133+ ve CD133- PANC-1 Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Boyanması

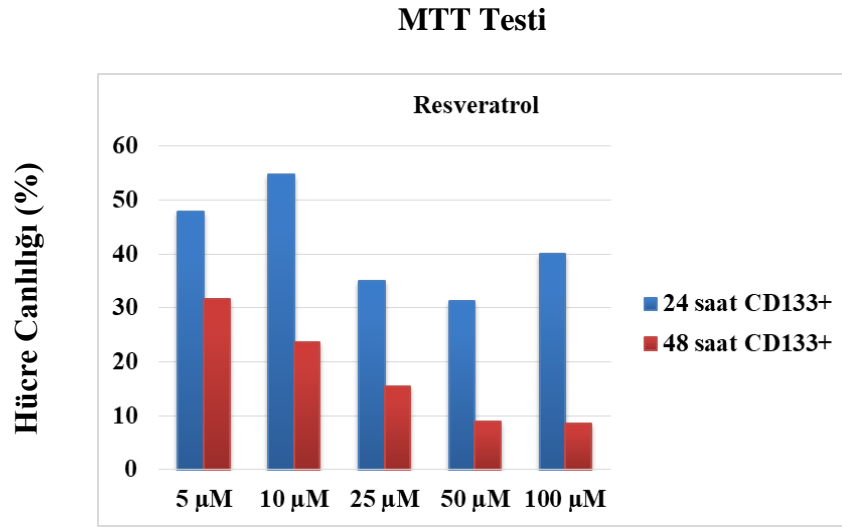
Kanser kök hücreleri (CD133+ hücreler), PANC-1 hücrelerinden CD133 antikoru kullanılarak MiniMACS sistemi ile elde edilmiş ve immünohistokimyasal karakterizasyon yapılmıştır. Hücreler CD133 antikoru ile işaretlendikten sonra, CD133+ hücreler pozitif seleksiyon ile kolonda kalmıştır. CD133 antikoru ile immünohistokimyasal boyanma sonrasında, CD133+ hücrelerin (Resim 2 B) yoğunluğunun CD133- hücrelerden (Resim 2 D) daha fazla olduğu bulunmuştur. İmmünohistokimyasal boyanma sonrasında CD133+ hücrelerin yüzdesi yaklaşık %85.8 olarak hesaplanmıştır.



Resim 2. MiniMACS ile PANC-1 hücre hattından elde edilen CD133+ kontrol (A), CD133+ hücreler (B), CD133- kontrol (C) ve CD133- hücreler (D). Ölçek: 20 µm

4.2. Hücre Canlılığı ve Sitotoksitesisi

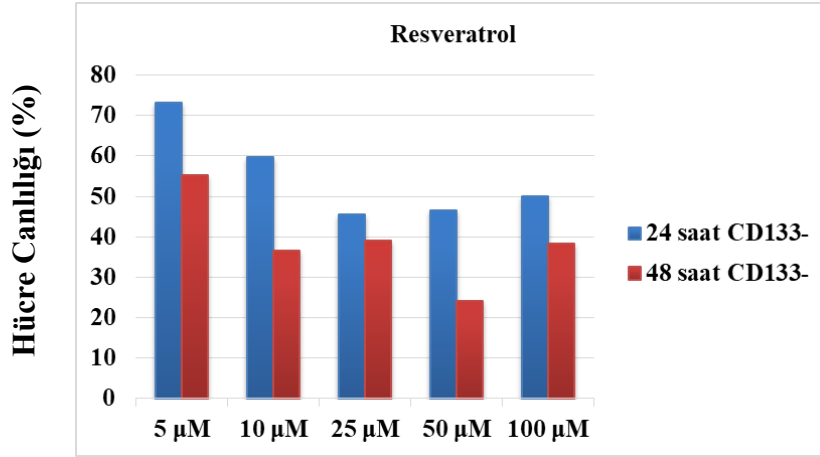
Farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 100 μM) resveratrol, CD133+ PANC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Hücrelerin canlılığı, MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Resveratrolün tüm konsantrasyonlarının, CD133+ PANC-1 hücre proliferasyonunu azalttığı ve doza ve zamana bağlı bir şekilde toksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Resveratrolün doz-yanıt sütunları ve yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu (the half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) değerleri. Hücre canlılığı, MTT testi ile ölçülmüştür. CD133+ hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 μM) resveratrol uygulanmıştır.

CD133- PANC-1 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 100 μM) resveratrol, 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Hücrelerin canlılığı, MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Resveratrolün tüm konsantrasyonlarının, CD133- PANC-1 hücre proliferasyonunu azalttığı ve doza ve zamana bağlı bir şekilde toksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Şekil 10).

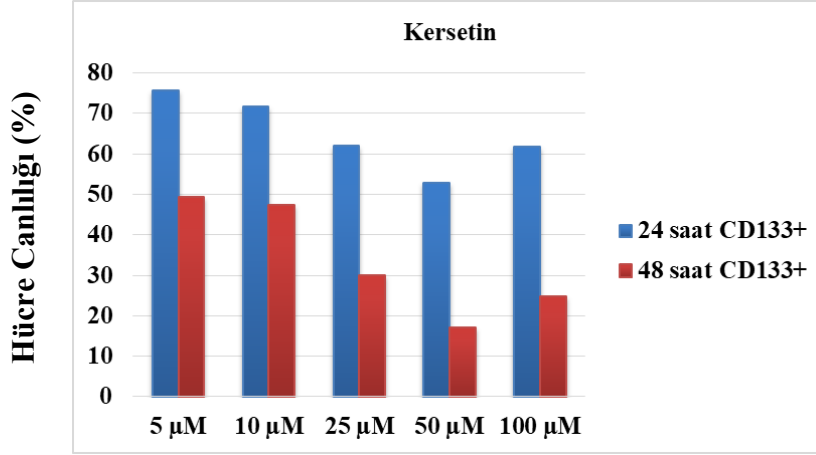
MTT Testi



Şekil 10. Resveratrolün doz-yanıt sütunları ve IC_{50} değerleri. Hücre canlılığı, MTT testi ile ölçülmüştür. CD133- hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) resveratrol uygulanmıştır.

CD133+ PANC-1 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) kersetin, 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Hücrelerin canlılığı, MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kersetinin tüm konsantrasyonlarının, CD133+ PANC-1 hücre proliferasyonunu azalttığı ve doza ve zamana bağlı bir şekilde toksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Şekil 11).

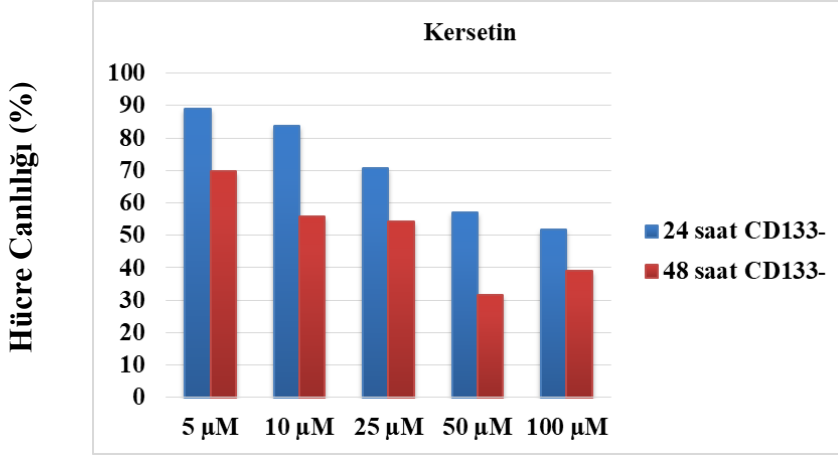
MTT Testi



Şekil 11. Kersetinin doz-yanıt sütunları ve IC₅₀ değerleri. Hücre canlılığı, MTT testi ile ölçülmüştür. CD133+ hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) kersetin uygulanmıştır.

CD133- PANC-1 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) kersetin, 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Hücrelerin canlılığı, MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kersetinin tüm konsantrasyonlarının, CD133- PANC-1 hücre proliferasyonunu azalttığı ve doza ve zamana bağlı bir şekilde toksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Şekil 12).

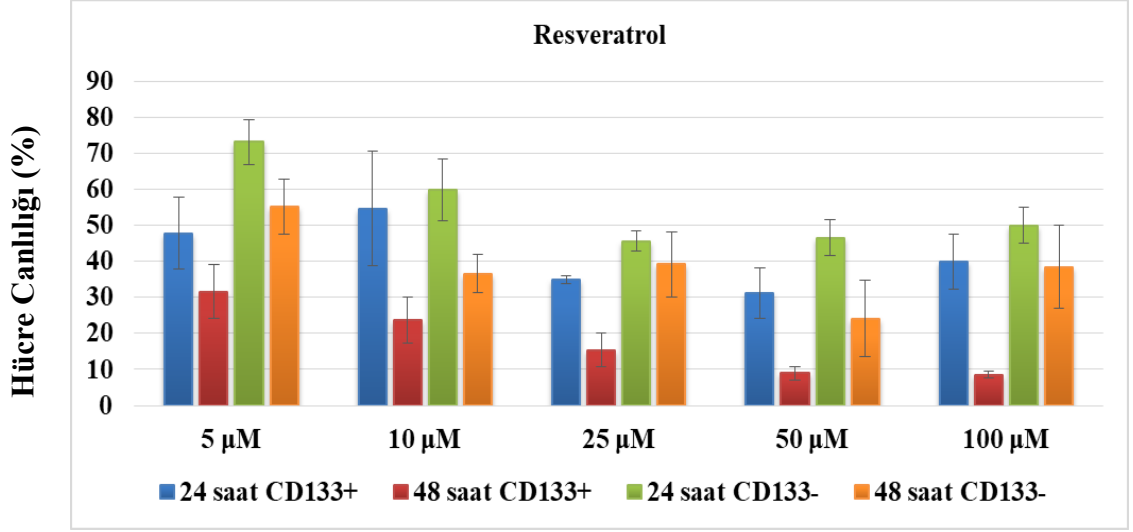
MTT Testi



Şekil 12. Kersetinin doz-yanıt sütunları ve IC₅₀ değerleri. Hücre canlılığı, MTT testi ile ölçülmüştür. CD133- hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) kersetin uygulanmıştır.

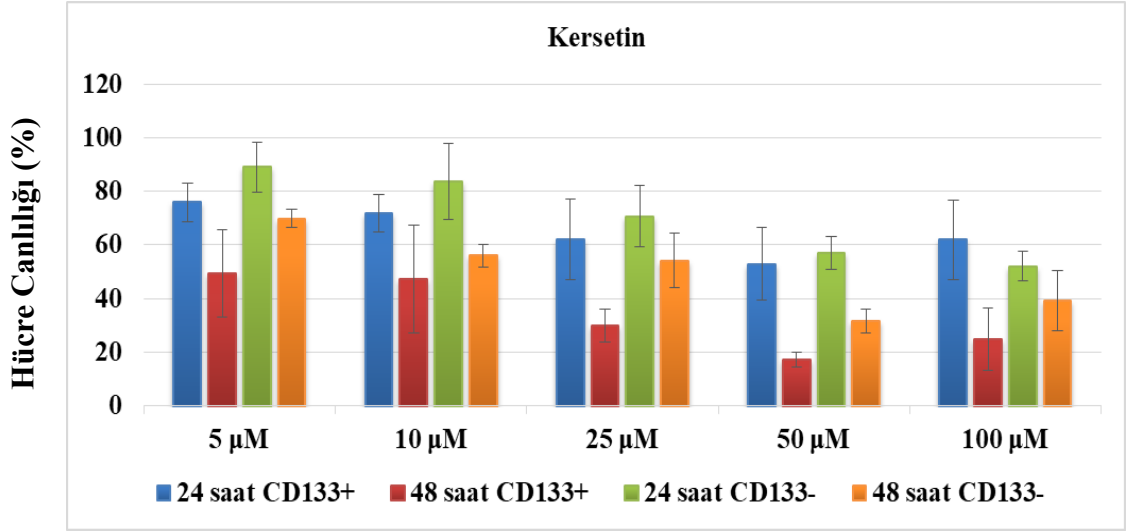
CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) resveratrol ve kersetin, 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Hücrelerin canlılığı, MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Resveratrol ve kersetinin tüm konsantrasyonlarının, PANC-1 hücre proliferasyonunu azalttığı ve doza ve zamana bağlı bir şekilde toksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Şekil 13 ve Şekil 14). Diğer konsantrasyonlara kıyasla resveratrolün 24 saat inkübasyon süresindeki 5 µM konsantrasyonunun, hem CD133+ hem de CD133- hücre büyümesini azaltmada daha etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 13). Ayrıca, diğer konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında kersetinin 48 saatlik inkübasyon süresindeki 10 µM konsantrasyonu, hem CD133+ hem de CD133- hücre büyümesini azaltmada daha etkili olmuştur (Şekil 14). Bu nedenle, anti-kanser aktivitelerini değerlendirmek için 24 saatlik 5 µM resveratrol ve 48 saatlik 10 µM kersetin konsantrasyonları kullanılmıştır.

MTT Testi



Şekil 13. Resveratrolün doz-yanıt sütunları ve IC_{50} değerleri. Hücre canlılığı, MTT testi ile ölçülmüştür. CD133+ ve CD133- hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) resveratrol uygulanmıştır.

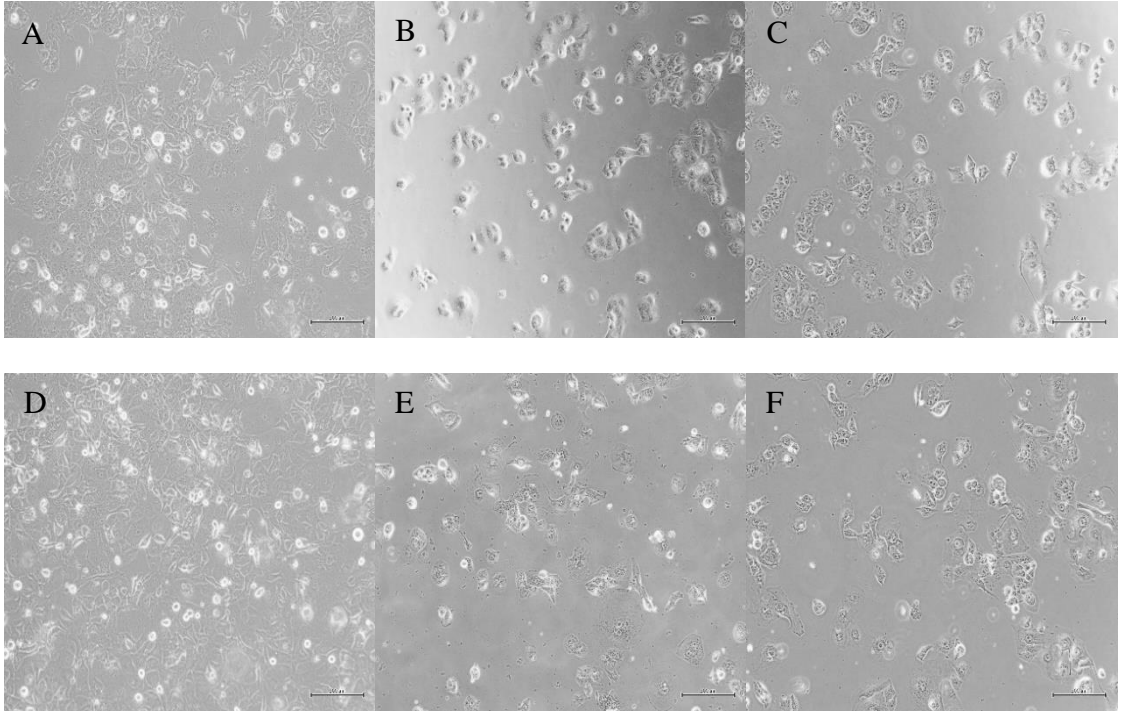
MTT Testi



Şekil 14. Kersetinin doz-yanıt sütünları ve IC₅₀ değerleri. Hücre canlılığı, MTT testi ile ölçülmüştür. CD133+ ve CD133- hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) kersetin uygulanmıştır.

4.3. Hücre Morfolojisi

Pankreas kanseri CD133+ ve CD133- hücreleri, epitelyal morfolojiye sahiptir ve tek tabakalı yapışma özelliklerine sahip ortamda kültüre edilir. Ayrıca, CD133+ ve CD133- hücrelerinin morfolojileri benzerdir (Resim 3 A ve Resim 3 C). Resveratrol (Resim 3 B ve Resim 3 E) veya kersetin (Resim 3 C ve Resim 3 F) uygulandıktan sonra, her iki PANC-1 CD133+ (Resim 3 B ve Resim 3 C) ve CD133- (Resim 3 E ve Resim 3 F) hücrelerinin şekilleri yine epitelooid iken, hücrelerin büyüklükleri daha küçüktür. Ayrıca, yüzen hücreler de tespit edilmiştir (Resim 3 B, Resim 3 C, Resim 3 E ve Resim 3 F).



Resim 3. İverted mikroskopta görüntülenen PANC-1 CD133+ (A-C) ve CD133- (D-F) hücreleri, resveratrol uygulandıktan sonra (B, E) ve kersetin uygulandıktan sonra (C, F). Ölçek: 200 µm

4.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Kersetin uygulanan CD133+ hücrelerinde ACTA-2 immünoboyaması zayıf-orta yoğunluğunda bulunmuştur (Resim 4 A ve Resim 4 B, Tablo 3). Kersetin uygulanan CD133+ hücrelerine göre kontrol grubunda, ACTA-2 immünoaktivitesi anlamlı olarak daha fazla saptanmıştır ($p=0.009$, Tablo 4). Kontrol grubu ve kersetin uygulanan CD133- hücrelerinde ACTA-2 için immünoboyama yoğunluğu orta derece olarak tespit edilmiştir (Resim 4 C ve Resim 4 D, Tablo 3). ACTA-2 için H-SKOR değerleri; 260.66 ± 4.77 , 171.16 ± 17.73 , 231.71 ± 17.79 ve 241.33 ± 25.01 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, CD133+ kontrol, kersetin uygulanan CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve kersetin uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). Ayrıca ACTA-2 için; kersetin uygulanan CD133- hücrelerin kontrol grubuna göre daha fazla H-SKOR'a sahip olduğu bulunmuş, fakat aralarındaki fark anlamlı olarak tespit edilmemiştir ($p>0.05$, Tablo 4).

Kersetin uygulanan CD133+ hücrelerinde ve kontrol grubunda IL-1 β 'nin immünoboyama yoğunluğu zayıf olarak bulunmuştur (Resim 4 E ve Resim 4 F, Tablo 3). Fakat, kersetin uygulanan CD133- hücrelerde IL-1 β immünoboyama yoğunluğu zayıf-orta derece olarak tespit edilmiştir (Resim 4 G ve Resim 4 H, Tablo 3). IL-1 β 'nin H-SKOR değerleri; 139.91 \pm 13.72, 105.66 \pm 2.49, 188.43 \pm 53.04 ve 186.33 \pm 32.25 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, CD133+ kontrol, kersetin uygulanan CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve kersetin uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). Kersetin uygulanan CD133+ ve CD133- hücreler ile karşılaştırıldığında, hem CD133+ (p=0.009) hem de CD133- (p>0.05) kontrol gruplarında IL-1 β için H-SKOR değerlerinin daha fazla olduğu görülmüştür (Tablo 4).

Kersetin uygulanan CD133+ ve CD133- hücrelerde N-kaderin immünoboyaması zayıf olarak bulunmuştur (Resim 4 I, Resim 4 J, Resim 4 K ve Resim 4 L, Tablo 3). N-kaderinin H-SKOR değerleri; 157.05 \pm 17.18, 104.89 \pm 4.48, 220.26 \pm 7.39 ve 144.56 \pm 21.41 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, CD133+ kontrol, kersetin uygulanan CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve kersetin uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). Ayrıca, kersetin uygulanan CD133+ (p=0.009) ve CD133- (p=0.009) hücrelerde N-kaderin için H-SKOR değerleri anlamlı olarak daha az tespit edilmiştir (Tablo 4).

Kersetin uygulanan CD133+ hücrelerde TNF- α immünoboyaması zayıf-orta derece olarak gösterilmiştir (Resim 4 M ve Resim 4 N, Tablo 3). TNF- α için H-SKOR değerleri; 111.87 \pm 10.15, 153.75 \pm 23.29, 214.60 \pm 16.84 ve 120.26 \pm 11.96 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, CD133+ kontrol, kersetin uygulanan CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve kersetin uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). Tablo 4'te gösterildiği gibi, kontrol grubuna göre kersetin uygulanan CD133+ hücrelerde TNF- α için H-SKOR anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (p=0.009). Kersetin uygulanan CD133- hücrelerde TNF- α immünoboyaması ise zayıf derece olarak tespit edilmiştir (Resim 4 O ve Resim 4 P, Tablo 3). Bunlara ek olarak, CD133- kontrol grubunda TNF- α immünoreaktivitesi anlamlı olarak daha fazla saptanmıştır (p=0.009, Tablo 4).

Kersetin uygulanan CD133+ hücrelerde ve kontrol grubunda vimentin immünoboyamasının yoğunluğu orta derece olarak görülmüştür (Resim 4 Q ve Resim 4 R, Tablo 3). Ayrıca; 210.47 \pm 6.76, 225.10 \pm 7.13, 235.38 \pm 7.88 ve 230.65 \pm 24.86 H-SKOR'ları vimentin için bulunmuştur (sırasıyla, CD133+ kontrol, kersetin uygulanan

CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve kersetin uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). Kersetin uygulanan CD133+ hücrelerde vimentin immünoaktivitesi anlamlı olarak daha fazla tespit edilmiştir ($p=0.016$, Tablo 4). Benzer olarak, kersetin uygulanan CD133- hücrelerde ve kontrol grubunda vimentin immünoaktivitesinin yoğunluğu orta derece olarak gösterilmiştir (Resim 4 S ve Resim 4 T, Tablo 3). CD133- kontrol grubunda vimentin H-SKOR'u daha fazla bulunmuş, fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$, Tablo 4).

Resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde ACTA-2 immünoaktivitesinin yoğunluğu zayıf-orta derece olarak bulunmuştur (Resim 5 A ve Resim 5 B, Tablo 3). ACTA-2 için H-SKOR değerleri; 253.47 ± 26.71 , 227.47 ± 5.35 , 262.74 ± 32.49 ve 265.68 ± 29.20 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, CD133+ kontrol, resveratrol uygulanan CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve resveratrol uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). Resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerine göre kontrol grubunda ACTA-2 immünoaktivitesi daha fazla tespit edilmiştir ($p>0.05$, Tablo 4). Kontrol grubu ve resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde ACTA-2 immünoaktivitesinin yoğunluğu orta derece olarak gösterilmiştir (Resim 5 C ve Resim 5 D, Tablo 3). Ayrıca, resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde ACTA-2 H-SKOR'u kontrol grubundan daha fazla bulunmuş, fakat aralarında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$, Tablo 4).

Resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde IL-1 β immünoaktivitesinin yoğunluğu zayıf-orta derece olarak bulunmuştur (Resim 5 E ve Resim 5 F, Tablo 3). IL-1 β için H-SKOR değerleri; 245.86 ± 17.45 , 228.36 ± 23.61 , 240.40 ± 22.53 ve 209.61 ± 20.20 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, CD133+ kontrol, resveratrol uygulanan CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve resveratrol uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). Resveratrol uygulanan CD133+ hücreler ile kıyaslandığında, CD133+ kontrol grubunda IL-1 β için H-SKOR daha fazla tespit edilmiştir ($p>0.05$, Tablo 4). Resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde IL-1 β immünoaktivitesinin yoğunluğu zayıf derece olarak saptanmıştır (Resim 5 G ve Resim 5 H, Tablo 3). Resveratrol uygulanan CD133- hücreler ile karşılaştırıldığında, CD133- kontrol grubunda IL-1 β için H-SKOR anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur ($p=0.028$, Tablo 4).

Resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde N-kaderin immünoboyamasının yoğunluğu zayıf-orta derece olarak tespit edilmiştir (Resim 5 I ve Resim 5 J, Tablo 3). N-kaderin için H-SKOR değerleri; 281.33±24.84, 212.14±10.16, 245.42±21.67 ve 246.59±21.68 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, CD133+ kontrol, resveratrol uygulanan CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve resveratrol uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). Resveratrol uygulanan CD133+ hücelere göre kontrol grubunda N-kaderin için H-SKOR anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (p=0.009, Tablo 4). Resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde N-kaderin immünoboyamasının yoğunluğu orta derece olarak gösterilmiştir (Resim 5 K ve Resim 5 L, Tablo 3). Kontrol grubuna göre resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde N-kaderin H-SKOR'u daha fazla tespit edilmiş, fakat aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır (p>0.05, Tablo 4).

Resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde TNF- α immünoboyamasının yoğunluğu zayıf derece olarak bulunmuştur (Resim 5 M ve Resim 5 N, Tablo 3). TNF- α için H-SKOR değerleri; 219.36±16.47, 158.25±13.84, 256.64±40.92 ve 226.57±16.25 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, CD133+ kontrol, resveratrol uygulanan CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve resveratrol uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). CD133+ kontrol grubunda TNF- α için immünoreaktivite anlamlı olarak daha fazla tespit edilmiştir (p=0.009, Tablo 4). Resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde TNF- α immünoboyamasının yoğunluğu zayıf-orta derece olarak bulunmuştur (Resim 5 O ve Resim 5 P, Tablo 3). CD133- kontrol grubunda TNF- α H-SKOR'u daha fazla saptanmıştır (p>0.05, Tablo 4).

Resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde ve kontrol grubunda vimentin immünoboyamasının yoğunluğu orta derece olarak tespit edilmiştir (Resim 5 Q ve Resim 5 R, Tablo 3). Benzer olarak, resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde ve kontrol grubunda vimentin immünoboyamasının yoğunluğu da orta derece olarak saptanmıştır (Resim 5 S ve Resim 5 T, Tablo 3). Ayrıca; 265.11±16.97, 258.44±5.68, 264.91±9.10 ve 268.35±18.48 H-SKOR'ları vimentin için bulunmuştur (sırasıyla, CD133+ kontrol, resveratrol uygulanan CD133+ hücreler, CD133- kontrol ve resveratrol uygulanan CD133- hücreler), (Tablo 4). Sırasıyla resveratrol uygulanan CD133+ hücreler ve CD133- kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CD133+ kontrol grubunda ve resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde vimentin için H-SKOR daha fazla tespit edilmiş, fakat aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır (p>0.05, Tablo 4).

Yapılan bu çalışmada, kersetin uygulanan CD133+ hücrelere göre kersetin uygulanan CD133- hücrelerde IL-1 β yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla saptanmıştır (p=0.009, Tablo 4). TNF- α yoğunluğu ise, kersetin uygulanan CD133+ hücrelerde (p=0.016) ve resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde (p=0.008) anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (Tablo 4). Ayrıca, kersetin ve resveratrol uygulanan CD133+ hücrelere göre kersetin ve resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde vimentin yoğunluğu daha fazla tespit edilmiş, fakat aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır (p>0.05, Tablo 4). Bunlara ek olarak, kersetin ve resveratrol uygulanan CD133+ hücreler ile karşılaştırıldığında, kersetin uygulanan CD133- hücrelerde (p=0.009) ve resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde (p=0.016) N-kaderin yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla saptanmıştır (Tablo 4). Kersetin ve resveratrol uygulanan CD133+ hücrelere kıyasla, kersetin uygulanan CD133- hücrelerde (p=0.009) ve resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde (p=0.021) ACTA-2 yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla tespit edilmiştir (Tablo 4).

Kersetin uygulanan CD133- hücreler (p=0.021), resveratrol uygulanan CD133+ hücreler (p=0.001) ve CD133- hücreler (p=0.001) ile karşılaştırma yapıldığı zaman, kersetin uygulanan CD133+ hücrelerin anlamlı olarak en düşük IL-1 β yoğunluğuna sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 4). TNF- α yoğunluğu, resveratrol uygulanan CD133- hücrelere kıyasla kersetin uygulanan CD133+ hücrelerde anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır (p=0.003, Tablo 4). Fakat, kersetin uygulanan CD133- hücrelere göre resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde TNF- α yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla tespit edilmiştir (p=0.009, Tablo 4). Ayrıca, kersetin uygulanan CD133- hücrelere göre resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde TNF- α yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla belirlenmiştir (p=0.000, Tablo 4).

Kersetin uygulanan CD133+ hücrelere göre resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde vimentin yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (p=0.000, Tablo 4). Ayrıca kersetin uygulanan CD133+ hücrelere göre resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde vimentin yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla tespit edilmiştir (p=0.020, Tablo 4). Kersetin uygulanan CD133+ hücrelere kıyasla, resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde (p=0.000) ve CD133- hücrelerde (p=0.000) N-kaderin yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla saptanmıştır (Tablo 4). Ayrıca kersetin uygulanan CD133- hücrelere göre resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde (p=0.004) ve

CD133- hücrelerde (p=0.000) N-kaderin yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (Tablo 4). Kersetin uygulanan CD133+ hücreler ile karşılaştırıldığında, resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerde (p=0.006) ve CD133- hücrelerde (p=0.003) ACTA-2 yoğunluğu anlamlı olarak daha fazla tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 3. 10 µM kersetin (48 saat) ve 5 µM resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerinde ACTA-2, IL-1β, N-kaderin, TNF-α ve vimentin immünoboyamaları

	ACTA-2	IL-1β	N-kaderin	TNF-α	Vimentin
CD133+ Kontrol	++	+	+ /+++	+	++
Kersetin CD133+	+ /+++	+	+	+ /+++	++
CD133- Kontrol	++	+	+ /+++	+ /+++	++
Kersetin CD133-	++	+ /+++	+	+	++
CD133+ Kontrol	++	++	++ /+++	+ /+++	++
Resveratrol CD133+	+ /+++	+ /+++	+ /+++	+	++
CD133- Kontrol	++	++	+ /+++	++	++
Resveratrol CD133-	++	+	++	+ /+++	++

Tablo 4. 10 µM kersetin (48 saat) ve 5 µM resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerinde ACTA-2, IL-1β, N-kaderin, TNF-α ve vimentin H-SKOR değerleri

	ACTA-2	IL-1β	N-kaderin	TNF-α	Vimentin
CD133+ Kontrol	260.66±4.77	139.91±13.72	157.05±17.18	111.87±10.15	210.47±6.76
Kersetin CD133+	171.16±17.73 ^a	105.66±2.49 ^a	104.89±4.48 ^a	153.75±23.29 ^a	225.10±7.13 ^a
CD133- Kontrol	231.71±17.79	188.43±53.04	220.26±7.39	214.60±16.84	235.38±7.88
Kersetin CD133-	241.33±25.01	186.33±32.25	144.56±21.41 ^b	120.26±11.96 ^b	230.65±24.86
CD133+ Kontrol	253.47±26.71	245.86±17.45	281.33±24.84	219.36±16.47	265.11±16.97
Resveratrol CD133+	227.47±5.35	228.36±23.61	212.14±10.16 ^c	158.25±13.84 ^c	258.44±5.68
CD133- Kontrol	262.74±32.49	240.40±22.53	245.42±21.67	256.64±40.92	264.91±9.10
Resveratrol CD133-	265.68±29.20	209.61±20.20 ^d	246.59±21.68	226.57±16.25	268.35±18.48
Kersetin CD133+	171.16±17.73	105.66±2.49	104.89±4.48	153.75±23.29	225.10±7.13
Kersetin CD133-	241.33±25.01 ^e	186.33±32.25 ^e	144.56±21.41 ^e	120.26±11.96 ^e	230.65±24.86
Resveratrol CD133+	227.47±5.35	228.36±23.61	212.14±10.16	158.25±13.84	258.44±5.68
Resveratrol CD133-	265.68±29.20 ^f	209.61±20.20	246.59±21.68 ^f	226.57±26.25 ^f	268.35±18.48
	0.003 ^g	0.004 ^g	0.001 ^g	0.001 ^g	0.019 ^g

Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir.

Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testleri kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır.

^aCD133+ kontrol grubu ve kersetin uygulanan CD133+ hücreler arasındaki anlamlı fark (p<0.05)

^bCD133- kontrol grubu ve kersetin uygulanan CD133- hücreler arasındaki anlamlı fark (p<0.05)

^cCD133+ kontrol grubu ve resveratrol uygulanan CD133+ hücreler arasındaki anlamlı fark (p<0.05)

^dCD133- kontrol grubu ve resveratrol uygulanan CD133- hücreler arasındaki anlamlı fark (p<0.05)

^eKersetin uygulanan CD133+ ve CD133- hücreler arasındaki anlamlı fark (p<0.05)

^fResveratrol uygulanan CD133+ ve CD133- hücreler arasındaki anlamlı fark (p<0.05)

^gDört grup arasındaki anlamlı fark (kersetin uygulanan CD133+ hücreler, kersetin uygulanan CD133- hücreler, resveratrol uygulanan CD133+ hücreler ve resveratrol uygulanan CD133- hücreler), (p<0.05)

Tablo 5'te 10 µM kersetin (48 saat) ve 5 µM resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikollarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri gösterilmiştir. Kersetin CD133+ kontrol grubu, kersetin uygulanan CD133+ hücreleri, kersetin uygulanan CD133- hücreleri ve resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikollarının H-SKOR değerleri arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur (p<0.05).

Kersetin CD133+ kontrol grubunda, ACTA-2 ve vimentin ile ACTA-2 ve N-kaderin antikollarının H-SKOR değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir

($p < 0.05$). ACTA-2 için H-SKOR değeri daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Tablo 5 a). 10 μ M kersetin (48 saat) uygulanan CD133+ hücrelerinde, vimentin ve ACTA-2 ile vimentin ve N-kaderin antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p < 0.05$). Vimentin için H-SKOR değeri daha yüksek olarak saptanmıştır (Tablo 5 b). 10 μ M kersetin (48 saat) uygulanan CD133- hücrelerinde, N-kaderin ve vimentin ile N-kaderin ve ACTA-2 antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0.05$). N-kaderin için H-SKOR değeri daha düşük olarak bulunmuştur (Tablo 5 c). 5 μ M resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ hücrelerinde, vimentin ve N-kaderin ile vimentin ve ACTA-2 antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p < 0.05$). Vimentin için H-SKOR değeri daha yüksek saptanmıştır (Tablo 5 d).

Tablo 5. 10 μ M kersetin (48 saat) ve 5 μ M resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri

	Kersetin CD133+ Kontrol	Kersetin CD133+ Kontrol	Kersetin CD133- Kontrol	Kersetin CD133- Kontrol
Vimentin				
N-kaderin	0.002 ^a	0.002 ^b	0.090	0.008 ^c
ACTA-2				
	Resveratrol CD133+ Kontrol	Resveratrol CD133+ Kontrol	Resveratrol CD133- Kontrol	Resveratrol CD133- Kontrol
Vimentin				
N-kaderin	0.278	0.004 ^d	0.428	0.416
ACTA-2				

Tablo 5. a. Kersetin CD133+ kontrol grubunda vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikollarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri

Kersetin CD133+ Kontrol		p
Vimentin	N-kaderin	0.003
	ACTA-2	0.000
N-kaderin	Vimentin	0.003
	ACTA-2	0.000
ACTA-2	Vimentin	0.000
	N-kaderin	0.000

Tablo 5. b. 10 µM kersetin (48 saat) uygulanan CD133+ hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikollarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri

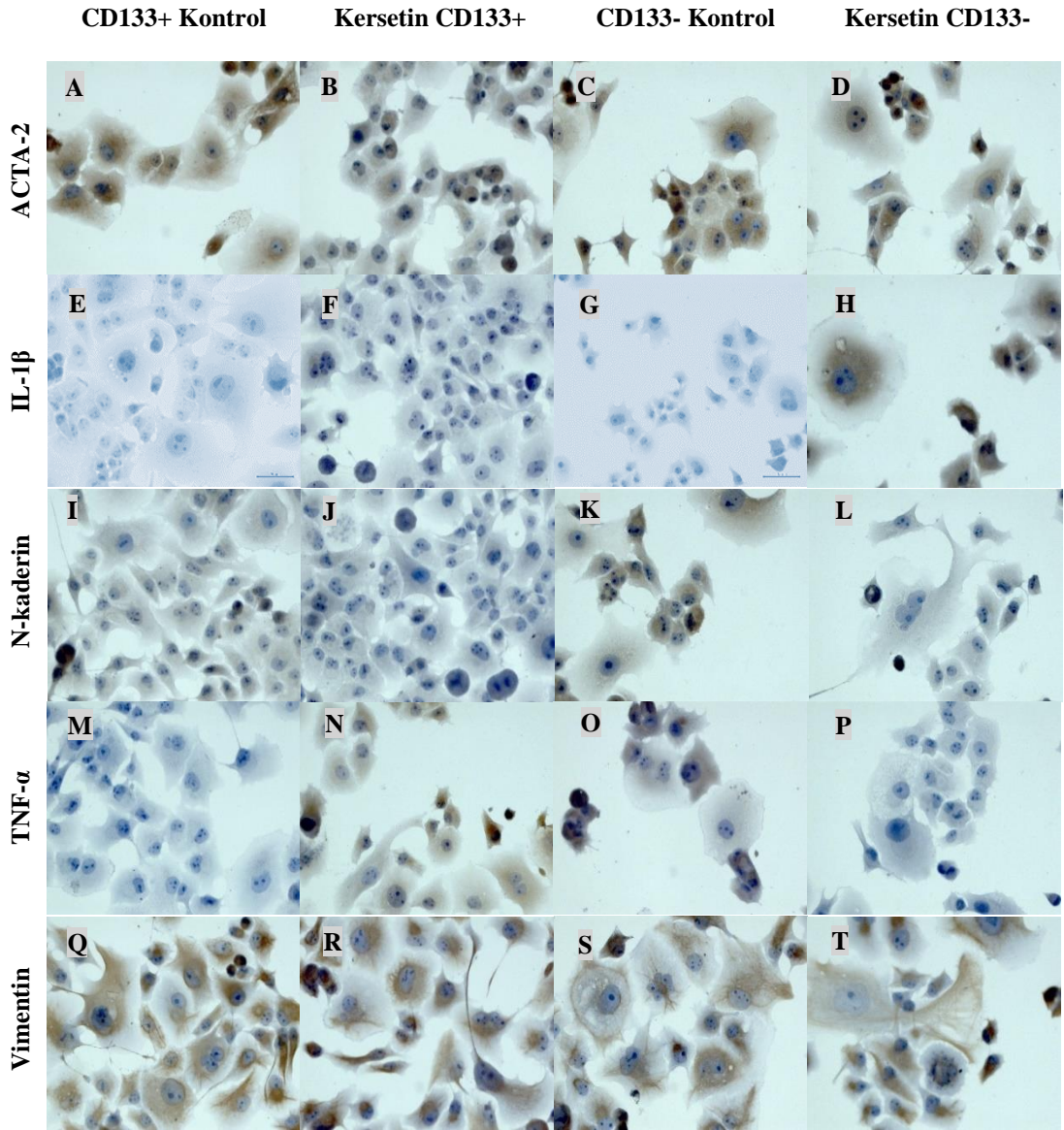
Kersetin CD133+		p
Vimentin	N-kaderin	0.000
	ACTA-2	0.003
N-kaderin	Vimentin	0.000
	ACTA-2	0.002
ACTA-2	Vimentin	0.003
	N-kaderin	0.002

Tablo 5. c. 10 µM kersetin (48 saat) uygulanan CD133- hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikollarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri

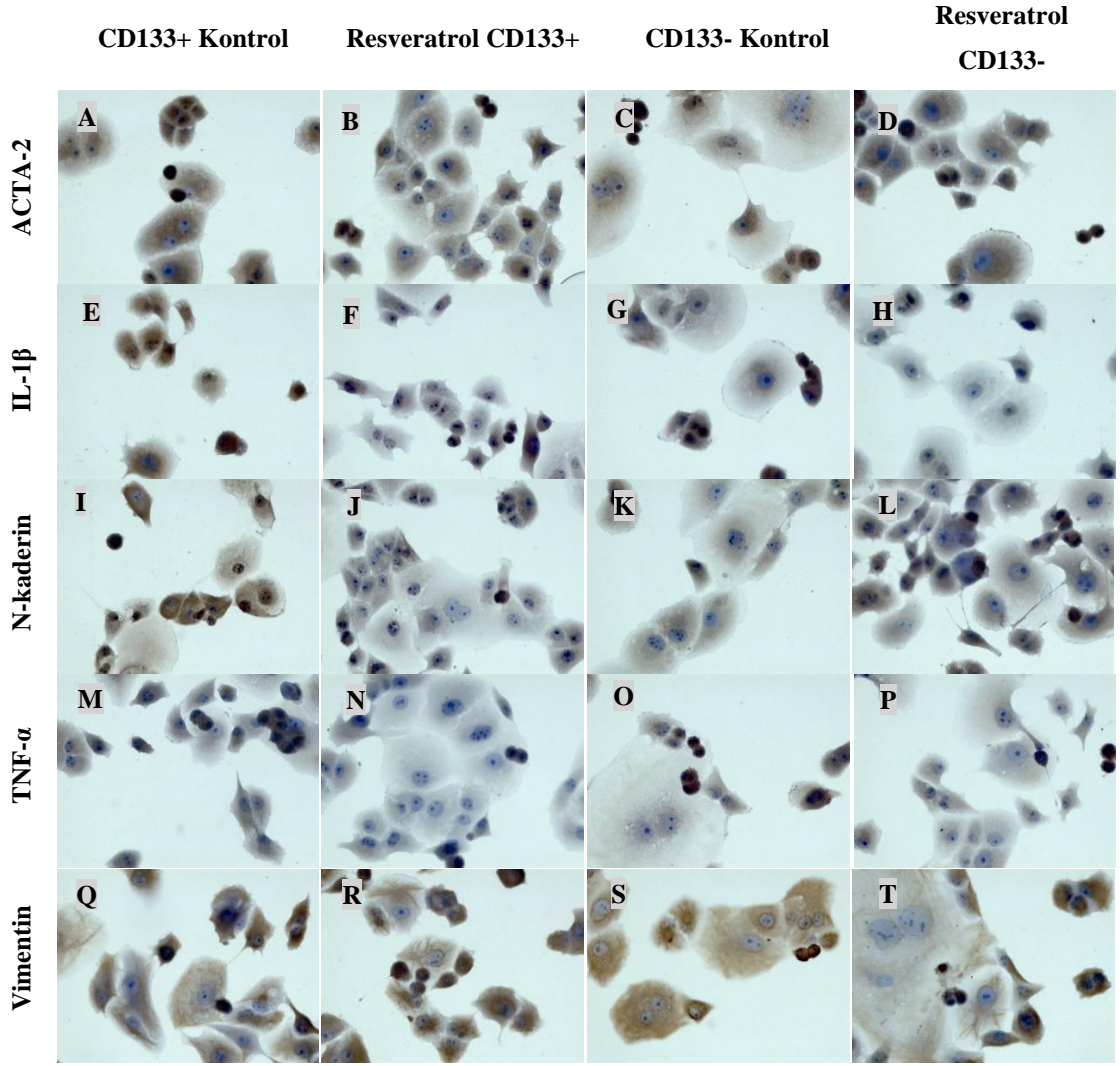
Kersetin CD133-		p
Vimentin	N-kaderin	0.001
	ACTA-2	0.872
N-kaderin	Vimentin	0.001
	ACTA-2	0.001
ACTA-2	Vimentin	0.872
	N-kaderin	0.001

Tablo 5. d. 5 μ M resveratrol (24 saat) uygulanan CD133+ hücrelerinde vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 antikorlarının H-SKOR değerleri arasındaki anlamlılık dereceleri

Resveratrol CD133+		p
Vimentin	N-kaderin	0.000
	ACTA-2	0.000
N-kaderin	Vimentin	0.000
	ACTA-2	0.064
ACTA-2	Vimentin	0.000
	N-kaderin	0.064



Resim 4. Standart kültür şartlarında ve 10 μ M kersetin ile 48 saat kültüre edilen PANC-1 CD133+ ve CD133- hücrelerinde ACTA-2, IL-1 β , N-kaderin, TNF- α ve vimentin immünoreaktiviteleri (A-T, Ölçek: 100 μ m)



Resim 5. Standart kültür şartlarında ve 5 μ M resveratrol ile 24 saat kültüre edilen PANC-1 CD133+ ve CD133- hücrelerinde ACTA-2, IL-1 β , N-kaderin, TNF- α ve vimentin immünoaktiviteleri (A-T, Ölçek: 100 μ m)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Resveratrol ve kersetin, kanser kök hücre aktivitesini baskılayarak anti-kanser aktivite gösteren ve birçok bitki türünde bulunan polifenolik bileşiklerdendir (Shukla ve Singh, 2011; Gupta ve Pramanik, 2016). Birçok çalışma, kersetin ve resveratrolün farklı kanser hücre hatlarında (oral kanser hücreleri, meme kanseri kök hücreleri, prostat kanseri hücreleri vb.) EMT yeteneğini azaltabileceğini göstermiştir (Chen ve ark., 2013; Tsai ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016; Kim ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018). Resveratrol ve kersetin pankreas kanseri kök hücresi üzerinde ayrı ayrı çalışılmış olmasına rağmen, şimdiye kadar pankreas kanseri kök hücresinde epitelyal-mezenkimal transisyon ile resveratrol ve kersetin (birlikte kullanıldığı) arasındaki ilişki hakkında bir çalışma yapılmamıştır.

Farklı hücre ayırma yöntemleri bulunmaktadır. MiniMACS, hücreleri pozitif seleksiyon ile manyetik olarak ayıran hızlı ve pratik bir yöntemdir. Pankreas kanseri kök hücrelerinde; CD44+ ve CD24+ hücelere göre CD133+ hücreler, daha fazla tümör oluşturma ve metastatik potansiyele sahiptir. Bu nedenle, CD133'ün anlamlı olarak hücre yüzey belirteci olabileceği önerilmiştir (Lee ve ark., 2011). Cao ve ark. (2015), pankreas kanseri kök hücrelerinde kersetinin CD133 ekspresyonunu azaltabileceğini göstermiştir. Ayrıca, resveratrolün yüksek oranda tümörjenik olan insan pankreas kanseri kök hücre özelliklerini (CD133+CD44+CD24+ESA+) inhibe edebileceği de başka bir çalışmada bulunmuştur (Shankar ve ark., 2011). Yapılan bu çalışmada da MiniMACS yöntemi ile PANC-1 hücrelerindeki CD133+ hücreler pozitif seleksiyon ile elde edilmiştir. Ayrıca resveratrol ve kersetin uygulaması sonrasında, CD133+ hücrelerin canlılığında ve proliferasyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir. 25 µM dozunda ve 48, 72 ve 96 saat sürelerinde uygulanan kersetinin, pankreas kanseri kök hücrelerinde CD24 ve CD133 hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, transwell testi kullanılarak invazyon özelliğine bakılmıştır. Bu teste göre, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında kersetinin pankreas kanseri kök hücrelerinin invaziv aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur (Cao ve ark., 2015).

Epitelyal-mezenkimal transisyonu belirlemek için çeşitli belirteçler kullanılmaktadır. Sitokeratinler, E-kaderin ve integrinler en sık kullanılan epitelyal belirteçlerdir. Fibronektin, N-kaderin ve vimentin ise mezenkimal belirteçlerdir. E-kaderinden N-kaderine geçiş, epitelyal-mezenkimal transisyonu gözlemek için kullanılabilir (Zhou ve ark., 2017). İnsan pankreas kanseri PATU-8988 hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki (0, 20, 40 ve 80 μ M) kersetin 24 saat boyunca uygulanmıştır. Çalışmada kersetinin N-kaderinde mesajcı Ribonükleik Asit (mRNA) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Yu ve ark., 2017). Ayrıca, kersetinin baş ve boyun kanseri kaynaklı küre hücrelerinde EMT ile ilişkili proteinleri (N-kaderin ve vimentin) doza bağımlı bir şekilde (12.5, 25 ve 50 μ M) azalttığı görülmüştür (Chang ve ark., 2012). Bu çalışmada N-kaderin için H-SKOR sonuçlarına göre, kersetin uygulanan hem CD133+ hem de CD133- PANC-1 hücrelerinde N-kaderin immünoaktivitesinde anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur. Ayrıca, resveratrol uygulanan CD133+ hücrelerine göre kontrol grubunda N-kaderin immünoboyama yoğunluğu anlamlı olarak daha fazlaydı. Kontrol grubuna göre resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde N-kaderin için H-SKOR daha fazlaydı, fakat anlamlı değildi. Bu nedenle, kersetin ve resveratrolün N-kaderin ekspresyonunu azaltarak pankreas kanseri kök hücrelerinin mezenkimal özelliklerini inhibe edebileceği düşünülmektedir.

Glioblastoma, yetişkinlerde en sık görülen ve malign olan intrakraniyal tümördür. Glioblastomanın invaziv fenotipi, kötü prognozun esas nedenidir. Resveratrol (40 μ M, 48 saat), LN18 ve U87 glioblastoma hücrelerinde Smad-bağımlı sinyal yolağını düzenleyerek, EMT'yi inhibe edici özellik göstermektedir. EMT belirteçlerinden N-kaderin ve vimentin proteinlerinin ekspresyonunda azalma olduğu saptanmıştır. Bunlara ek olarak, glioblastoma hücrelerinde EMT ile uyarılan kendini yenileme yeteneğinde azalma olduğu da tespit edilmiştir (Song ve ark., 2019). Kersetinin kolon kanseri hücrelerinde akciğer metastazını, apoptozu uyararak (p38 mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı ile) ve metastatik özellikleri baskılayarak inhibe ettiği deneysel in vivo metastaz modelinde gösterilmiştir. Kersetinin toksik olmayan konsantrasyonları (10, 50 ve 100 μ M) uygulandığında, N-kaderin ekspresyonunda azalma olduğu bulunmuştur. Fare modelinde kersetinin kolorektal akciğer metastazında etkili terapötik ajan olabileceği düşünülmektedir (Kee ve ark.,

2016). *In vitro* ortamda pankreas kanseri kök hücrelerinde yapılan ve resveratrol ve kersetinin anti-metastatik etkilerinin incelendiği bu çalışma *in vivo* ortamda yapılırsa, hayvanlar üzerindeki anti-metastatik etkilerin araştırılmasına da katkı sağlayacaktır.

Tümör nekrozis faktör-alfa, sitokinlerden biridir. İnflamatuar süreçten hemen sonra eksprese edilmekte ve hücre ölümüne neden olabilmektedir. Özellikle kanser kök hücrelerinde tümörün progresyonunda önemlidir. Ayrıca, epitelyal-mezenkimal transisyonu uyarabilir ve kök hücre özelliklerini artırabilir (Zhang ve ark., 2018). TNF- α ile benzer şekilde tümör nekrozis faktör-beta (TNF- β); hücre proliferasyonunu, morfolojik değişiklikleri ve epitelyal-mezenkimal transisyonu anlamlı olarak uyarmaktadır. EMT parametrelerinin ekspresyonuna (vimentinde artma ve E-kaderinde azalma) neden olarak migrasyona/invazyona ve kanser kök hücrelerinin oluşumunun artmasına neden olabildiği kolorektal kanser hücrelerinde bulunmuştur. Fakat, resveratrol uygulaması sonrasında bu etkilerde önemli ölçüde azalma olduğu tespit edilmiştir. Böylece, mezenkimal-epitelyal transisyona doğru biyokimyasal değişiklikler gözlenmiş ve kanser kök hücrelerinin oluşumu baskılanmıştır (Buhrmann ve ark., 2019). İnflamasyon, pankreas adenokarsinomunun (PA) önemli bir özelliğidir. Farelerde karaciğer metastazı üzerinde yapılan çalışmada, TNF- α ve interferon-gamanın (IFN- γ) pankreas adenokarsinom hücrelerinin invazyonunu uyarabileceği gösterilmiştir. Böylece, pankreas adenokarsinom hücrelerinin EMT yeteneğine sahip olabileceği öngörülmüştür (Zhou ve ark., 2016). Yapılan bu çalışmada, kontrol grubuna göre kersetin uygulanan CD133+ hücrelerde TNF- α için H-SKOR anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur. Fakat, resveratrol uygulanan CD133+ hücreler ile karşılaştırıldığında CD133+ kontrol grubunda, TNF- α için H-SKOR anlamlı olarak daha fazla saptanmıştır. Bu nedenle, CD133+ PANC-1 hücrelerinde resveratrolde ziyade kersetin uygulaması sonrasında TNF- α ekspresyonu tetiklenebilir. Bunlara ek olarak, kersetin ve resveratrol inkübasyonu sonrasında, TNF- α ekspresyonunun resveratrol uygulanan CD133- PANC-1 hücrelere göre resveratrol uygulanan CD133+ PANC-1 hücrelerde daha az olduğu görülmüştür. Fakat, TNF- α ekspresyonu kersetin uygulanan CD133+ PANC-1 hücrelere göre CD133- PANC-1 hücrelerde daha azdı. Bu sonuçlar, CD133+ PANC-1 hücrelerde resveratrolün TNF- α ekspresyonunu inhibe edebileceğini göstermektedir. İnsan renal karsinom ACHN ve 786-0 hücreleri ile ilgili yapılan çalışmada, 14 gün boyunca 50 ng/ml TNF- α uygulaması sonrasında hücrelerin

epitelyal morfolojilerini kaybettiği görülmüştür. Western blot yöntemi kullanılarak vimentin ekspresyonunda artma ve E-kaderin ekspresyonunda azalma olduğu belirlenmiştir. TNF- α 'ya maruz kalma sonucunda, hücrelerde EMT uyarılmış ve hücreler mezenkimal profil kazanmıştır (Zhang ve ark., 2014).

İnterlökin-1 (IL-1), interlökin-1 alfa (IL-1 α) ve IL-1 β aktivatör sitokinlerini ve IL-1 reseptör antagonist inhibitör sitokinini içermektedir. IL-1 α ve IL-1 β , aynı reseptöre (tip 1 IL-1 reseptörü) bağlanmaktadır (Baker ve ark., 2019). IL-1 β , inflamatuvar sinyallerden uyarılmakta ve hem metastaz hem de tümör büyümesine neden olabilmektedir (Bent ve ark., 2018). Nomura ve ark. (2018), pankreas kanseri hücrelerinde IL-1 β 'nin nükleer faktör-kappa B'yi (NF- κ B) aktive edebileceğini göstermiştir. IL-1 β , hücrelerde anlamlı olarak NF- κ B aktivasyonunu artırarak ve CD133'ü aşırı miktarda eksprese ederek epitelyal-mezenkimal transisyona neden olabilmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, kersetin ve resveratrol uygulanan hücrelere kıyasla, CD133+ ve CD133- kontrol gruplarında IL-1 β immünoreaktivitesinin daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, pankreas kanseri kök hücrelerinde resveratrol ve kersetinin IL-1 β ekspresyonunu azaltabileceği ve NF- κ B yolağı aracılığı ile inflamasyonu azaltabileceği düşünülmektedir.

Kersetinin alveoler epitel hücreli karsinom A549 hücreleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kersetinin IL-1 β aracılığı ile hücreler arası adezyon molekülü-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) ekspresyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Doza bağımlı olarak (0, 1 ve 10 μ M) kersetinin IL-1 β ile uyarılan ICAM-1 mRNA ekspresyonunu azaltıcı potansiyel etkisi olduğu görülmüştür. Çalışmada kersetinin NF- κ B aktivitesini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (Ying ve ark., 2009). Alzheimer Hastalığı, ilerleyici hafıza kaybı olan ve demansla sonuçlanan nörodejeneratif bir bozukluktur. Amiloid-beta ($A\beta$) peptidlerinin bu hastalığın patogeneğinde önemli görevi vardır ve inflamasyona ve oksidatif stresin gelişmesine neden olduğu düşünülmektedir. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK), inflamasyon ve oksidatif strese yanıt olarak hücresel enerji homeostazı ve hücre sağkalımında esas düzenleyicidir. Resveratrol, AMPK'nın güçlü aktivatörüdür ve resveratrolün Alzheimer Hastalığı'na karşı terapötik potansiyeli olabileceği düşünülmektedir. İnsan nöral kök hücrelerinde $A\beta$ -aracılı nöronal bozukluk olabilmektedir. $A\beta$ birikimi sonucunda nöral kök hücrelerinde, hücre canlılığında

anlamli olarak azalma olduğu saptanmıştır. Bu durum, TNF- α ve IL-1 β inflamatuvar sitokinlerinin ekspresyonlarında artış ile ilişkilendirilmiştir. Resveratrol uygulaması sonrasında A β -aracılı etkilerin (TNF- α ve IL-1 β ekspresyonlarında artma) anlamli olarak ortadan kalktığı gözlenmiştir. Böylece, resveratrolün nöroprotektif etkilerini AMPK-bağımlı yolakla gerçekleştirebildiği ortaya konulmuştur (Chiang ve ark., 2018).

En sık kullanılan kanserle-ilişkili fibroblastlardan (cancer-associated fibroblasts, CAFs) biri ACTA-2'dir (Shiga ve ark., 2015). MG-63 ve U2OS insan osteosarkoma hücre hatlarında ACTA-2 ekspresyonu olduğu anlamli olarak bulunmuştur (Wang ve ark., 2017). Yapılan bu çalışmada, CD133- hücelere göre CD133+ PANC-1 hücelerde kersetin ve resveratrol uygulaması sonrasında ACTA-2 ekspresyonunda anlamli olarak azalma olduğu gösterilmiştir. Böylece, resveratrol ve kersetinin pankreas kanseri kök hücelerinde mezenkimal transisyonu inhibe ederek metastazı önleyebileceği düşünölmektedir.

Huang ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada; kersetinin etkili bir şekilde TGF- β 1 ile uyarılan pulmoner arter endotel hücelerinin proliferasyonunu ve düz kas benzeri hücelere farklılaşmasını inhibe edici özellik gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, alfa-düz kas aktin (alpha-smooth muscle actin, α -SMA) yani ACTA-2 proteininin ekspresyonunda azalma olduğu da tespit edilmiştir. Pankreatik stellat (yıldız) hücelerinin aktive olması, kronik pankreatitte pankreatik fibrozisin başlamasına ve pankreas kanseri hücelerinde malignitenin gerçekleşmesine neden olabilmektedir. 50 μ M resveratrol uygulaması sonrasında, hidrojen peroksit ile uyarılan pankreatik stellat hücelerinin aktivasyonunda, invazyonunda ve migrasyonunda azalma olduğu görölmüştür. Bunlara ek olarak, hidrojen peroksit inkübasyonu sonrasında α -SMA veya ACTA-2 ekspresyonunda artış olurken, resveratrol uygulaması sonrasında bu etkinin tam tersine α -SMA veya ACTA-2 proteininin ekspresyonunda azalma olduğu bulunmuştur (Yan ve ark., 2018).

Kanser hücelerinin yayılması, hücelerin vimentin gibi mezenkimal belirteçleri kazanarak metastaz potansiyelinin artması ile ilişkili olmasıyla açıklanmaktadır (Beuran ve ark., 2015). Wang ve ark. (2016), resveratrolün PC-3 prostat kanseri hücre büyümesini inhibe edebileceğini ve EMT ile ilişkili belirteçleri etkileyebileceğini

(azalmış vimentin ve artmış E-kaderin seviyeleri) göstermiştir. Yapılan bu çalışmada, sırasıyla CD133+ kontrol grubu ve kersetin uygulanan CD133- hücreler ile karşılaştırıldığında, kersetin uygulanan CD133+ hücrelerde ve CD133- kontrol grubunda vimentin H-SKOR'unun anlamlı olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, CD133+ kontrol grubu (resveratrol için) ve resveratrol uygulanan CD133- hücrelerde vimentin H-SKOR'u da daha fazla bulunmuştur. Kersetine kıyasla resveratrolün vimentin ekspresyonunda daha fazla etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. IL-6, EMT'yi uyararak kanser hücrelerinde invazyonu destekleyebilir. PATU-8988 pankreas kanseri hücrelerinde kersetinin (80 µM, 24 saat) IL-6 ile uyarılan EMT'yi ve MMP sekresyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, kersetin uygulaması sonrasında E-kaderinde artma, N-kaderin ve vimentinde azalma olduğu görülmüştür. Böylece, kersetinin invazyon ve metastaz sürecini tersine çevirdiği sonucuna varılmıştır (Yu ve ark., 2017).

Lipopolisakkaritin (LPS) prostat kanser PC-3 ve LNCaP hücrelerinde EMT'ye neden olmak için kullanıldığı bir çalışmada, resveratrol uygulaması sonrasında anti-metastatik etkiler araştırılmıştır. LPS, morfolojik değişikliklerle EMT özelliklerinin kazanılmasına ve hücre motilitesinde artışa neden olabilmektedir. Mezenkimal belirteçlerden vimentin ekspresyonunda artış olurken, epitelyal belirteçlerden E-kaderin ekspresyonunda azalma olmuştur. Resveratrol uygulaması sonrasında hücre motilitesinde, invazyonda ve EMT belirteçlerinin ekspresyonunda azalma olduğu saptanmıştır (Li ve ark., 2014). Sun ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmaya göre; insan meme kanseri MDA231 hücrelerinde 50 µM resveratrol uygulaması sonrasında, TGF-β1 ile uyarılan EMT belirteçlerinde değişiklik (vimentinde azalma ve E-kaderinde artma) olduğu sonucuna varılmıştır. CD44+ ve CD133+ popülasyonlarını içeren insan prostat kanseri hücre hattında, epigallokateşin gallat (epigallocatechin gallate, EGCG) uygulaması sonrasında kanser kök hücrelerinin kendini yenileme kapasitesi inhibe edilmiştir. EGCG'nin vimentin ekspresyonunu inhibe ederek epitelyal-mezenkimal transisyonu önlediği bulunmuştur. Aynı zamanda, kanser kök hücrelerinin migrasyonunu ve invazyonunu geciktirerek, erken metastazdaki sinyal yollarını bloke ettiği düşünülmüştür. İlginç bir şekilde EGCG, kersetin ile birlikte kullanıldığında sinerjik etki göstererek, prostat kanseri kök hücrelerinin kendini yenileme özelliklerini inhibe ettikleri, apoptozu uyardıkları, migrasyon ve invazyonu

önledikleri de tespit edilmiştir (Tang ve ark., 2010). Yapılan bu çalışmada E-kaderin gibi epitelyal belirteçlerin kullanılması ve fenolik besin bileşenleri olan kersetin ve resveratrolün epitelyal belirteçlerin ekspresyonunu artırdığını gösterilmesi, anti-metastatik etkilerin açıklanmasına katkıda bulunabilir.

Resveratrolün, reaktif oksijen türlerini (ROT) temizleme ve bazı antioksidan enzimlerin aktivitesini artırma gibi kemoprotektif etkileri bulunmaktadır. Resveratrolün, proinflamatuvar sitokinleri (IL-1 β , TNF- α gibi) inhibe edici ve matriks metalloproteinazların (MMP) ekspresyonunu azaltıcı potansiyel etkileri de vardır (Xiao ve ark., 2019). Matriks metalloproteinazların tümör progresyonu süresince invazyona neden oldukları bilinmektedir. Matriks metalloproteinazların invazyondaki mekanizması, genellikle hücre dışı matriksi ve bazal membran bileşenlerini proteolitik olarak parçalayarak hücrel migrasyona neden olmasıyla açıklanmaktadır. Özellikle MMP-14, tümör hücrelerini hücre dışı matriks aracılığı ile kontrol etmede görevli olan matriks metalloproteinazlardan biridir ve tümör hücresinde migrasyona ve invazyona neden olabilmektedir (Kessenbrock ve ark., 2015). İnsan hepatokarsinoma HCCLM3 hücreleri ile yapılan çalışmada, kontrol grubuna göre (0 μ mol) 36 saatlik 40 μ mol kersetin uygulanan hücrelerde, MMP-2 ve MMP-9 proteinlerinin ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Bunun sonucunda, kersetin uygulanan HCCLM3 hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneğinin inhibe olduğu bulunmuştur (Lu ve ark., 2018). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) A549 hücrelerinde 24 saatlik 50 μ M kersetin uygulaması sonrasında, A549 hücrelerinde invazyonun inhibe edildiği tespit edilmiştir. Akciğer kanserinde, uzak metastazda önemli rolü olan MMP-9 ekspresyonunda azalma olduğu da bulunmuştur. Ayrıca, Snail-aracılı EMT'nin baskılandığı sonucuna varılmıştır (Chang ve ark., 2017).

Özellikle tip 3 EMT, kanser hücrelerinde görülür ve tümör metastazı sırasında diseminasyon, invazyon gibi birkaç farklı aşamada önemli yere sahiptir. Metastatik tümör hücreleri, kan dolaşımı aracılığı ile migrasyon yapabilme potansiyeline sahiptir ve bazı durumlarda mezenkimal-epitelyal transisyon yoluyla diğer bölgelerde sekonder tümörler oluşturabilir. Tip 3 EMT sırasında; bazı hücreler mezenkimal özellikler kazanırken, bazıları epitel özelliklerini koruyabilmektedir. Bazı hücreler ise, tamamen mezenkimal olabilmektedir (Polireddy ve Chen, 2016).

Kanser hücreleri, çoklu hayatta kalma sinyal yollarını kullanarak EMT ve metastaz yapma yeteneğinden dolayı normal hücelere karşı üstünlük sağlamaktadır. Polifenollerden olan resveratrol, bu sinyal yollarını baskılayarak kanserin önlenmesi ve tedavisinde etkili olabilmektedir. EMT sürecinde mezenkimal hücre morfolojisi oluşarak, hücreler migrasyon özelliği kazanmaktadır. Resveratrolün TGF- β , NF- κ B ve Hedgehog sinyal yolları ile uyarılan EMT-ilişkili morfolojik değişiklikleri geriye döndürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca resveratrol, migrasyon ve invazyonla ilişkili olan moleküllerden MMP ekspresyonunu inhibe edici potansiyel etkiye de sahiptir (Kim ve ark., 2016). Li ve ark. (2013) pankreas kanseri hücreleri (BxPC-3 ve Panc-1 hücreleri) üzerinde yaptıkları çalışmada; resveratrolün doza bağlı bir şekilde hem Akt hem de NF- κ B fosforilasyonunu güçlü bir şekilde azalttığını saptamıştır. Prostat kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmada, 24 saat boyunca 20 μ M konsantrasyonunda uygulanan kersetinin, MMP-9 sekresyonunu ve kanser kök hücresi belirtecinin (CD44) ekspresyonunu inhibe edebileceği bulunmuştur. Bunun sonucunda migrasyonda ve invazyonda anlamlı bir gecikme olduğu belirlenmiştir (Tsai ve ark., 2016).

Resveratrol, tümör proteini 53 (p53)-bağımlı ve p53-bağımsız apoptozu uyarıcı etki göstermektedir. p53, onkogen baskılayıcı bir proteindir ve normal hücrelerde düşük seviyelerde bulunmaktadır. Değişik stres durumlarında (Deoksiribonükleik Asit (DNA) hasarı gibi) hücrel p53 aktivitesinde artış olmaktadır. p53'ün hücre döngüsü duraksaması, apoptoz, genom bütünlüğü ve DNA onarımı üzerinde çeşitli etkileri vardır. Amino (N)-terminal ucunda p53 proteini fosforilasyonu (serin) ve karboksi (C)-terminal ucunda p53 proteini asetilasyonu (lizin) arasında bir bağlantı vardır. Resveratrol, kanser hücrelerinde bu fosforilasyon ve asetilasyon reaksiyonlarını uyarıcı etki göstererek apoptoza neden olabilmektedir (Lin ve ark., 2011b). Kersetin, biyolojik çevrede redoks durumuna bağlı olarak hem pro-oksidatif hem de anti-oksidatif özellik göstermektedir. Kanser hücrelerinde kersetin ile uyarılan reaktif oksijen türlerinin oluşumunun artmasıyla birlikte pro-apoptotik etki görülerek apoptoz meydana gelebilmektedir (Jeong ve Joo, 2016). Shang ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada; 160 μ M kersetin uygulanan insan gastrik kanser AGS hücrelerinde kersetinin reaktif oksijen türleri oluşturarak, kalsiyum (Ca^{+2}) üretimini artırarak ve mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak, apoptotik hücre ölümünü uyardığı

bulunmuştur. Yapılan bu tez çalışmasında kullanılan resveratrol ve kersetinin pankreas kanseri hücrelerinde toksik etkilerinin olduğuna bağlı kalarak, bu fenolik besin bileşenlerinin apoptozda görev alan proteinlerin ekspresyonlarında etkileri olduğu düşünülmektedir.

Farklı dozlarda (10, 20, 40, 80 ve 120 μM) kullanılan kersetinin 9 kanser hücresi hattında (kolon kanseri CT-26 hücreleri, prostat adenokarsinomu LNCaP hücreleri, insan prostat PC3 hücreleri, feokromositoma PC12 hücreleri, östrojen reseptör-pozitif meme kanseri MCF-7 hücreleri, akut lenfoblastik lösemi MOLT-4 T-hücreleri, insan miyelom U266B1 hücreleri, insan lenfoid Raji hücreleri ve over kanseri CHO hücreleri) çeşitli IC_{50} değerleri ile birlikte hücre büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. CT-26, LNCaP, MOLT-4 ve Raji hücre hatlarında kersetin uygulaması sonrası apoptozun anlamlı bir şekilde uyarıldığı tespit edilmiştir. Hücre büyümesinin inhibisyonu, apoptozun uyarılması ile açıklanmıştır. Bunun sonucunda, kersetinin neoplazide terapötik uygulama için kullanılabileceği önerilmiştir (Hashemzaei ve ark., 2017).

Kersetinin insan servikal kanser HeLa hücrelerindeki canlılığa etkisinin incelendiği bir çalışmada, farklı kersetin konsantrasyonları (1, 5, 10, 15, 25, 35, 50, 60, 75, 100, 125 ve 150 μM) uygulanan HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saatlik sürelerde hücre büyümesinde anlamlı derecede azalma olduğu doza ve zamana bağlı olarak görülmüştür. Hücre canlılığının %50 oranında inhibe edildiği konsantrasyon, 100 μM (24 saatlik inkübasyon periyodu) olarak belirlenmiştir. Ayrıca, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 25 μM kersetin uygulaması sonrasında HeLa hücrelerinde, hücre canlılığı 24 saatte %13 ve 48 saatte %20 oranlarında anlamlı olarak azalmıştır (Sundaram ve ark., 2019). Farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 μM) resveratrol ve kersetin uygulanan CD133+ ve CD133- PANC-1 hücrelerinde, hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirilmiştir. Resveratrol ve kersetinin tüm konsantrasyonların doza ve zamana bağımlı olarak PANC-1 hücre proliferasyonunu azalttığı ve toksik etkinin olduğu görülmüştür. Ayrıca, 24 saatlik inkübasyon periyodundaki 5 μM resveratrol ve 48 saatlik inkübasyon periyodundaki 10 μM kersetin konsantrasyonları, diğer konsantrasyon dozlarına ve zamana göre CD133+ ve CD133- hücre büyümesini inhibe etmede daha etkili olmuştur. Kersetin, malign hücrelerde canlılığı seçici olarak azaltabilmektedir. Malign olmayan primer insan

pankreas hücrelerinde (CRL-4023) ve malign pankreas hücrelerinde (BxPC-3) kersetinin etkisinin incelendiği bir çalışmada, kersetinin farklı konsantrasyonları (10, 20, 30, 50 ve 100 µM) kullanılmış ve MTT testi ile hücre canlılığı analiz edilmiştir. 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda, kersetin dozuna bağlı olarak malign BxPC-3 hücrelerinin sayısında ve canlılığında önemli derecede azalma olduğu tespit edilmiştir. Bunun aksine, kersetin uygulanan malign olmayan primer insan pankreas hücrelerinin (CRL-4023) canlılığında herhangi bir azalma olmadığı görülmüştür (Fan ve ark., 2016). Yapılan başka bir çalışmaya göre; 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerindeki farklı resveratrol konsantrasyonları (12.5, 25, 50, 100 ve 200 µM) uygulanan BxPC-3 ve Panc-1 pankreas kanseri hücrelerinin proliferatif yeteneklerinde doza ve zamana bağlı olarak azalma olduğu bulunmuştur. Hem BxPC-3 hem de Panc-1 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermeyen %50 inhibe edici konsantrasyon, yaklaşık 50 µM idi (Li ve ark., 2013).

Mikro-Ribonükleik Asitlerin (miRNA) embriyonik gelişme ve kanser progresyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Epitelyal tümör hücrelerinde EMT fenotipi kazanılması ile ilişkili olduğu da bulunmuştur. miRNA'lar, küçük (19-24 nükleotitten oluşan) ve gen ekspresyonunu inhibe eden, kodlanmayan Ribonükleik Asit (RNA) molekülleridir. Bunun sonucunda, mRNA'larda hem translasyonel represyon hem de degradasyon meydana gelebilmektedir (Kong ve ark., 2011).

Fu ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada; resveratrol türevi olan triasetil resveratrolün, pankreas kanseri hücrelerinde anti-kanser aktiviteleri miRNA düzeyinde incelenerek anti-metastatik özellikler belirtilmiştir. Triasetil resveratrolün miRNA-200 ekspresyonunu uyararak ve sonic hedgehog (Shh) yolağını baskılayarak anti-metastatik özellik gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca triasetil resveratrolün, insan pankreatik kanser AsPC-1 ve PANC-1 hücrelerinde koloni oluşumunu inhibe ettiği ve kaspaz-3 aktivasyonu aracılığıyla apoptozu uyardığı bulunmuştur. Fakat, insan pankreas normal duktal epitel HPNE hücrelerinde hiçbir etki tespit edilmemiştir. Bunlara ek olarak, triasetil resveratrolün E-kaderin ekspresyonunu uyararak ve N-kaderin ekspresyonunu baskılayarak EMT'yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Resveratrolün, p53 yolağı aracılığıyla tümör-baskılayıcı miRNA'ları (miR-34a, miR-424 ve miR-503) uyararak meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiği

gösterilmiştir. miR-34a, p53'ün direkt hedefidir ve hücre döngüsünün geçiş fazı 1'de (G₁ fazında) duraksaması sonucunda apoptoz uyarılmaktadır (Otsuka ve ark., 2018).

Mikro-RNA-let-7, ilk tanımlanan miRNA'lardan biridir ve insan kanser türlerinde let-7 ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak düşük miktardadır. Let-7'nin majör fonksiyonu, genleri hedef alarak gelişme aşamasında terminal farklılaşmayı sağlamak ve onkogenleri (Myc ve Ras) hedef alarak tümör büyümesini baskılamaktır. Ayrıca let-7'nin, Notch sinyal yolağını düzenleyerek birçok hücre sel süreçte (hücre proliferasyonu, apoptoz, migrasyon, invazyon, anjiyogenez ve normal gelişim) görev aldığı bilinmektedir. 50 µM kersetinin uygulandığı pankreas kanseri kök hücrelerinde kersetin ile uyarılan let-7c'nin, Notch yolağını indirekt olarak inhibe ederek tümör büyümesini azalttığı ve apoptozu artırdığı bulunmuştur (Nwaeburu ve ark., 2016). Kersetinin hepatosellüler kanser HepG2 ve Huh7 hücrelerinde anti-tümör etkilerinin araştırıldığı çalışmada, miR-34a'nın önemli görevi olduğu tespit edilmiştir. miR-34a, p53 ve sirtuin 1 (SIRT1) arasında bağlantıyı sağlayan molekül olarak düşünülmektedir. Böylece, p53/miR-34a/SIRT1 sinyal geribildirim döngüsü aracılığıyla karaciğer kanseri hücrelerinde p53 ile ilişkili apoptoz sinyallerinde artış olabilmekte ve apoptoz gerçekleşebilmektedir (Lou ve ark., 2015). Yapılan bu tez çalışmasının kapsamında olmamasına rağmen, mikro RNA'ların kullanılması veya belirli sinyal yollarının tanımlanması, moleküler mekanizmaların daha net bir şekilde gösterilmesine önemli derecede katkı sağlayabilir.

Lu ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmaya göre; miR-200a transfeksiyonu sonucunda EMT fenotipinden MET fenotipine geçin sağlanmasıyla, pankreas kanseri kök hücrelerinde selektif eliminasyon gerçekleşmiştir. miR-200a'nın aşırı miktarda ekspresyonu, N-kaderin ve vimentinin azalmasına ve E-kaderinin artmasına neden olmuştur. Bunun sonucunda, kanser kök hücrelerinde migrasyon ve invazyon inhibe edilmiştir. Ayrıca, invazyonda 0.33 kat azalma ve migrasyonda 0.22 kat azalma olduğu görülmüştür.

Kanser kök hücrelerinde çoklu sinyal yolları (TGF-β sinyal yolağı, Wnt/β-katenin, Hedgehog ve Notch sinyal yolları, NF-κB sinyal yolağı, PI3K/Akt sinyal yolağı vb.) bulunmaktadır. Bu sinyal yollarında; kanser kök hücre özelliğinin desteklenmesi, kanser kök hücre sessizliğinin uyarılması, farklılaşmanın

uyarılması, immün sistemin baskılanması, metastazın uyarılması, kanser kök hücre-tümör mikro ortam etkileşimlerinin artması, kanser kök hücre sağkalımının desteklenmesi ve oksidatif modülatör gibi olaylar gerçekleşmektedir (Najafi ve ark., 2019). Bu nedenle kanser kök hücrelerindeki sinyal yollarının tanımlanması, hangi moleküler mekanizmaların gerçekleştiği hakkında daha detaylı bilgi elde edilmesine katkı sağlayacaktır.

Her iki maddenin (resveratrol ve kersetin) farklı hücrelerde farklı etkileri olabilir (normal, patolojik, kanser, kanser kök hücresi vb.). Özellikle bu maddeler, hücre canlılığı ve dolayısıyla hücre morfolojisinde değişikliklere neden olabilir. Bu iki maddenin hücrelerde EMT üzerindeki rolleri henüz bilinmemektedir. Morfolojik değişiklikler ve EMT (epitelyal veya mezenkimal özellikler gibi) arasında da bir ilişki vardır. Kersetin hücre morfolojisi üzerinde daha fazla etkiye sahiptir ve bundan dolayı hücrelerin epitelyal ve mezenkimal özelliklerini etkileyebilir.

Pankreas kanseri, diğer kanser türlerine göre minimum sağkalımı olan ve mortalitesi yüksek olan bir kanser türüdür. Pankreas kanseri, hiyerarşik olarak kanser hücrelerinden oluşan heterojen bir popülasyona sahiptir. Bu popülasyonda özellikle kanser kök hücreleri bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar doğrultusunda, birçok fitokimyasalın kanser kök hücresi aktivitesini baskılayarak koruyucu etki (anti-kanser aktivite) gösterdiği ileri sürülmüştür. Resveratrol ve kersetin gibi fitokimyasalların, pankreas kanserinde kök hücre aktivitesini inhibe ederek anti-metastatik etkiler göstereceği öngörülmüştür. Yapılan bu tez çalışmasında, pankreas kanseri kök hücrelerinde resveratrol ve kersetinin anti-kanser ve anti-metastatik aktivitelerini belirlemek için MTT testi ve immünohistokimya boyaması kullanılmıştır. Sonuç olarak, hem CD133+ hem de CD133- PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde resveratrol ve kersetinin çeşitli konsantrasyonları kullanılarak sitotoksik ve anti-kanser etkileri çalışılmıştır. Pankreas kanseri hücrelerinde resveratrol ve kersetinin metastaz ile ilişkili olan IL-1 β , TNF- α , vimentin, N-kaderin ve ACTA-2 ekspresyonlarını etkilediği görülmüştür. N-kaderin ve ACTA-2 immünoreaktivitesindeki azalma, vimentin immünoreaktivitesindeki artmadan daha fazla olduğundan dolayı, kersetinin pankreas kanseri kök hücrelerinde epitelyal-mezenkimal transisyonu resveratrol'den daha fazla önleyebileceği öngörülmektedir. Bu çalışma, pankreas kanseri kök hücrelerinde, resveratrol ve kersetin ile epitelyal-

mezenkimal transisyon arasındaki ilişki ile ilgili özgün bir çalışma olarak literatüre katkı sağlayacaktır. İn vitro ortamda yapılan bu tez çalışması, in vivo ortamdaki çalışmalar ve klinik çalışmalar için öncül olacaktır. Resveratrol ve kersetinin pankreas kanseri kök hücreleri üzerindeki belirli etkilerini anlamak için gerekli sinyal yolları tanımlanmalıdır. Ayrıca, bu etkilerin daha iyi belirlenebilmesi için resveratrol ve kersetin ile ilgili hayvan ve insan çalışmaları olarak daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Yapılan tez çalışmasının sonuçları doğrultusunda belirlenen öneriler aşağıda verilmiştir:

- Resveratrol ve kersetinin pankreas kanseri kök hücrelerindeki etkilerini in vivo ortamda araştırmak
- Resveratrol ve kersetinin pankreas kanseri kök hücrelerindeki etkilerini klinik uygulamalar kapsamında araştırmak
- Resveratrol ve kersetinin etkilerini farklı kanser kök hücre hatları üzerinde incelemek
- MTT ve immünohistokimya testleri için resveratrol ve kersetini farklı inkübasyon sürelerinde uygulamak
- Epitelyal-mezenkimal transisyonda etkili olan sinyal yollarını belirlemek
- Apoptozla ilgili olan proteinlerin ekspresyonlarını incelemek ve bulgularla karşılaştırmak
- Resveratrol ve kersetin ile ilgili tıbbi beslenme tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için daha fazla sayıda epidemiyolojik ve klinik çalışmalar yapmak
- Epitelyal-mezenkimal transisyon için bakılan mezenkimal belirteçlere ek olarak, epitelyal belirteçlere bakılarak anti-metastatik verileri doğrulamak

6. KAYNAKLAR

Abba Y, Hassim H, Hamzah H, Noordin MM. Antiviral activity of resveratrol against human and animal viruses. *Advances in Virology*. 2015;1-7.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*. 2018;1-76.

Andres S, Pevny S, Ziegenhagen R, Bakhiya N, Schäfer B, Hirsch-Ernst KI. ve arkadaşları. Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2018;62(1):1700447-1700461.

Baker KJ, Houston A, Brint E. IL-1 family members in cancer; two sides to every story. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1197-1212.

Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 beta-A friend or foe in malignancies?. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(8):2155-2188.

Beuran M, Negoï I, Paun S, Ion AD, Bleotu C, Negoï RI. ve arkadaşları. The epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer: A systematic review. *Pancreatology*. 2015;15(3):217-225.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. ve arkadaşları. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424.

Bu Y, Cao D. The origin of cancer stem cells. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*. 2012;4:819-830.

Buhrmann C, Yazdi M, Popper B, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Shakibaei M. Induction of the epithelial-to-mesenchymal transition of human colorectal cancer by human TNF- β (lymphotoxin) and its reversal by resveratrol. *Nutrients*. 2019;11(3):704-722.

Cao C, Sun L, Mo W, Sun L, Luo J, Yang Z. ve arkadaşları. Quercetin mediates β -catenin in pancreatic cancer stem-like cells. *Pancreas*. 2015;44(8):1334-1339.

Chang JH, Lai SL, Chen WS, Hung WY, Chow JM, Hsiao M. ve arkadaşları. Quercetin suppresses the metastatic ability of lung cancer through inhibiting Snail-dependent Akt activation and Snail-independent ADAM9 expression pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2017;1864(10):1746-1758.

Chang WW, Hu FW, Yu CC, Wang HH, Feng HP, Lan C. ve arkadaşları. Quercetin in elimination of tumor initiating stem-like and mesenchymal transformation property in head and neck cancer. *Head & Neck*. 2012;35(3):413-419.

Chen SF, Nien S, Wu CH, Liu CL, Chang YC, Lin YS. ve arkadaşları. Reappraisal of the anticancer efficacy of quercetin in oral cancer cells. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2013;76(3):146-152.

Chiang MC, Nicol CJ, Cheng YC. Resveratrol activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against amyloid-beta-induced inflammation and oxidative stress. *Neurochemistry International*. 2018;115:1-10.

Cianciosi D, Varela-Lopez A, Forbes-Hernandez TY, Gasparri M, Afrin S, Reboredo-Rodriguez P. ve arkadaşları. Targeting molecular pathways in cancer stem cells by natural bioactive compounds. *Pharmacological Research*. 2018;135:150-165.

Del Follo-Martinez A, Banerjee N, Li X, Safe S, Mertens-Talcott S. Resveratrol and quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic microRNA-27a. *Nutrition and Cancer*. 2013;65(3):494-504.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Safety of synthetic trans-resveratrol as a novel food pursuant to regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal*. 2016;14(1):4368-4397.

Elshaer M, Chen Y, Wang XJ, Tang X. Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life Sciences*. 2018;207:340-349.

Fan P, Zhang Y, Liu L, Zhao Z, Yin Y, Xiao X. ve arkadaşları. Continuous exposure of pancreatic cancer cells to dietary bioactive agents does not induce drug resistance unlike chemotherapy. *Cell Death & Disease*. 2016;7(6):1-12.

Fitzgerald TL, McCubrey JA. Pancreatic cancer stem cells: Association with cell surface markers, prognosis, resistance, metastasis and treatment. *Advances in Biological Regulation*. 2014;56:45-50.

Fu J, Shrivastava A, Shrivastava SK, Srivastava RK, Shankar S. Triacetyl resveratrol upregulates miRNA-200 and suppresses the Shh pathway in pancreatic cancer: A potential therapeutic agent. *International Journal of Oncology*. 2019;54(4):1306-1316.

Guerra F, Guaragnella N, Arbini AA, Bucci C, Giannattasio S, Moro L. Mitochondrial dysfunction: A novel potential driver of epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Frontiers in Oncology*. 2017;7(295):1-9.

Gupta S, Pramanik D. Phytochemicals and cancer stem cells: A pancreatic cancer overview. *Current Chemical Biology*. 2016;10(2):98-108.

Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari A, Heravi RE, Tabrizian K, Taghdisi SM. ve arkadaşları. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*. 2017;38(2):819-828.

Heeschen C, Sancho P. More challenges ahead-metabolic heterogeneity of pancreatic cancer stem cells. *Molecular & Cellular Oncology*. 2016;3(2):1-3.

Huang S, Zhu X, Huang W, He Y, Pang L, Lan X. ve arkadaşları. Quercetin inhibits pulmonary arterial endothelial cell transdifferentiation possibly by Akt and Erk1/2 pathways. *Biomed Research International*. 2017;1-8.

Jeong CH, Joo SH. Downregulation of reactive oxygen species in apoptosis. *Journal of Cancer Prevention*. 2016;21(1):13-20.

Kee JY, Han YH, Kim DS, Mun JG, Park J, Jeong MY. ve arkadaşları. Inhibitory effect of quercetin on colorectal lung metastasis through inducing apoptosis, and suppression of metastatic ability. *Phytomedicine*. 2016;23(13):1680-1690.

Kessenbrock K, Wang CY, Werb Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biology*. 2015;44:184-190.

Kim CW, Hwang KA, Choi KC. Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of malignant cancer cells. *Phytomedicine*. 2016;23(14):1787-1796.

Kim SE, Shin SH, Lee JY, Kim CH, Chung IK, Kang HM. ve arkadaşları. Resveratrol induces mitochondrial apoptosis and inhibits epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma cells. *Nutrition and Cancer*. 2018;70(1):125-135.

Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-phenotypic cells: Are they cousins or twins?. *Cancers*. 2011;3(1):716-729.

Kumar DS, Shankar P, Rao GU. Health benefits of resveratrol. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2009;2(1):407-412.

Kumar R, Vijayalakshmi S, Nadanasabapathi S. Health benefits of quercetin. *Defence Life Science Journal*. 2017;2(2):142-151.

Lee HJ, You DD, Choi DW, Choi YS, Kim SJ, Won YS. ve arkadaşları. Significance of CD133 as a cancer stem cell markers focusing on the tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines. *Journal of the Korean Surgical Society*. 2011;81(4):263-270.

Lee J, Han SI, Yun JH, Kim JH. Quercetin 3-O-glucoside suppresses epidermal growth factor-induced migration by inhibiting EGFR signaling in pancreatic cancer cells. *Tumor Biology*. 2015;36(12):9385-9393.

Li J, Chong T, Wang Z, Chen H, Li H, Cao J. ve arkadaşları. A novel anti-cancer effect of resveratrol: Reversal of epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. 2014;10(4):1717-1724.

Li W, Ma J, Ma Q, Li B, Han L, Liu J. ve arkadaşları. Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF- κ B pathway. *Current Medicinal Chemistry*. 2013;20(33):4185-4194.

Lin HY, Tang HY, Davis FB, Davis PJ. Resveratrol and apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011b;1215(1):79-88.

Lin YS, Tsai PH, Kandaswami CC, Cheng CH, Ke FC, Lee PP. ve arkadaşları. Effects of dietary flavonoids, luteolin, and quercetin on the reversal of epithelial-mesenchymal transition in A431 epidermal cancer cells. *Cancer Science*. 2011a;102(10):1829-1839.

Lou G, Liu Y, Wu S, Xue J, Yang F, Fu H. ve arkadaşları. The p53/miR-34a/SIRT1 positive feedback loop in quercetin-induced apoptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;35(6):2192-2202.

Lu J, Wang Z, Li S, Xin Q, Yuan M, Li H. ve arkadaşları. Quercetin inhibits the migration and invasion of HCCLM3 cells by suppressing the expression of p-Akt1, matrix metalloproteinase (MMP) MMP-2, and MMP-9. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2018;24:2583-2589.

Lu Y, Lu J, Li X, Zhu H, Fan X, Zhu S. ve arkadaşları. MiR-200a inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer stem cell. *BMC Cancer*. 2014;14(1):85-93.

Maeda K, Ding Q, Yoshimitsu M, Kuwahata T, Miyazaki Y, Tsukasa K. ve arkadaşları. CD133 modulate HIF-1 α expression under hypoxia in EMT phenotype pancreatic cancer stem-like cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(7):1025-1036.

Massi A, Bortolini O, Ragno D, Bernardi T, Sacchetti G, Tacchini M. ve arkadaşları. Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents. *Molecules*. 2017;22(8):1270-1296.

Morandi A, Taddei ML, Chiarugi P, Giannoni E. Targeting the metabolic reprogramming that controls epithelial-to-mesenchymal transition in aggressive tumors. *Frontiers in Oncology*. 2017;7(40):1-19.

Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sciences*. 2019;234:116781-116791.

Nomura A, Gupta VK, Dauer P, Sharma NS, Dudeja V, Merchant N. ve arkadaşları. NF κ B-mediated invasiveness in CD133+ pancreatic TICs is regulated by autocrine and paracrine activation of IL1 signaling. *Molecular Cancer Research*. 2018;16(1):162-172.

Nwaeburu CC, Bauer N, Zhao Z, Abukiwan A, Gladkich J, Benner A. ve arkadaşları. Up-regulation of microRNA Let-7c by quercetin inhibits pancreatic cancer progression by activation of Numbl. *Oncotarget*. 2016;7(36):58367-58380.

Otsuka K, Yamamoto Y, Ochiya T. Regulatory role of resveratrol, a microRNA-controlling compound, in HNRNPA1 expression, which is associated with poor prognosis in breast cancer. *Oncotarget*. 2018;9(37):24718-24730.

Pistollato F, Giampieri F, Battino M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;75:58-70.

Planas JM, Colom H, Juan M. Resveratrol: A polyphenol with multiple effects. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2011;2:101-120.

Polireddy K, Chen Q. Cancer of the pancreas: Molecular pathways and current advancement in treatment. *Journal of Cancer*. 2016;7(11):1497-1514.

Prakash D, Gupta C. Role of phytoestrogens as nutraceuticals in human health. *Pharmacologyonline*. 2011;1:510-523.

Rao CV, Mohammed A. New insights into pancreatic cancer stem cells. *World Journal of Stem Cells*. 2015;7(3):547-555.

Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of pancreatic cancer: Global trends, etiology and risk factors. *World Journal of Oncology*. 2019;10(1):10-27.

Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Kheir TB, Jagust P, Schoenhals M. ve arkadaşları. MYC/PGC-1 α balance determines the metabolic phenotype and plasticity of pancreatic cancer stem cells. *Cell Metabolism*. 2015;22(4):590-605.

Scarpa ES, Ninfali P. Phytochemicals as innovative therapeutic tools against cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):15727-15742.

Shang HS, Lu HF, Lee CH, Chiang HS, Chu YL, Chen A. ve arkadaşları. Quercetin induced cell apoptosis and altered gene expression in AGS human gastric cancer cells. *Environmental Toxicology*. 2018;33(11):1168-1181.

Shankar S, Nall D, Tang SN, Meeker D, Passarini J, Sharma J. ve arkadaşları. Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition. *Plos One*. 2011;6(1):1-13.

Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers*. 2015;7(4):2443-2458.

Shukla Y, Singh R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1215(1):1-8.

Song Y, Chen Y, Li Y, Lyu X, Cui J, Cheng Y. ve arkadaşları. Resveratrol suppresses epithelial-mesenchymal transition in GBM by regulating Smad-dependent signaling. *Biomed Research International*. 2019;1-14.

Sun Y, Zhou QM, Lu YY, Zhang H, Chen QL, Zhao M. ve arkadaşları. Resveratrol inhibits the migration and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer by reversing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecules*. 2019;24(6):1131-1146.

Sundaram MK, Raina R, Afroze N, Bajbouj K, Hamad M, Haque S. ve arkadaşları. Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells. *Bioscience Reports*. 2019;39(8):1-17.

Tanase CP, Enciu AM, Cruceru ML, Necula LG, Neagu AI, Calenic B. ve arkadaşları. Stem cells in pancreatic cancer. *Pancreatic cancer-insights into molecular mechanisms and novel approaches to early detection and treatment*. Intech. 2014;1-33.

Tang SN, Singh C, Nall D, Meeker D, Shankar S, Srivastava RK. The dietary bioflavonoid quercetin synergizes with epigallocatechin gallate (EGCG) to inhibit prostate cancer stem cell characteristics, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Molecular Signaling*. 2010;5(1):14-28.

Taylor WF, Jabbarzadeh E. The use of natural products to target cancer stem cells. *American Journal of Cancer Research*. 2017;7(7):1588-1605.

Tsai PH, Cheng CH, Lin CY, Huang YT, Lee LT, Kandaswami CC. ve arkadaşları. Dietary flavonoids luteolin and quercetin suppressed cancer stem cell properties and metastatic potential of isolated prostate cancer cells. *Anticancer Research*. 2016;36(12):6367-6380.

Wang R, Yang L, Li S, Ye D, Yang L, Liu Q. ve arkadaşları. Quercetin inhibits breast cancer stem cells via downregulation of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), chemokine receptor type 4 (CXCR4), mucin 1 (MUC1), and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2018;24:412-420.

Wang YM, Wang W, Qiu ED. Osteosarcoma cells induce differentiation of mesenchymal stem cells into cancer associated fibroblasts through Notch and Akt signaling pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2017;10(8):8479-8486.

Wang Z, Wu L, Tong S, Hu X, Zu X, Li Y. ve arkadaşları. Resveratrol suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition in PC-3 cells by down-regulating the PI3K/AKT signaling pathway. *Animal Cells and Systems*. 2016;20(2):77-85.

Xiao Q, Zhu W, Feng W, Lee SS, Leung AW, Shen J. ve arkadaşları. A review of resveratrol as a potent chemoprotective and synergistic agent in cancer chemotherapy. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;9(1534):1-10.

Yan B, Cheng L, Jiang Z, Chen K, Zhou C, Sun L. ve arkadaşları. Resveratrol inhibits ROS-promoted activation and glycolysis of pancreatic stellate cells via suppression of miR-21. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;1-15.

Ying B, Yang T, Song X, Hu X, Fan H, Lu X. ve arkadaşları. Quercetin inhibits IL-1 beta-induced ICAM-1 expression in pulmonary epithelial cell line A549 through the MAPK pathways. *Molecular Biology Reports*. 2009;36(7):1825-1832.

Yu D, Ye T, Xiang Y, Shi Z, Zhang J, Lou B. ve arkadaşları. Quercetin inhibits epithelial–mesenchymal transition, decreases invasiveness and metastasis, and reverses IL-6 induced epithelial–mesenchymal transition, expression of MMP by inhibiting STAT3 signaling in pancreatic cancer cells. *Oncotargets and Therapy*. 2017;10:4719-4729.

Zhang L, Jiao M, Wu K, Li L, Zhu G, Wang X. ve arkadaşları. TNF- α induced epithelial mesenchymal transition increases stemness properties in renal cell carcinoma cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2014;7(12):4951-4958.

Zhang S, Yang X, Wang L, Zhang C. Interplay between inflammatory tumor microenvironment and cancer stem cells. *Oncology Letters*. 2018;16(1):679-686.

Zhou HS, Su XF, Fu XL, Wu GZ, Luo KL, Fang Z. ve arkadaşları. Mesenchymal stem cells promote pancreatic adenocarcinoma cells invasion by transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2016;7(27):41294-41305.

Zhou P, Li B, Liu F, Zhang M, Wang Q, Liu Y. ve arkadaşları. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: Implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*. 2017;16(1):52-62.

Zhou W, Kallifatidis G, Baumann B, Rausch V, Mattern J, Gladkich J. ve arkadaşları. Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells. *International Journal of Oncology*. 2010;37(3):551-561.

EKLER

Ek-1: Makale

NUTRITION AND CANCER: AN INTERNATIONAL JOURNAL-ARTICLE

The Effect of Resveratrol and Quercetin on Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem Cell

Mustafa Hoca^a, Eda Becer^{b,c}, Hilal Kabadayı^d, Sevinç Yücecan^a, H. Seda Vatansever^{c,d}

^aDepartment of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus; ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, Cyprus; ^cExperimental Health Research Center of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus; ^dDepartment of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

ABSTRACT

Objective: Resveratrol and quercetin are phytochemicals that are found in a variety of plants. The aim of this study was to investigate the effect of resveratrol and quercetin on epithelial-mesenchymal transition of CD133+ and CD133- pancreatic cancer cells.

Materials and Methods: Cancer stem cells (CD133+ cells) were obtained from the PANC-1 cells by the MiniMACS system. CD133+ and CD133- PANC-1 cells were treated with different concentrations (5, 10, 25, 50 and 100 µM) of resveratrol and quercetin. Cell growth and cytotoxicity were evaluated by MTT assay. Anti-cancer and anti-metastatic properties of resveratrol and quercetin were determined by immunocytochemistry using antibodies (ACTA-2, IL-1β, N-cadherin, TNF-α and vimentin).

Results: The immunostaining intensity of CD133+ cells was stronger than CD133- cells. ACTA-2, IL-1 β and N-cadherin immunoreactivities were significantly decreased, whereas TNF- α and vimentin immunoreactivities significantly increased in quercetin-treated CD133+ cells. Moreover, N-cadherin and TNF- α immunoreactivities significantly decreased in resveratrol-treated CD133+ cells.

Conclusion: The reduction in N-cadherin and ACTA-2 immunoreactivities was higher than the increase in vimentin immunoreactivity, quercetin could prevent epithelial-mesenchymal transition to a greater extent than resveratrol in pancreatic cancer stem cells because of the reduced expression of N-cadherin. Quercetin could be more effective in inhibiting metastasis compared to resveratrol.

Keywords: Pancreatic cancer, stem cell, resveratrol, quercetin, EMT

Introduction

Pancreatic cancer is a fatal disease which is associated with the lowest rate of survival in comparison to any other cancer types (1). It is the seventh leading cause of cancer deaths in both females and males due to delayed diagnosis (2). 432,242 new deaths (estimates of GLOBOCAN 2018) occurred in 2018 caused by pancreatic cancer. In 2018, 458,918 new cases of pancreatic cancer have been declared and estimated 355,317 new cases can occur up to 2040 in worldwide (3). Symptoms of pancreatic cancer are often vague and do not appear until the later stages. Advanced stage of the disease may involve symptoms of weight loss, nausea, severe abdominal pain and vomiting. Considering all stages of pancreatic cancer combined, 5-year survival rate is approximately 8% (4). Major risk factors of pancreatic cancer include increased prevalence of diabetes and metabolic syndrome (5). Pancreatic cancer consists of a heterogeneous population of hierarchically organized cancer cells and specifically, cancer stem cells (6).

Several phytochemicals were shown to have a protective effect against development of cancer (anti-cancer activity) by suppressing cancer stem cell activity. Phytochemicals such as resveratrol and quercetin can inhibit stem cell activity in pancreatic cancer (7). Resveratrol is a polyphenolic compound found in many plant species such as grapes, peanuts and berries (7, 8). Quercetin is another polyphenolic compound found mostly in apples, onions, blueberries and cranberries (7). Resveratrol and quercetin have potential inhibitory effects on cell signaling pathways (Wnt/ β -catenin, Hedgehog, Notch), anti-apoptotic genes/proteins (Bcl-2) and EMT-related factors (β -catenin, vimentin). They also have potential stimulatory effects on pro-apoptotic genes/proteins (Bax, caspase 3, FOXO1), tumor suppressor genes/proteins (PTEN, E-cadherin), differentiation and cell cycle arrest (9).

Cancer stem cells (CSCs) have the capacity for self-renewal which enables them to differentiate into other types of malignant cells (10). The metastatic behavior of CSCs is responsible for the progression of the disease. Therefore, targeting cancer stem cells is important for developing more effective treatment strategies (5). It is considered that inhibition of cancer stem cell activity might be a good approach in the

treatment of cancer (7). A study conducted by Lee et al. (11) showed that CD133+ cells had higher tumorigenic and metastatic potential than CD44+ and CD24+ cells, suggesting that CD133 may be significant cell surface marker of pancreatic cancer stem cells. Cao et al. (12) demonstrated that quercetin can reduce the expression of CD133 in pancreatic cancer stem cells. Furthermore, resveratrol has potential inhibitory effects on migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of both pancreatic cancer stem cells and pancreatic cancer cells (13, 14). Previous studies have demonstrated that quercetin can decrease migration ability of different cancer cell lines including oral cancer cells, breast cancer stem cells and prostate cancer cells (15-17). On the other hand, many studies have shown that resveratrol can inhibit EMT ability of various cancer cell lines such as oral squamous cell carcinoma cells and prostate cancer cells (18, 19).

The transition of epithelial cells to mesenchymal characteristic, induced by the loss of cell-cell interaction or polarity of cell. Consequently, the epithelial structure is disrupted and cells acquired the mesenchymal characteristic with invasive and migratory properties. Thus, loss of the epithelial markers (such as E-cadherin) and acquire of the mesenchymal markers (such as N-cadherin, vimentin and ACTA-2 commonly referred to as alpha-smooth muscle actin or α -SMA), cells acquired the new phenotype (20).

In this study, MTT assay and immunohistochemistry staining were used to establish anti-cancer activity of resveratrol and quercetin in pancreatic cancer stem cells. To our best knowledge, no study is available in literature which focused on the relation of between resveratrol and quercetin and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer stem cells. Thus, the aim of this study was to determine the effect of resveratrol and quercetin on cell viability and epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer stem cells.

Materials and Methods

Reagents and Cell Treatments

Resveratrol ((E)-5-(2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl)-1,3-Benzenediol; $\geq 99\%$ pure) (Sigma, R5010) was dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (PanReac AppliChem). Separately, quercetin (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one, 3,3',4',5,6-Pentahydroxyflavone; $\geq 95\%$ pure) (Sigma, Q4951) was also dissolved in DMSO. At the time of analysis, both resveratrol and quercetin were diluted with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Capricorn Scientific, DMEM-LPA). Cells were exposed to different concentrations of resveratrol and quercetin (5, 10, 25, 50 and 100 μM) to determine their effective doses.

Cell Line and Cell Culture

For the study, PANC-1 (ATCC: CRL-1469) was used as the human pancreatic cancer cell line. PANC-1 was maintained in a medium containing DMEM, 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI-11B), 1% penicillin-streptomycin (Capricorn Scientific, PS-B) and 1% L-glutamine (Capricorn Scientific, GLN-B). Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO₂. When the cultured cells reached confluency, they were sub-cultured using a 0.25% trypsin-EDTA solution (Gibco, 1838995).

Cancer Stem Cell Isolation by MiniMACS System

Human pancreatic cancer stem cells were isolated by the MiniMACS system (Miltenyi Biotec, Germany). First, PANC-1 cells were harvested by trypsinization. Total number of cells to be passed through MiniMACS system was 2×10^8 . After centrifugation, the supernatant was discarded and cells were resuspended by adding 60 μl buffer (Miltenyi Biotec, Germany, 130-100-857). Then, 20 μl blocking reagent (Miltenyi Biotec, Germany, 130-100-857) and 20 μl antibody-labeled CD133

microbeads (Miltenyi Biotec, Germany, 130-100-857) were added and cells were incubated for 15 minutes with stirring on ice. After incubation, 1 ml buffer was added and centrifugation was carried out for 10 minutes. Following centrifugation, the supernatant was removed and 500 μ l buffer was added and the pellet was resuspended. For magnetic separation, the column was placed in the magnetic field and the column was washed with 500 μ l buffer. Columns were specifically manufactured for the positive selection the CD133+ cells. After labeling the cells with the CD133 antibody, the cell suspension was passed through the column and CD133+ cells remained in the column due to positive selection. Thus, CD133- cells accumulated at the bottom of the tube. The column was separated from the magnetic field and washed quickly using its own syringe with 1 ml buffer and CD133+ cells were collected in a separate tube. Then, the column was washed again with 500 μ l buffer at least twice more. After centrifugation for 10 minutes, the buffer was removed and the cells were washed once with medium and then transferred into the flask and cultured.

Cell Viability and Growth Assay

The cytotoxicity analysis was performed using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay (Glentham Life Sciences, GC4568). Stock resveratrol (Sigma, R5010) and quercetin (Sigma, Q4951) solutions were prepared in DMSO and diluted in culture medium at five different concentrations (5, 10, 25, 50 and 100 μ M). PANC-1 cells were collected, suspended in the medium and seeded in 96-well cell culture plates with a density of 5×10^3 cells in each well. Negative control row contained neither any cells nor resveratrol or quercetin, but positive control row only had seeded cells and all of them were incubated for 24 hour and 48 hour. After incubation, 10 μ l MTT solution was added into the each well for 4 hour at 37°C in 5% CO₂. 50 μ l of DMSO was then added to dissolve the formazan crystals. The absorbance was measured at 570 nm with a spectrophotometer (VersaMax, Molecular Device, Sunnyvale, USA). All experiments were conducted in triplicate for each reagent (resveratrol and quercetin).

Immunocytochemistry

The cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, 158127-25G) in Phosphate Buffered Saline (PBS) at 4°C for 30 minutes. After washing with PBS, 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8532) was added on the cells for 15 minutes for increased permeabilization. PANC-1 cells were washed with PBS and endogenous peroxidase activity was quenched by incubation with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂, Riedel-de Haën, 70570) for 5 minutes at room temperature. After washing with PBS three times for 5 minutes, the blocking solution was added and incubated for 1 hour at room temperature. The solution was removed and washed with PBS again and cells were incubated with primary antibodies against vimentin (10366-1-AP, Proteintech), ACTA-2 (14395-1-AP, Proteintech), N-cadherin (13769-1-AP, Proteintech), TNF- α (sc-52746, Santa Cruz Biotechnology) and IL-1 β (sc-7884, Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. They were washed again with PBS and incubated with biotinylated secondary antibody (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) for 30 minutes followed by PBS wash (x3) for 5 minutes. Horseradish Peroxidase (HRP)-Streptavidin complex (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) was added to cultured cells and incubated for 30 minutes at room temperature. Subsequently, cells were washed with PBS and Diaminobenzidine (DAB, ScyTek Laboratories, 38611) was added and incubated during 5 minutes for enhancement of immunolabeling. DAB was washed with distilled water and cells were counterstained with Mayer's hematoxylin solution for 5 minutes and mounted with mounting medium (Merck Millipore, 1092490500, Germany). All samples were examined under a light microscope (Olympus BX40, Tokyo, Japan). Staining of vimentin, ACTA-2, N-cadherin, TNF- α and IL-1 β was graded semi-quantitatively using the H-SCORE. H-SCORE was calculated with the following equation: $\sum \pi (i+1)$, where i is the intensity of staining with a value of 1, 2 or 3 (weak, moderate or strong, respectively) and π is the percentage of cells stained with each intensity, varying between 0 and 100%.

Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm Standard Deviation (SD). The results were analyzed using Statistical Package for the Social Sciences 18.0 (SPSS 18.0). Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests (whichever appropriate) were used for differences among groups. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Immunohistochemical Staining in CD133+ and CD133- PANC-1 Cells

Cancer stem cells (CD133+ cells) were obtained from the PANC-1 cells using the CD133 antibody by the MiniMACS system and their immunohistochemical characterization was performed. After labeling the cells with the CD133 antibody, CD133+ cells remained in the column due to positive selection. After immunohistochemical staining with the CD133 antibody, it was found that the staining intensity of CD133+ cells (Figure 1 B) was stronger than CD133- cells (Figure 1 D). Percentage of the CD133+ cells after immunostaining were calculated and estimated 85.8% cell were CD133+.

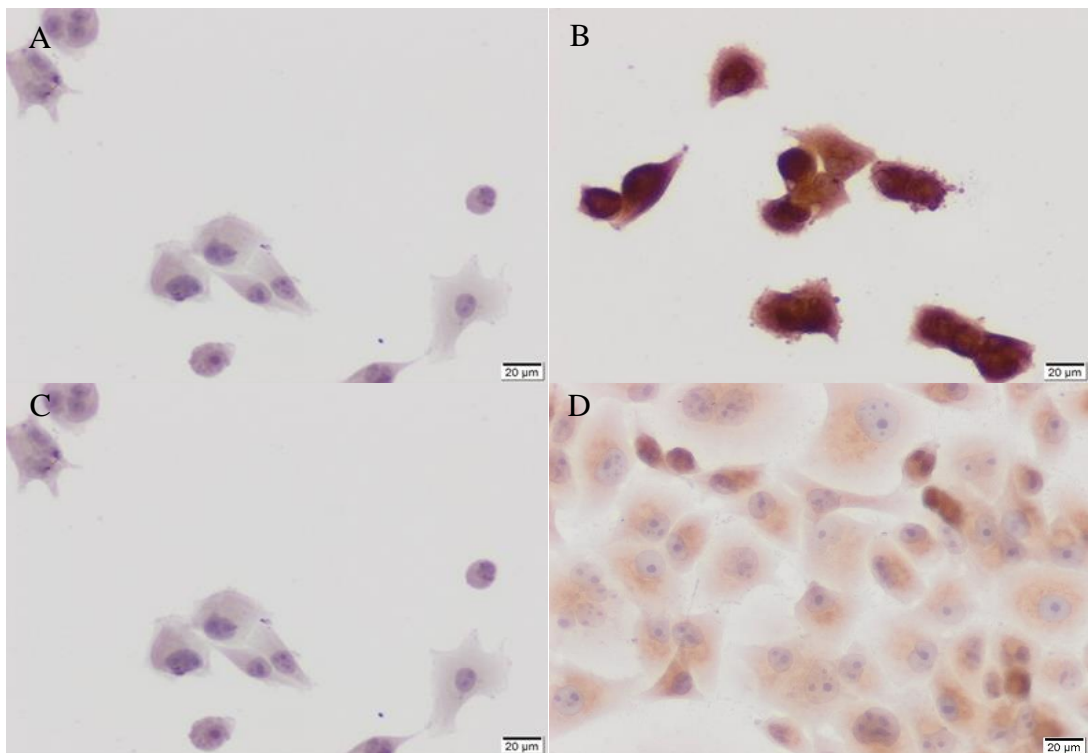


Figure 1. PANC-1 CD133+ control (A), CD133+ cells (B), CD133- control (C) and CD133- cells (D) obtained from PANC-1 cell line by MiniMACS. Scale bars= 20 µm

Cell Viability and Cytotoxicity

CD133+ and CD133- PANC-1 cells were treated with different concentrations (5, 10, 25, 50 and 100 μM) of resveratrol and quercetin for 24 and 48 hours. Viability of the cells was assessed using the MTT assay. All tested concentrations of resveratrol and quercetin showed reduced PANC-1 cell proliferation and a toxic effect in a dose- and time-dependent manner (Figures 2 and 3). We found that, resveratrol at 5 μM concentration was more effective in reducing both CD133+ and CD133- cell growth when compared with other concentrations for 24 hour incubation period (Figure 2). Additionally, quercetin at 10 μM concentration was more effective in reducing both CD133+ and CD133- cell growth when compared with other concentrations for 48 hour incubation period (Figure 3). Therefore, concentrations of 5 μM (for resveratrol) for 24 hour and 10 μM (for quercetin) for 48 hour were used to assess anti-cancer activities.

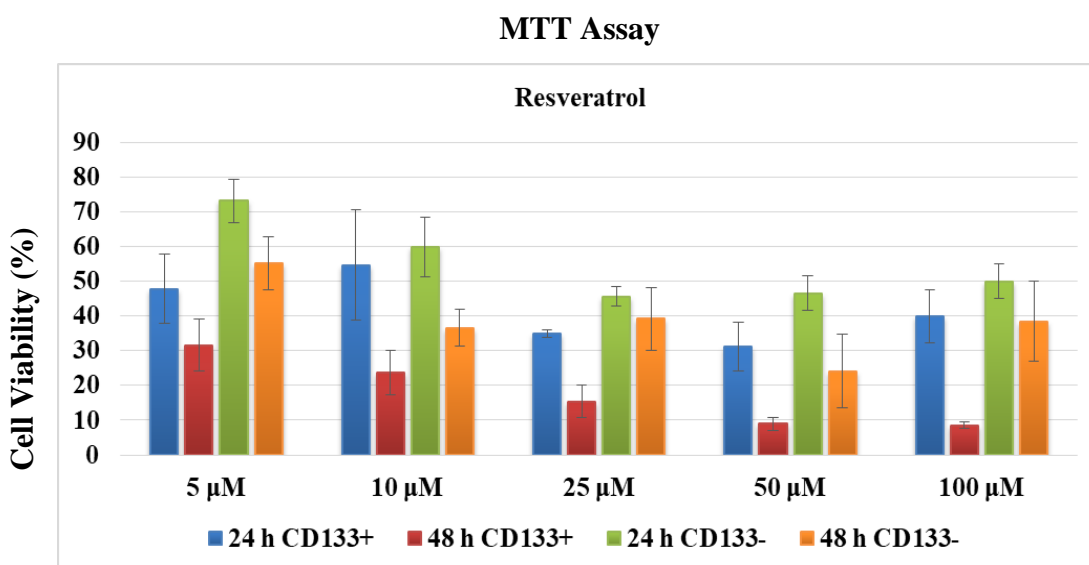


Figure 2. Dose-response columns and IC₅₀ values of resveratrol. Cell viability was quantitated by the MTT assay. Both CD133+ and CD133- cells were exposed to different concentrations of resveratrol (5, 10, 25, 50 and 100 μM) for 24 and 48 hours.

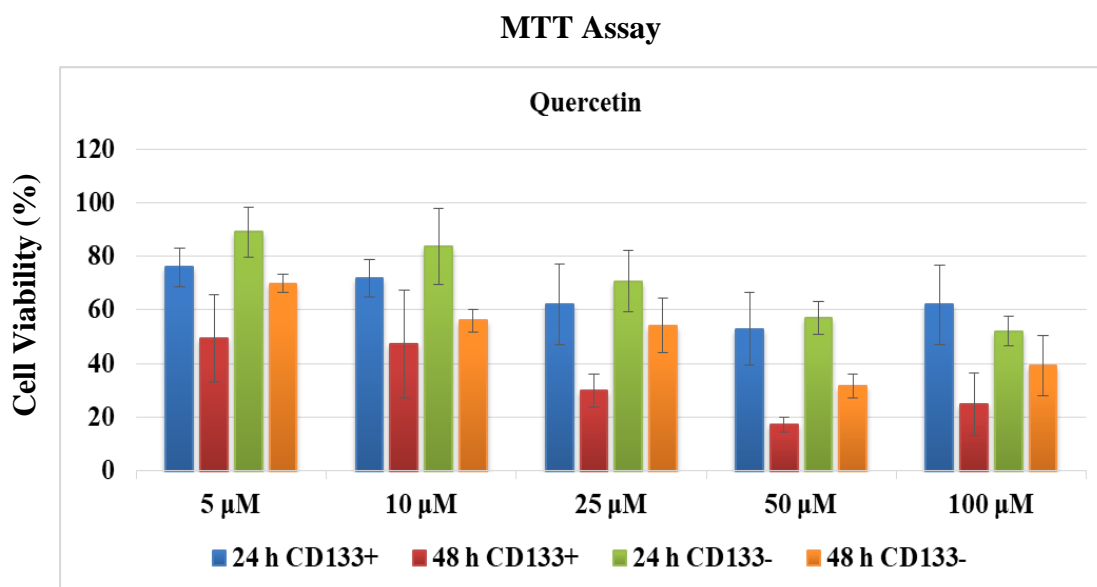


Figure 3. Dose-response columns and IC₅₀ values of quercetin. Cell viability was quantitated by the MTT assay. Both CD133+ and CD133- cells were exposed to different concentrations of quercetin (5-100 µM) for 24 and 48 hours.

Cell Morphology

PANC-1 CD133+ and CD133- cells have an epithelial morphology and also cultured in a monolayer adhere properties. In addition, CD133+ and CD133- cells morphology was similar (Figure 4 A, C). After treated with resveratrol (Figure 4 B, E) or quercetin (Figure 4 C, F), the shapes of PANC-1 both CD133+ (Figure 4 B, C) and CD133- (Figure 4 E, F) cells were still epithelioid. However, the size of them was smaller and also floating cells were detected (Figure 4 B, C, E, F).

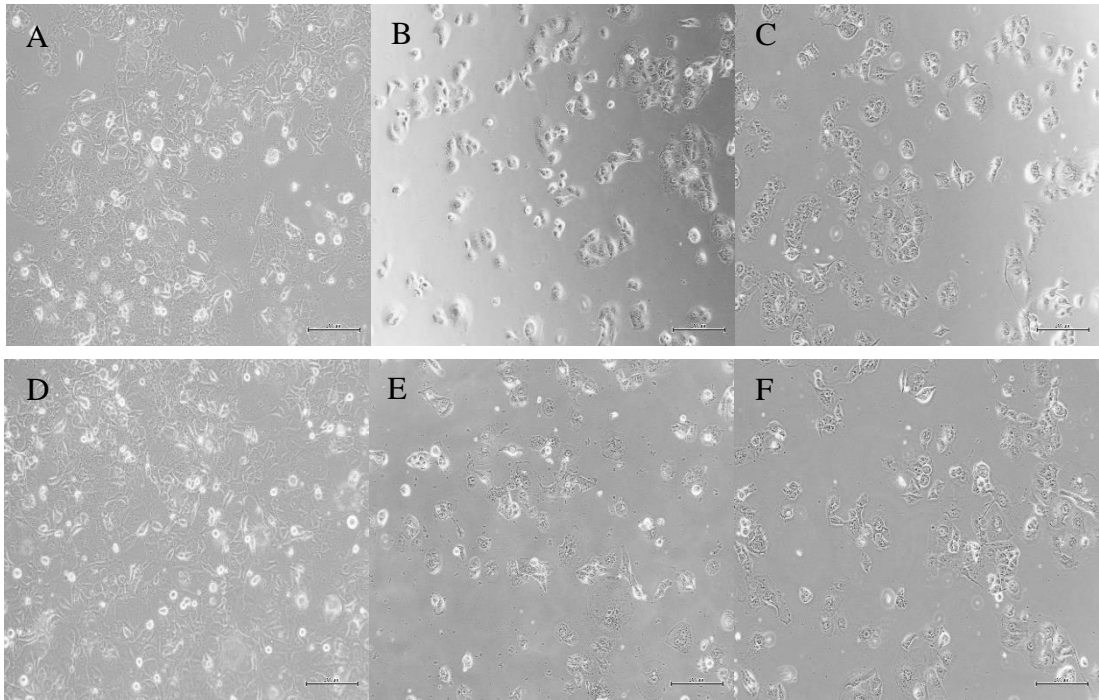


Figure 4. PANC-1 CD133+ (A-C) and CD133- (D-F) cells imaged under the inverted microscope after treated with resveratrol (B, E) and quercetin (C, F). Scale bars= 200 μ m

Immunohistochemical Assessment

Immunostaining for ACTA-2 was weak to moderate in quercetin-treated CD133+ cells (Figure 5 A, B, Table 1). ACTA-2 immunoreactivity was significantly greater in control group than in quercetin-treated CD133+ cells ($p=0.009$, Table 2). Immunostaining intensity for ACTA-2 was moderate for control group and quercetin-treated CD133- cells (Figure 5 C, D, Table 1). H-SCORE values for ACTA-2 were $260,66\pm 4,77$, $171,16\pm 17,73$, $231,71\pm 17,79$ and $241,33\pm 25,01$ for CD133+ control, quercetin-treated CD133+ cells, CD133- control and quercetin-treated CD133- cells, respectively (Table 2). However, quercetin-treated CD133- cells had a higher H-SCORE for ACTA-2 than control group, but the difference was not significant ($p>0.05$, Table 2).

Immunostaining for IL-1 β was weak in quercetin-treated CD133+ cells and control group (Figure 5 E, F, Table 1). However, IL-1 β immunostaining intensity was weak to moderate in quercetin-treated CD133- cells (Figure 5 G, H, Table 1). H-SCORE values of IL-1 β were $139,91\pm 13,72$, $105,66\pm 2,49$, $188,43\pm 53,04$ and

186,33±32,25 for CD133+ control, quercetin-treated CD133+ cells, CD133- control and quercetin-treated CD133- cells, respectively (Table 2). Both CD133+ ($p=0.009$) and CD133- ($p>0.05$) control groups had greater H-SCORE values for IL-1 β when compared with quercetin-treated CD133+ and CD133- cells (Table 2).

N-cadherin immunostaining was weak in quercetin-treated CD133+ and CD133- cells (Figure 5 I, J, K, L, Table 1). H-SCORE values of N-cadherin were 157,05±17,18, 104,89±4,48, 220,26±7,39 and 144,56±21,41 for CD133+ control, quercetin-treated CD133+ cells, CD133- control and quercetin-treated CD133- cells, respectively (Table 2). Furthermore, the H-SCORE values for N-cadherin revealed that there was a significant reduction in quercetin-treated CD133+ ($p=0.009$) and CD133- cells ($p=0.009$), (Table 2).

TNF- α immunostaining was weak to moderate in quercetin-treated CD133+ cells (Figure 5 M, N, Table 1). H-SCORE values for TNF- α were 111,87±10,15, 153,75±23,29, 214,60±16,84 and 120,26±11,96 for CD133+ control, quercetin-treated CD133+ cells, CD133- control and quercetin-treated CD133- cells, respectively (Table 2). As shown in Table 2, the H-SCORE for TNF- α was significantly higher in quercetin-treated CD133+ cells than in control group ($p=0.009$). Immunostaining for TNF- α was weak in quercetin-treated CD133- cells (Figure 5 O, P, Table 1). In addition, CD133- control group showed significantly greater immunoreactivity for TNF- α ($p=0.009$, Table 2).

Immunostaining for vimentin was moderate in quercetin-treated CD133+ cells and control group (Figure 5 Q, R, Table 1). Vimentin H-SCOREs of 210,47±6,76, 225,10±7,13, 235,38±7,88 and 230,65±24,86 were found for CD133+ control, quercetin-treated CD133+ cells, CD133- control and quercetin-treated CD133- cells, respectively (Table 2). Vimentin immunoreactivity was significantly increased in quercetin-treated CD133+ cells ($p=0.016$, Table 2). Similarly, vimentin immunostaining intensity was moderate in quercetin-treated CD133- cells and control group (Figure 5 S, T, Table 1). CD133- control group showed an increase in H-SCORE for vimentin, albeit not significantly ($p>0.05$, Table 2).

Immunostaining for ACTA-2 was weak to moderate in resveratrol-treated CD133+ cells (Figure 6 A, B, Table 1). H-SCORE values for ACTA-2 were

253,47±26,71, 227,47±5,35, 262,74±32,49 and 265,68±29,20 in CD133+ control, resveratrol-treated CD133+ cells, CD133- control and resveratrol-treated CD133- cells, respectively (Table 2). ACTA-2 immunoreactivity was greater in control group than in resveratrol-treated CD133+ cells ($p>0.05$, Table 2). Immunostaining intensity for ACTA-2 was moderate in control group and resveratrol-treated CD133- cells (Figure 6 C, D, Table 1). Moreover, resveratrol-treated CD133- cells had a higher ACTA-2 H-SCORE than control group, but the difference was not significant ($p>0.05$, Table 2).

The immunostaining for IL-1 β was weak to moderate in resveratrol-treated CD133+ cells (Figure 6 E, F, Table 1). The H-SCORE values of IL-1 β were 245,86±17,45, 228,36±23,61, 240,40±22,53 and 209,61±20,20 for CD133+ control, resveratrol-treated CD133+ cells, CD133- control and resveratrol-treated CD133- cells, respectively (Table 2). CD133+ control group had greater H-SCORE for IL-1 β when compared with resveratrol-treated CD133+ cells ($p>0.05$, Table 2). IL-1 β immunostaining intensity was weak in resveratrol-treated CD133- cells (Figure 6 G, H, Table 1). CD133- control group showed significantly greater H-SCORE for IL-1 β in comparison to resveratrol-treated CD133- cells ($p=0.028$, Table 2).

N-cadherin immunostaining was weak to moderate in resveratrol-treated CD133+ cells (Figure 6 I, J, Table 1). The H-SCORE values of N-cadherin were 281,33±24,84, 212,14±10,16, 245,42±21,67 and 246,59±21,68 for CD133+ control, resveratrol-treated CD133+ cells, CD133- control and resveratrol-treated CD133- cells, respectively (Table 2). The H-SCORE for N-cadherin was significantly higher in control group than in resveratrol-treated CD133+ cells ($p=0.009$, Table 2). Immunostaining for N-cadherin was moderate in resveratrol-treated CD133- cells (Figure 6 K, L, Table 1). Resveratrol-treated CD133- cells showed greater N-cadherin H-SCORE versus control group, but not at a significant level ($p>0.05$, Table 2).

TNF- α immunostaining was weak in resveratrol-treated CD133+ cells (Figure 6 M, N, Table 1). H-SCORE values for TNF- α were 219,36±16,47, 158,25±13,84, 256,64±40,92 and 226,57±16,25 for CD133+ control, resveratrol-treated CD133+ cells, CD133- control and resveratrol-treated CD133- cells, respectively (Table 2). CD133+ control group had significantly increase in immunoreactivity for TNF- α

($p=0.009$, Table 2). Immunostaining for TNF- α was weak to moderate in resveratrol-treated CD133- cells (Figure 6 O, P, Table 1). CD133- control group showed an increase in H-SCORE for TNF- α ($p>0.05$, Table 2).

Immunostaining for vimentin was moderate in resveratrol-treated CD133+ cells and control group (Figure 6 Q, R, Table 1). Similarly, vimentin immunostaining intensity was moderate in resveratrol-treated CD133- cells and control group (Figure 6 S, T, Table 1). The H-SCORE values of $265,11\pm 16,97$, $258,44\pm 5,68$, $264,91\pm 9,10$ and $268,35\pm 18,48$ were found for vimentin in CD133+ control, resveratrol-treated CD133+ cells, CD133- control and resveratrol-treated CD133- cells, respectively (Table 2). CD133+ control group and resveratrol-treated CD133- cells showed greater H-SCOREs for vimentin when compared with resveratrol-treated CD133+ cells and CD133- control group, respectively, but the difference was not significant ($p>0.05$, Table 2).

In the current study, quercetin-treated CD133- cells had a significantly greater intensity of IL-1 β than quercetin-treated CD133+ cells ($p=0.009$, Table 2). The intensity of TNF- α was significantly higher in quercetin-treated CD133+ cells ($p=0.016$) and resveratrol-treated CD133- cells ($p=0.008$), (Table 2). However, intensity of vimentin was higher in quercetin- or resveratrol-treated CD133- cells than quercetin- or resveratrol-treated CD133+ cells, but not significantly ($p>0.05$, Table 2). Additionally, both quercetin-treated CD133- cells ($p=0.009$) and resveratrol-treated CD133- cells ($p=0.016$) had significantly higher intensity for N-cadherin in comparison to quercetin- or resveratrol-treated CD133+ cells (Table 2). Quercetin-treated CD133- cells ($p=0.009$) and resveratrol-treated CD133- cells ($p=0.021$) had significantly higher intensity for ACTA-2 than quercetin- or resveratrol-treated CD133+ cells as well (Table 2).

Quercetin-treated CD133+ cells had the lowest intensity for IL-1 β when compared with quercetin-treated CD133- cells ($p=0.021$), resveratrol-treated CD133+ cells ($p=0.001$) or CD133- cells ($p=0.001$), (all p statistically significant, Table 2). The intensity of TNF- α was significantly lower in quercetin-treated CD133+ cells than resveratrol-treated CD133- cells ($p=0.003$, Table 2). However, resveratrol-treated CD133+ cells had significantly higher intensity for TNF- α than quercetin-treated

CD133- cells (p=0.009, Table 2). Moreover, resveratrol-treated CD133- cells had significantly higher intensity for TNF- α than quercetin-treated CD133- cells (p=0.000, Table 2).

Resveratrol-treated CD133+ cells had significantly higher intensity for vimentin than quercetin-treated CD133+ cells (p=0.000, Table 2). Additionally, resveratrol-treated CD133- cells had significantly higher intensity for vimentin than quercetin-treated CD133+ cells (p=0.020, Table 2). Intensity of N-cadherin was significantly higher in resveratrol-treated CD133+ cells (p=0.000) and CD133- cells (p=0.000) than in quercetin-treated CD133+ cells (Table 2). H-SCORE values for N-cadherin were also significantly higher in resveratrol-treated CD133+ cells (p=0.004) and CD133- cells (p=0.000) than quercetin-treated CD133- cells (Table 2). Resveratrol-treated CD133+ cells (p=0.006) and CD133- cells (p=0.003) had significantly higher intensity for ACTA-2 than quercetin-treated CD133+ cells (Table 2).

Table 1. Immunostaining for ACTA-2, IL-1 β , N-cadherin, TNF- α and vimentin in CD133+ and CD133- PANC-1 cells treated with quercetin at 10 μ M concentration for 48 hour and resveratrol at 5 μ M concentration for 24 hour

	ACTA-2	IL-1 β	N-cadherin	TNF- α	Vimentin
CD133+ Control	++	+	+ /+++	+	++
Quercetin CD133+	+ /+++	+	+	+ /+++	++
CD133- Control	++	+	+ /+++	+ /+++	++
Quercetin CD133-	++	+ /+++	+	+	++
CD133+ Control	++	++	++ /++++	+ /+++	++
Resveratrol CD133+	+ /+++	+ /+++	+ /+++	+	++
CD133- Control	++	++	+ /+++	++	++
Resveratrol CD133-	++	+	++	+ /+++	++

Table 2. The H-SCORE values for ACTA-2, IL-1 β , N-cadherin, TNF- α and vimentin in CD133+ and CD133- PANC-1 cells treated with quercetin at 10 μ M concentration for 48 hour and resveratrol at 5 μ M concentration for 24 hour

	ACTA-2	IL-1 β	N-cadherin	TNF- α	Vimentin
CD133+ Control	260,66 \pm 4,77	139,91 \pm 13,72	157,05 \pm 17,18	111,87 \pm 10,15	210,47 \pm 6,76
Quercetin CD133+	171,16 \pm 17,73 ^a	105,66 \pm 2,49 ^a	104,89 \pm 4,48 ^a	153,75 \pm 23,29 ^a	225,10 \pm 7,13 ^a
CD133- Control	231,71 \pm 17,79	188,43 \pm 53,04	220,26 \pm 7,39	214,60 \pm 16,84	235,38 \pm 7,88
Quercetin CD133-	241,33 \pm 25,01	186,33 \pm 32,25	144,56 \pm 21,41 ^b	120,26 \pm 11,96 ^b	230,65 \pm 24,86
CD133+ Control	253,47 \pm 26,71	245,86 \pm 17,45	281,33 \pm 24,84	219,36 \pm 16,47	265,11 \pm 16,97
Resveratrol CD133+	227,47 \pm 5,35	228,36 \pm 23,61	212,14 \pm 10,16 ^c	158,25 \pm 13,84 ^c	258,44 \pm 5,68
CD133- Control	262,74 \pm 32,49	240,40 \pm 22,53	245,42 \pm 21,67	256,64 \pm 40,92	264,91 \pm 9,10
Resveratrol CD133-	265,68 \pm 29,20	209,61 \pm 20,20 ^d	246,59 \pm 21,68	226,57 \pm 16,25	268,35 \pm 18,48
Quercetin CD133+	171,16 \pm 17,73	105,66 \pm 2,49	104,89 \pm 4,48	153,75 \pm 23,29	225,10 \pm 7,13
Quercetin CD133-	241,33 \pm 25,01 ^e	186,33 \pm 32,25 ^e	144,56 \pm 21,41 ^e	120,26 \pm 11,96 ^e	230,65 \pm 24,86
Resveratrol CD133+	227,47 \pm 5,35	228,36 \pm 23,61	212,14 \pm 10,16	158,25 \pm 13,84	258,44 \pm 5,68
Resveratrol CD133-	265,68 \pm 29,20 ^f	209,61 \pm 20,20	246,59 \pm 21,68 ^f	226,57 \pm 26,25 ^f	268,35 \pm 18,48
	0.003 ^g	0.004 ^g	0.001 ^g	0.001 ^g	0.019 ^g

Data are shown as means \pm SD.

Based on Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests.

^aSignificant difference between CD133+ control group and quercetin-treated CD133+ cells (p<0.05).

^bSignificant difference between CD133- control group and quercetin-treated CD133- cells (p<0.05).

^cSignificant difference between CD133+ control group and resveratrol-treated CD133+ cells (p<0.05).

^dSignificant difference between CD133- control group and resveratrol-treated CD133- cells (p<0.05).

^eSignificant difference between quercetin-treated CD133+ and CD133- cells (p<0.05).

^fSignificant difference between resveratrol-treated CD133+ and CD133- cells (p<0.05).

^gSignificant difference between four groups (quercetin-treated CD133+ cells, quercetin-treated CD133- cells, resveratrol-treated CD133+ cells and resveratrol-treated CD133- cells), (all p<0.05).

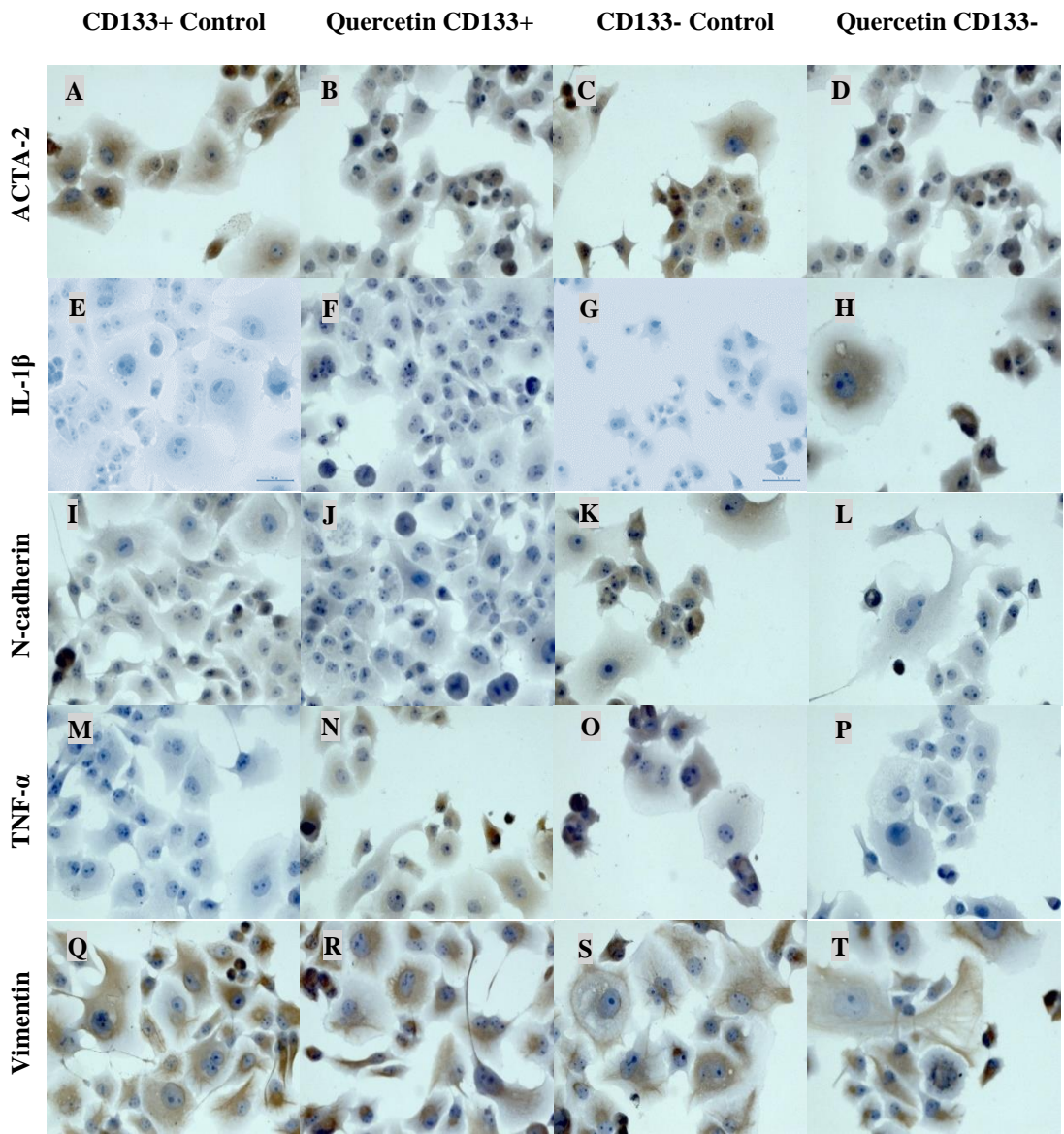


Figure 5. Immunoreactivity of ACTA-2, IL-1 β , N-cadherin, TNF- α and vimentin in PANC-1 cells (CD133+ and CD133-) in 48 hour culture exposed to standard culture conditions or 10 μ M quercetin (A-T, Scale Bars= 100 μ m)

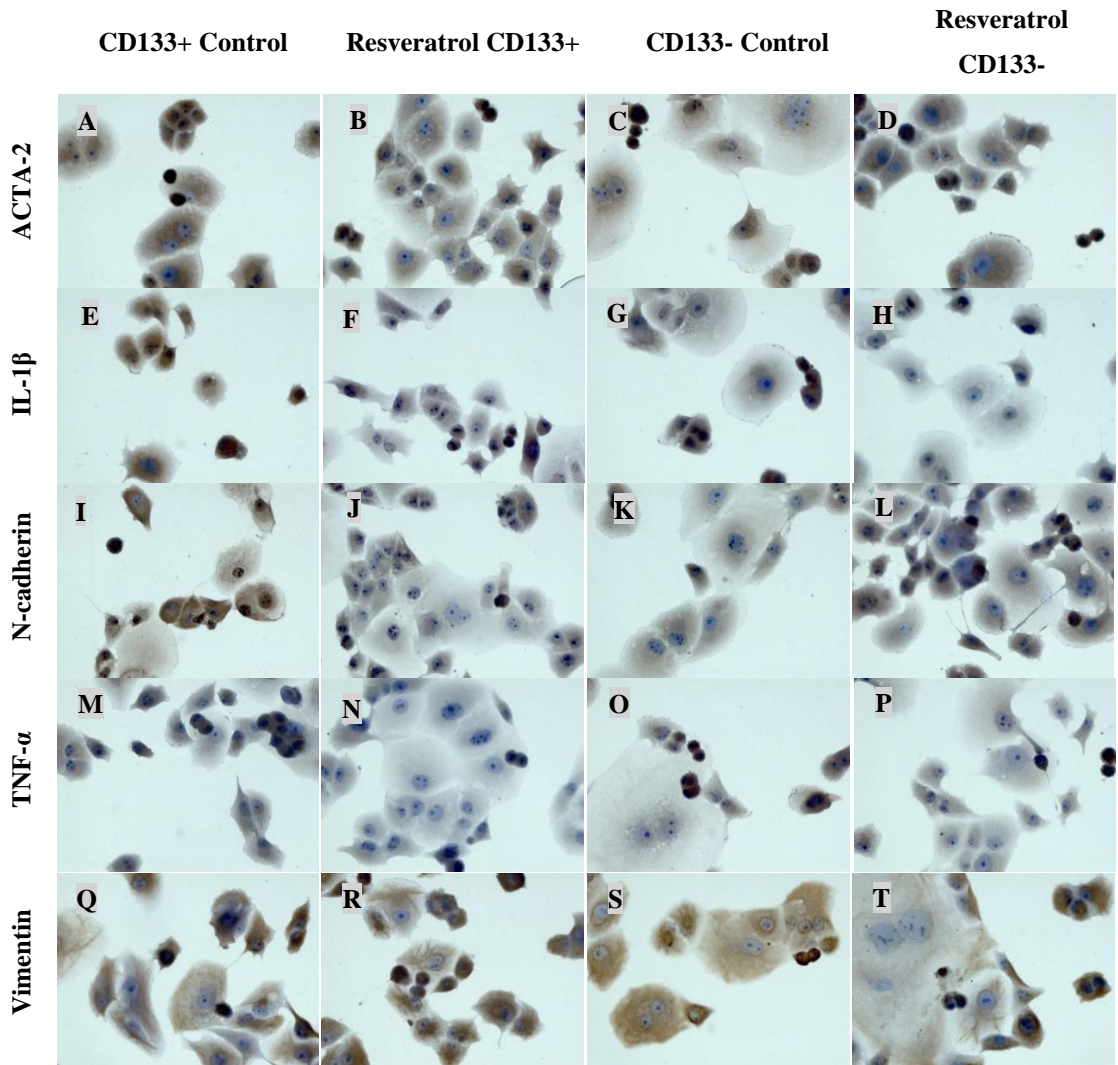


Figure 6. Immunoreactivity of ACTA-2, IL-1 β , N-cadherin, TNF- α and vimentin in PANC-1 cells (CD133+ and CD133-) in 24 hour culture exposed to standard culture conditions or 5 μ M resveratrol (A-T, Scale Bars= 100 μ m)

Discussion

Resveratrol and quercetin, two structurally-related flavonoids, are polyphenolic compounds found in many plant species that show anti-cancer activity by suppressing cancer stem cell activity (7, 8). Several studies have demonstrated that quercetin and resveratrol can decrease EMT ability of different cancer cell lines including oral cancer cells, breast cancer stem cells and prostate cancer cells (15-19). Although resveratrol and quercetin have been studied separately on pancreatic cancer stem cells, there is no study investigating the combined effects of resveratrol and quercetin on epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer stem cells.

There are different cell separation methods. MiniMACS is a fast and practical method based on the magnetic separation of cell populations with positive selection. In pancreatic cancer stem cells, CD133+ cells have higher tumorigenic and metastatic potential than CD44+ and CD24+ cells. Therefore, it has been suggested that CD133 may be significantly a cell surface marker of CSCs (11). Cao et al. (12) reported that quercetin can reduce the expression of CD133 in pancreatic cancer stem cells. Shankar et al. (13) resveratrol may inhibit human pancreatic cancer stem cell characteristics (CD133+CD44+CD24+ESA+) which are highly tumorigenic.

Various markers have been used to determine the EMT. Cytokeratins, E-cadherin and integrins are the most frequently used epithelial markers. Additionally, fibronectin, N-cadherin and vimentin are mesenchymal markers. Switch from E-cadherin to N-cadherin can be used to observe the EMT (21). In one study, cells from a human pancreatic cancer cell line (PATU-8988) were treated with quercetin at different concentrations (0, 20, 40 and 80 μ M for 24 hour). The authors found that quercetin reduced mRNA expression of N-cadherin (22). In another study, quercetin decreased EMT-related proteins (N-cadherin and vimentin) in a dose dependent manner (12.5, 25 and 50 μ M) in head and neck cancer-derived sphere cells (23). In the current study, the H-SCORE for N-cadherin revealed that there was a significant reduction in N-cadherin immunoreactivity in quercetin-treated CD133+ and CD133-PANC-1 cells. Furthermore, the immunostaining intensity of N-cadherin was significantly stronger in control group than in resveratrol-treated CD133+ cells.

However, resveratrol-treated CD133⁻ cells had a higher H-SCORE for N-cadherin than control group, but not at a significant level. Therefore, both quercetin and resveratrol could inhibit epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer stem cell by decreasing N-cadherin expression.

TNF- α is a cytokine which is immediately expressed during an inflammatory process and can cause cell death. It is also important for tumor progression, especially in cancer stem cells. Moreover, it can stimulate EMT and enhance stemness characteristics (24). Inflammation is a significant characteristic of pancreatic adenocarcinoma (PA). A study on liver metastasis in mice showed that TNF- α and interferon gamma (IFN- γ) may stimulate invasion of PA cells and thus, PA cells could have EMT ability (25). Our study found that the H-SCORE for TNF- α was significantly higher in quercetin-treated CD133⁺ cells than in control group. However, CD133⁺ control group had significantly greater H-SCORE for TNF- α compared to resveratrol-treated CD133⁺ cells. Therefore, TNF- α expression may be triggered after treatment with quercetin rather than resveratrol in CD133⁺ PANC-1 cells. In addition, after incubation with both quercetin and resveratrol, TNF- α expression was less in CD133⁺ PANC-1 cells compared to CD133⁻ PANC-1 cells with resveratrol. However, TNF- α expression was less in CD133⁻ PANC-1 cells compared to CD133⁺ PANC-1 cells with quercetin. These results suggest that resveratrol inhibits TNF- α expression in CD133⁺ PANC-1 cells.

IL-1 β is induced by inflammatory signals and may cause metastasis as well as tumor growth (26). Nomura et al. (27) showed that IL-1 β can activate NF- κ B in pancreatic cancer cells. IL-1 β significantly increased NF- κ B activation in cells overexpressing CD133 and led to EMT. Based on our results, both CD133⁺ and CD133⁻ control groups had increased IL-1 β immunoreactivity when compared with both quercetin- and resveratrol-treated cells. Therefore, in the pancreatic cancer stem cells, resveratrol and quercetin could decrease IL-1 β expression and reduce inflammation via NF- κ B pathway.

Alpha-smooth muscle actin (α -SMA/ACTA-2) is among the most commonly used markers of cancer-associated fibroblasts (CAFs) (28). α -SMA was found to be widely expressed in MG-63 and U2OS human osteosarcoma cell lines (29). Our results

demonstrated that ACTA-2 expression was significantly reduced in CD133+ PANC-1 cells in comparison to treated CD133- cells both treated with quercetin and resveratrol. Thus, resveratrol and quercetin could prevent metastasis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer stem cells.

Dissemination of cancer cells is explained by the fact that cells acquire mesenchymal markers, such as vimentin which is associated with an increased potential of metastasis (30). Wang et al. (19) documented that resveratrol inhibits the PC-3 prostate cancer cell growth and affects EMT-related markers, producing decreased vimentin and increased E-cadherin levels. In the current study, both quercetin-treated CD133+ cells and CD133- control group had significantly greater H-SCORE for vimentin versus CD133+ control group and quercetin-treated CD133- cells, respectively. Additionally, both CD133+ control group (for resveratrol) and resveratrol-treated CD133- cells had a greater H-SCORE for vimentin. Compared to quercetin, resveratrol had a greater effect on vimentin expression.

Both substances may have different effects in different cells (normal, pathological, cancer, cancer stem cell, etc.). In particular, these substances may cause changes in cell viability and consequently cell morphology. The roles of these two substances on EMT in cells are not yet known. There is also a relationship between morphological changes and EMT (such as epithelial or mesenchymal characteristics). Quercetin has more effect on cell morphology, it may affect epithelial and mesenchymal characteristics of cells.

Conclusion

In conclusion, cytotoxic and anti-cancer effects of resveratrol and quercetin were studied in both CD133+ and CD133- PANC-1 pancreatic cancer cells using various concentrations. Interestingly, resveratrol and quercetin affected IL-1 β , TNF- α , vimentin, N-cadherin and ACTA-2 expressions which were associated with metastasis in pancreatic cancer cells. As the reduction in N-cadherin and ACTA-2 immunoreactivities was greater than the increase in vimentin immunoreactivity, it may be expected that quercetin could prevent epithelial-mesenchymal transition to a greater extent than resveratrol in pancreatic cancer stem cells. In order to understand specific effects of resveratrol and quercetin on pancreatic cancer stem cells, essential signaling pathways should be identified. Further studies in animals and humans are needed to elucidate the effects of resveratrol and quercetin on epithelial-mesenchymal transition.

Acknowledgements

The authors would like to thank Near East University, Experimental Health Research Center of Health Sciences laboratory and Manisa Celal Bayar University, Histology and Embryology laboratory for their support throughout the study.

Disclosure Statement

The authors report no conflict of interest.

Funding

This study was supported by the Near East University, Experimental Health Research Center of Health Sciences and Manisa Celal Bayar University, Histology and Embryology laboratory.

Authors' Contribution

Mustafa Hoca, Eda Becer, Sevinç Yücecan and H. Seda Vatansever originally designed the research study. Mustafa Hoca executed the biostatistical data analyses. Hilal Kabadayı and H. Seda Vatansever performed the cancer stem cell isolation. Eda Becer carried out the MTT assay and immunocytochemistry analysis. Mustafa Hoca, Eda Becer, Sevinç Yücecan and H. Seda Vatansever together wrote the initial draft of the manuscript. Eda Becer, Sevinç Yücecan and H. Seda Vatansever coordinated and managed the research study. Eda Becer, Sevinç Yücecan and H. Seda Vatansever critically reviewed and interpreted the results. All authors have 1) made substantial contributions to this study's conception and design or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting or revising the whole manuscript critically and 3) approved the submitted manuscript.

References

1. Rao CV, and Mohammed A: New insights into pancreatic cancer stem cells. *World J Stem Cells* 7, 547-555, 2015.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394-424, 2018.
3. Rawla P, Sunkara T, and Gaduputi V: Epidemiology of pancreatic cancer: Global trends, etiology and risk factors. *World J Oncol* 10, 10-27, 2019.
4. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*. 1-76, 2018.
5. Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Kheir TB, Jagust P, et al. MYC/PGC-1 α balance determines the metabolic phenotype and plasticity of pancreatic cancer stem cells. *Cell Metab* 22, 590-605, 2015.
6. Heeschen C, and Sancho P: More challenges ahead-metabolic heterogeneity of pancreatic cancer stem cells. *Mol Cell Oncol* 3, 1-3, 2016.
7. Gupta S, and Pramanik D: Phytochemicals and cancer stem cells: A pancreatic cancer overview. *Curr Chem Biol* 10, 98-108, 2016.
8. Shukla Y, and Singh R: Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 1-8, 2011.
9. Pistollato F, Giampieri F, and Battino M: The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food Chem Toxicol* 75, 58-70, 2015.
10. Bu Y, and Cao D: The origin of cancer stem cells. *Front Biosci (Schol Ed)* 4, 819-830, 2012.

11. Lee HJ, You DD, Choi DW, Choi YS, Kim SJ, et al. Significance of CD133 as a cancer stem cell markers focusing on the tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines. *J Korean Surg Soc* 81, 263-270, 2011.
12. Cao C, Sun L, Mo W, Sun L, Luo J, et al. Quercetin mediates β -catenin in pancreatic cancer stem-like cells. *Pancreas* 44, 1334-1339, 2015.
13. Shankar S, Nall D, Tang SN, Meeker D, Passarini J, et al. Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition. *Plos One* 6, 1-13, 2011.
14. Li W, Ma J, Ma Q, Li B, Han L, et al. Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF- κ B pathway. *Curr Med Chem* 20, 4185-4194, 2013.
15. Chen SF, Nien S, Wu CH, Liu CL, Chang YC, et al. Reappraisal of the anticancer efficacy of quercetin in oral cancer cells. *J Chin Med Assoc* 76, 146-152, 2013.
16. Wang R, Yang L, Li S, Ye D, Yang L, et al. Quercetin inhibits breast cancer stem cells via downregulation of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), chemokine receptor type 4 (CXCR4), mucin 1 (MUC1), and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). *Med Sci Monit* 24, 412-420, 2018.
17. Tsai PH, Cheng CH, Lin CY, Huang YT, Lee LT, et al. Dietary flavonoids luteolin and quercetin suppressed cancer stem cell properties and metastatic potential of isolated prostate cancer cells. *Anticancer Res* 36, 6367-6380, 2016.
18. Kim SE, Shin SH, Lee JY, Kim CH, Chung IK, et al. Resveratrol induces mitochondrial apoptosis and inhibits epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma cells. *Nutr Cancer* 70, 125-135, 2018.
19. Wang Z, Wu L, Tong S, Hu X, Zu X, et al. Resveratrol suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition in PC-3 cells by down-regulating the PI3K/Akt signaling pathway. *Anim Cells Syst* 20, 77-85, 2016.

20. Morandi A, Taddei ML, Chiarugi P, and Giannoni E: Targeting the metabolic reprogramming that controls epithelial-to-mesenchymal transition in aggressive tumors. *Front Oncol* 7, 1-19, 2017.
21. Zhou P, Li B, Liu F, Zhang M, Wang Q, et al. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: Implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 16, 52-62, 2017.
22. Yu D, Ye T, Xiang Y, Shi Z, Zhang J, et al. Quercetin inhibits epithelial–mesenchymal transition, decreases invasiveness and metastasis, and reverses IL-6 induced epithelial–mesenchymal transition, expression of MMP by inhibiting STAT3 signaling in pancreatic cancer cells. *Onco Targets Ther* 10, 4719-4729, 2017.
23. Chang WW, Hu FW, Yu CC, Wang HH, Feng HP, et al. Quercetin in elimination of tumor initiating stem-like and mesenchymal transformation property in head and neck cancer. *Head & Neck* 35, 413-419, 2012.
24. Zhang S, Yang X, Wang L, and Zhang C: Interplay between inflammatory tumor microenvironment and cancer stem cells. *Oncol Lett* 16, 679-686, 2018.
25. Zhou HS, Su XF, Fu XL, Wu GZ, Luo KL, et al. Mesenchymal stem cells promote pancreatic adenocarcinoma cells invasion by transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget* 7, 41294-41305, 2016.
26. Bent R, Moll L, Grabbe S, and Bros M: Interleukin-1 beta-A friend or foe in malignancies? *Int J Mol Sci* 19, 2155-2188, 2018.
27. Nomura A, Gupta VK, Dauer P, Sharma NS, Dudeja V, et al. NF κ B-mediated invasiveness in CD133+ pancreatic TICs is regulated by autocrine and paracrine activation of IL1 signaling. *Mol Cancer Res* 16, 162-172, 2018.
28. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, et al. Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers* 7, 2443-2458, 2015.

29. Wang YM, Wang W, and Qiu ED: Osteosarcoma cells induce differentiation of mesenchymal stem cells into cancer associated fibroblasts through Notch and Akt signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 10, 8479-8486, 2017.

30. Beuran M, Negoii I, Paun S, Ion AD, Bleotu C, et al. The epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer: A systematic review. *Pancreatology* 15, 217-225, 2015.

Ek-2: Sözel Bildiri

6th WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN AND ANIMAL WELFARE (WOCMAP VI)-ORAL PRESENTATION

The Effect of Resveratrol on Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem Cell

Mustafa Hoca¹, Eda Becer^{2,3}, Hilal Kabadayı⁴, Sevinç Yücecan¹, Seda Vatansever^{3,4}

¹ Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus

² Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, Cyprus

³ Research Center of Experimental Health Sciences (DESAM), Near East University, Nicosia, Cyprus

⁴ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

mustafa.h.91@hotmail.com

ABSTRACT

Aim: Pancreatic cancer is a fatal disease that has minimum survival with regard to any another cancer types. In pancreatic cancer, metastasis occurs in association with epithelial mesenchymal transition (EMT). Resveratrol is one of the polyphenolic compounds found that in many plant species such as grapes, peanuts and berries. Resveratrol can suppress EMT-related factors (ACTA-2, N-cadherin, vimentin, etc.). It can also inhibit stem cell activity in pancreatic cancer. The aim of this study was to investigate the effect of resveratrol on metastasis in pancreatic cancer stem cell.

Materials and Methods: Human pancreatic cancer stem cells were isolated by MiniMACS system using CD133 antibody. Furthermore, cell cytotoxicity was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) cell viability test. After administration of 5 μ M resveratrol to CD133+ and CD133- cells for 24 hours, staining of ACTA2, N-cadherin and vimentin was graded semi quantitatively using the H-SCORE. Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests (whichever appropriate) were used for differences among groups. A p value of <0.05 was considered as statistically significant.

Results: ACTA-2 immunoreactivity was higher in control group than resveratrol-treated CD133+ cells ($p>0,05$). However, the H-SCORE for N-cadherin was significantly higher in control group than resveratrol-treated CD133+ cells ($p<0,05$). CD133+ control group had increase in H-SCORE for vimentin when compared with resveratrol-treated CD133+ cells, but not significant ($p>0,05$). ACTA-2 and N-cadherin immunoreactivities were significantly lower in resveratrol-treated CD133+ cells than resveratrol-treated CD133- cells ($p<0.05$). When compared to resveratrol-treated CD133- cells, H-SCORE of vimentin was lower in resveratrol-treated CD133+ cells, but not significant ($p>0.05$).

Conclusion: After resveratrol treatment; the ACTA-2, N-cadherin and vimentin immunoreactivities were decreased in CD133+ cells. Therefore, epithelial mesenchymal transition of pancreatic cancer stem cells was inhibited by resveratrol. Thus, it was concluded that resveratrol may decrease the potential of these cells to metastasize. Resveratrol may reduce the mesenchymal cell property of cancer cells.

Keywords: EMT, Resveratrol, Vimentin, N-cadherin, ACTA-2

Ek-3: Sözel Bildiri

VI. NADİR TÜMÖRLER SEMPOZYUMU-İZMİR ONKOLOJİ GÜNLERİ, KANSER KÖK HÜCRE VE NADİR MOLEKÜLER HEDEFLERE YAKLAŞIM-SÖZEL BİLDİRİ

Kersetinin Pankreatik Kanser Kök Hücrelerinde Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Üzerine Etkisi

**Mustafa Hoca¹, Eda Becer^{2,3}, Hilal Kabaday⁴, Sevinç Yücecan¹, Seda
Vatansever^{3,4}**

¹Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü,
Lefkoşa, Kıbrıs

²Yakın Doğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Lefkoşa,
Kıbrıs

³Yakın Doğu Üniversitesi, Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Lefkoşa,
Kıbrıs

⁴Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim
Dalı, Manisa, Türkiye

mustafa.h.91@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Pankreas kanseri, heterojen popülasyona sahip bir kanser türüdür. Pankreas kanserinde metastaz, epitelyal-mezenkimal transisyon (EMT) ile ilişkili olarak meydana gelir. Kersetin, EMT ile ilişkili faktörleri (β -katenin, vimentin vb.) inhibe ederek ve kanser kök hücre aktivitesini baskılayarak anti-kanser aktivite gösteren fitokimyasallardan biridir. Bu çalışmanın amacı, pankreas kanseri kök hücrelerinde kersetinin EMT üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada pankreatik kanser kök hücreleri (PANC-1), pankreas kanseri hücre hattından MiniMACS ile CD133 antikoru kullanılarak elde edildi. CD133+ ve CD133- hücreler ayrı ayrı kültüre edilerek 10 µM kersetin 48 saat uygulandıktan sonra hücre sitotoksitesi, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) hücre canlılık testi ile ölçüldü. CD133+ ve CD133- hücrelere 10 µM kersetin 48 saat uygulanmasından sonra tüm hücreler %4 paraformalehit ile fikse edildikten sonra N-kaderin, vimentin ve ACTA-2 dağılımları indirekt immunositokimya analiz yöntemi ile HSCORE değerlendirilmesi ile yapıldı.

Bulgular: Kersetin uygulanan CD133+ kanser kök hücrelerinde vimentin immunoreaktivitesi CD133- hücrelere oranla anlamlı olarak daha yüksek iken ($p<0.05$), N-kaderin immunoreaktivitesinin her iki hücrede de azaldığı saptandı ($p<0.05$). Ayrıca kersetin uygulanmayan CD133+ hücrelerde N-kaderin immunoreaktivitesinin, kersetin uygulanan hücrelere oranla daha fazla olduğu da gözlemlendi. ACTA-2 immunoreaktivitesi ise kersetin uygulaması sonrasında CD133+ hücrelerde, kersetin uygulanmayan CD133+ hücrelere oranla anlamlı derecede azalmış iken ($p<0.05$), kersetin uygulanan CD133- hücrelerinde arttığı tespit edildi.

Sonuç: Kersetin uygulaması sonrasında CD133+ hücrelerde N-kaderin ve ACTA-2 immunoreaktivitesinde azalma, pankreatik kanser kök hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçiş sürecini azalttı. Böylelikle kersetinin bu hücrelerin metastaz yapma potansiyellerini azaltabileceği sonucuna varıldı. Kersetinin özellikle hücre adezyon molekülleri üzerine olan etkisi ile kanser hücrelerinin mezenkimal hücre özelliği kazanmasını azalttığı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: EMT, Kersetin, Vimentin, N-kaderin, ACTA-2

Ek-4: Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Mustafa	Soyadı	Hoca
Doğum Yeri	Gazimağusa	Doğum Tarihi	09.08.1991
Uyruğu	KKTC	Telefon	0533 836 14 01
E-mail	mustafa.h.91@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Yakın Doğu Üniversitesi	2019
Yüksek Lisans	Başkent Üniversitesi	2016
Lisans	Yakın Doğu Üniversitesi	2014
Lise	Namık Kemal Lisesi	2009

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırma Görevlisi (Tam Zamanlı)	Yakın Doğu Üniversitesi	Eylül 2018 - Halen
Araştırma Görevlisi (Yarı Zamanlı)	Yakın Doğu Üniversitesi	Eylül 2016 - Eylül 2018
Stajyer Diyetisyen (Klinik)	Gazimağusa Devlet Hastanesi Gazimağusa/KKTC	Şubat 2014 - Nisan 2014

Stajyer Diyetisyen (Kurum)	Bilkent Üniversitesi Ankara/Türkiye	Ocak 2014 - Şubat 2014
Stajyer Diyetisyen (Klinik)	Ufuk Üniversitesi Dr. Rıdvan Ege Hastanesi Ankara/Türkiye	Eylül 2013 - Ocak 2014

Yabancı Dil	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu
YDÜ Lisansüstü Yabancı Dil Sınavı
78

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)	İyi
SPSS	Orta
Beslenme Bilgi Sistemi (BEBİS)	İyi

Diğer Bilimsel Faaliyetler (Yayın, Kongre Bildirisi vb.)

1. <u>Hoca M</u> , Becer E, Kabadayı H, Yücecan S, Vatansever S. The Effect of Resveratrol and Quercetin on Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem Cell. Nutrition and Cancer. 2019;1-12.
2. <u>Hoca M</u> , Becer E, Kabadayı H, Yücecan S, Vatansever S. The Effect of Resveratrol on Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem Cell. The 6 th World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human and Animal Welfare (WOCMAP VI), Oral Presentation, Famagusta, N. Cyprus, 13-17 November 2019.
3. Özduran G, <u>Hoca M</u> . Tip 2 Diyabet ve İnflamasyon. 2. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi-Endokrin Hastalıklar, Poster Bildirisi, Ankara, 10-12 Ekim 2019.
4. <u>Hoca M</u> , Yücecan S. Probiyotiklerin Antioksidan Özellikleri. Beslenme ve Diyetetik Güncel Konular-8, Bölüm 5, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 1. Baskı, 2019.
5. <u>Hoca M</u> , Özduran G, Susever S. Üniversite Öğrencilerinin Sağlıklı Yaşam Biçimi Davranışlarında Fiziksel Aktivitenin Sürdürülebilirliği. 1. Uluslararası Sürdürülebilir Yaşam Kongresi, Poster Bildirisi, Ankara, 15-16 Mart 2019.
6. Özduran G, <u>Hoca M</u> , Susever S. Sağlıklı Yaşam Biçimi Davranışlarının Sağlıklı Yeme Takıntısıyla İlişkinin Değerlendirilmesi. 1. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, Sözel Bildiri, İstanbul, 1 Mart 2019.
7. <u>Hoca M</u> , Türker PF. 65 Yaş ve Üzeri Yaşlı Bireylerde Nutrisyonel Tarama Aracına Göre El Kavrama Gücünün Değerlendirilmesi. 1. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, Sözel Bildiri, İstanbul, 1 Mart 2019.
8. <u>Hoca M</u> , Türker PF. Yaşlı Bireylerin Beden Kütle İndeksi ile Yaşam Kalitelerinin Değerlendirilmesi. 1. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, Sözel Bildiri, İstanbul, 1 Mart 2019.
9. <u>Hoca M</u> , Becer E, Kabadayı H, Yücecan S, Vatansever S. Kersetinin Pankreatik Kanseri Kök Hücrelerinde Epitelial-Mezenchimal Geçiş Üzerine Etkisi. VI. Nadir Tümörler Sempozyumu-İzmir Onkoloji Günleri, Kanseri Kök Hücre ve Nadir Moleküler Hedeflere Yaklaşım, Sözel Bildiri, İzmir, 22-24 Şubat 2019.

10. <u>Hoca M</u> , Türker PF, Akçil Ok M. Yaşlı Bireylerin Antropometrik Ölçümleri, El Kavrama Gücü ve Beslenme Durumlarının Değerlendirilmesi. 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Sözel Bildiri, Ankara, 29 Kasım-1 Aralık 2018.
11. <u>Hoca M</u> , Özduran G, Susever S. Farklı Eğitim Düzeyindeki Öğrencilerin Fiziksel Aktivite Düzeyleri ve Beslenme Alışkanlıkları. 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Sözel Bildiri, Ankara, 29 Kasım-1 Aralık 2018.
12. Susever S, Kuşu M, Hacet F, <u>Hoca M</u> , Özduran G. Üniversite Öğrencilerinin Obezite Prevalansının ve Öğün Tüketim Alışkanlıklarının Belirlenmesi. 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Poster Bildirisi, Ankara, 29 Kasım-1 Aralık 2018.
13. <u>Hoca M</u> , Türker PF, Akçil Ok M. Situation Assessment of the Elderly in Cyprus, Famagusta in Terms of Kefir, Airan and Milk Consumption, BMI and Quality of Life. The 4 th International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, Poster Presentation, Kyrenia/TRNC, 19-21 April 2018.
14. <u>Hoca M</u> , Türker PF, Akçil Ok M. Association of 65 Years and Over People's Sociodemographic Characteristics, Health Status and Risk of Malnutrition. International Congress on Multidisciplinary Approach to Elderly Health and Care, Poster Presentation, Ankara, 22-23 March 2018.
15. <u>Hoca M</u> , Türker PF, Akçil Ok M. Yaşlı Bireylerin Antropometrik Ölçümleri, Beslenme Durumları ve Yaşam Kaliteleri Arasındaki İlişki. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi: Gastrointestinal Hastalıklar, Sözel Bildiri, İzmir, 5-7 Ekim 2017.
16. <u>Hoca M</u> , Türker PF. Kıbrıs Gazimağusa'da Yaşayan Yaşlı Bireylerin Beslenme Alışkanlıkları, Beslenme Durumları ve Yaşam Kalitesinin Değerlendirilmesi. Beslenme ve Diyet Dergisi. 2017;45(1):44-52.
17. <u>Hoca M</u> , Türker PF, Akçil Ok M. Yaşlı Bireylerin Mini Nütrisyonel Değerlendirme, Antropometrik Ölçümleriyle Yaşam Kalitesi Arasındaki İlişki. Başkent Üniversitesi II. Beslenme ve Diyetetik Öğrenci Kolokyumu, Poster Bildirisi, Ankara, 4-5 Kasım 2016.