



### Role of selenium in breast cancer cell line (MCF-7)

Dilek DÜZGÜN ERGÜN<sup>\*1</sup>, Gülşah KOÇ<sup>2</sup>, Ahu SOYOCAK<sup>2</sup>  
ORCID: 0000-0002-6245-6631; 0000-0003-0999-2774; 0000-0002-9678-5652

<sup>1</sup> İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Turkey

<sup>2</sup> İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Turkey

#### Abstract

Breast cancer is among the common causes of death in the world, it is known that genetic, endocrine and environmental factors play a role in its etiology. Intake of supplements in nutrition is important for the development of new agents for breast cancer treatment or to increase the effectiveness of existing drugs. It is suggested that micronutrients such as selenium taken from vegetable and animal foods such as seafood, legumes, meat, milk, and nuts may play a role in preventing or suppressing cancer by supporting the effectiveness of anticancer agents. In our study, 200 nM selenium was applied to a human breast cancer cell (MCF-7) line for 48 hours. Cell viability by trypan blue method, cell proliferation by XTT, total antioxidant (TAS)-oxidant capacity (TOS) and oxidative stress index (OSI) values were analyzed by ELISA method. A decrease was detected in cell viability, proliferation, TAS, TOS values in the selenium applied group compared to the control group not to statistically significant and an increase was observed in the OSI value. According to the results obtained in our study, it was determined that selenium concentration, which appears to be effective in normal cells, does not show the same effect on breast cancer cells.

**Keywords:** breast cancer, selenium, proliferation, antioxidant, oxidant

----- \* -----

### Meme kanseri hücre dizisinde (MCF-7) selenyumun rolü

#### Özet

Meme kanseri dünyada sık görülen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır, etiolojisinde genetik, endokrin ve çevresel faktörlerin rol aldığı bilinmektedir. Meme kanseri tedavisine yönelik yeni ajanların geliştirilmesi ya da varolan ilaçların etkinliğinin artırılması için beslenmede takviye gıdaların alımı önem taşımaktadır. Deniz ürünleri, baklagiller, et, süt, kabuklu yemişler gibi bitkisel ve hayvansal gıdalardan alınan selenyum gibi mikrobislerin, antikanser ajanların etkinliğini destekleyerek kanserin önlenmesinde ya da baskılanmasında rol alabileceği önerilmektedir. Önceki çalışmalarımızda normal hücre dizilerinde etkinliği belirlenen 200 nM selenyumun (sodyum selenit, Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Se) 48 saat süreyle tek başına insan meme kanser hücre dizisinde (MCF-7) pro-oksidan ya da anti-oksidan özellik gösterip göstermediği araştırılan çalışmamızda, hücre canlılığı tripan blue metodu ile, hücre proliferasyonu XTT metodu ile, total antioksidan (TAS)-oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) değerleri ELISA metodu ile analiz edilmiştir. Selenyum uygulanan grupta hücre canlılığı, proliferasyon, TAS ve TOS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azalma tespit edilmiş, ayrıca OSİ değerinde artış olduğu görülmüştür. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre normal hücrelerde etkin görünen selenyum konsantrasyonunun meme kanseri hücrelerinde aynı etkiyi göstermediği belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** meme kanseri, selenyum, proliferasyon, antioksidan, oksidan

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +95373048036; Fax.: +902124255759; E-mail: dilekergun@aydin.edu.tr

## 1. Giriş

Dünya Sağlık Örgütü tarafından meme kanserinin, kadınlar arasında en yaygın görülen hastalıklar arasında olduğu ve kanser nedeni ölümlerin başında yer aldığı bildirilmiştir [1–4]. Meme kanserinin nedeni tam olarak anlaşılmasına rağmen, genetik, endokrin ve çevresel faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmektedir [5]. Çevresel faktörler arasında yer alan diyet, meme kanserinin en önemli etiyolojik nedenlerinden biridir. Kanseri önlemek, baskılamak ve gelişimini yavaşlatmak için doğal ve sentetik ajanlar kullanılmaktadır [6,7]. Selenyum (Se), organizmada hücresel işlevler için son derece önemli esansiyel bir elementtir. İnsanlarda, selenyumun temel kaynağı diyetdir. Yetişkinlerde diyetle 55 µg/gün selenyum alımı tavsiye edilmektedir. Gıdalarla alınan selenyum miktarının 100-200 µg/gün olmasının kanser gelişimini önleyebileceği, ancak 400 µg/gün olduğunda selenyumun toksik etki oluşturabileceği rapor edilmiştir [8,9]. Selenyum organik ve inorganik olmak üzere iki temel formda bulunur. Organik selenyum alımı selenosistein formunda hayvansal gıdalardan, selenometiyonin formunda ise bitkisel kaynaklı gıdalardan alınabilmektedir. İnorganik tuz formunda olan selenyum ise sodyum selenit ve sodyum selenat formunda olup; yaygın olarak besin zenginleştirme ve diyet desteği olarak kullanılmaktadır. Selenyum kaynağı olarak diyetlerde en çok fındık, ay çekirdeği gibi kabuklu yemişler, yağlı tohumlar, midye, pisi balığı, tuna balığı, karides, somon, yengeç gibi deniz ürünleri, tavuk, sığır eti, hindi, süt, tahıllar ve yumurta tavsiye edilmektedir [10–12]. Diyet ile alınan selenyumun birçok biyolojik aktivitede rol oynadığı bilinmektedir. Selenyum bileşiklerinin kimyasal form, konsantrasyon ve metabolik aktivitesine bağlı olarak çoğu kanser türünü engelleyebileceği, yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik ve karsinojenik etki gösterebileceği rapor edilmiştir [5,6,13,14]. Literatürde selenyumun farklı hücrelerde pro-oksidan veya anti-oksidan gibi davranabileceği bildirilmektedir [6,14,15]. Selenyumun hücre dışından içerisine geçişi 24 saatten sonra tamamlandığından [16], 48 saat tercih edilmiştir. Daha önce yaptığımız çalışmalarda 48 saat süreyle sodyum selenitin çeşitli (100-200 nM) konsantrasyonlarının etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmaların sonunda normal hücre dizisinde reaktif oksijen türlerinin azalmasına destek olabileceği gösterilmiştir [17,18]. Araştırmamızda daha önceki çalışmalarımızda uygulanan ve etkin konsantrasyon olarak belirlenen 200 nM selenyumun meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde hücre canlılığı, proliferasyonu, total antioksidan-oksidan kapasite ve oksidatif stres indeksi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. Hücre kültürü

Çalışmamızda meme kanserine model hücre dizilerinden biri olan MCF-7 hücreleri kullanıldı. MCF-7 hücreleri soğuk zincir ile teslim alındıktan sonra deneysel işlemler yapılana kadar sıvı azot tankında (-196°C) saklandı. Çalışmada kullanılan sodyum selenit (Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Se) (Sigma), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), fosfat tampon solüsyonu (PBS), penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu, tripsin-EDTA (Wisent) ticari olarak temin edildi.

Deneylerde kullanılacak olan ısı ile inaktive edilmiş FBS ve standart kültür besiyeri-cDMEM (%89 DMEM, %9 ısı ile inaktive edilmiş FBS ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu) steril koşullarda hazırlanarak hücrelere uygulandı.

### 2.2. Deney gruplarının oluşturulması

MCF-7 hücreleri steril koşullarda çözündürülerek T25 flasklara ekildi. Ekilen hücrelerin besiyerinin rengi kontrol edildi, canlılıkları ve yoğunlukları invert mikroskopta gözlemlendi. %80 yoğunluğa ulaşan hücrelerden ekim yapılarak kontrol (n=6) ve Se (200 nM) (n=6) grupları oluşturuldu. Ekimden 24 saat sonra ortamdaki besiyeri uzaklaştırılarak, 48 saat süreyle kontrol grubu taze besiyeriyle, selenyum grubu 200 nM Se içeren taze besiyeri ile muamele edildi.

### 2.3. Hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığını belirlemek üzere 6 kuyucuklu plakalara 5x10<sup>5</sup> olarak ekilen hücreler 48 saat inkübasyondan sonra %0,25 Tripsin EDTA ile kaldırıldı. 1200 rpm'de santrifüj edildikten sonra tripan blue ile boyama yapılarak hücre canlılığı hesaplandı. Hücre sayımı yapılırken tripan blue ile boyanmayan hücreler canlı, boyalı hücreler ölü olarak kabul edildi. % canlılık aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Canlı hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$$

### 2.4. Hücre proliferasyonu (XTT) analizi

XTT (Sodium 3,3'-{1-[(phenyl amino) carbonyl]-3,4 tetrazolium}-Bis(4-methoxy-6- nitro) benzene sulfonic acid hydrate) ölçümü, 48 saat inkübasyon sonrasında her bir kuyucuğu 7x10<sup>3</sup> hücre içeren 96 kuyucuklu plakalarda

gerçekleştirildi. Her kuyucuğa 100 uL taze besiyeri ve 50 uL XTT solüsyonu eklenerek 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plakaların optik dansiteleri ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

### 2.5. Total antioksidan-oksidan kapasite ölçümü

Antioksidan ve oksidan kapasiteleri belirlemek üzere  $5 \times 10^5$  hücre 6 kuyucuklu plakalara ekildi. 48 saat sonra tripsinize edilen hücrelerden lizat hazırlandı. Total antioksidan ve oksidan kapasite ölçümü için ticari olarak temin edilen Total Antioxidant Status Assay Kit (TAS) ve Total Oxidant Status Assay Kit (TOS) (Rel Assay Diagnostic-Türkiye) kullanıldı. Kit prosedüründe belirtilen yöntemle hazırlanan lizatlardan ölçüm yapılarak TAS, TOS değerleri ve oksidatif stres indeksi (OSİ) =  $(TOS/(TAS \times 10))$  formülünden OSİ değeri hesaplandı.

### 2.6. İstatistiksel analiz

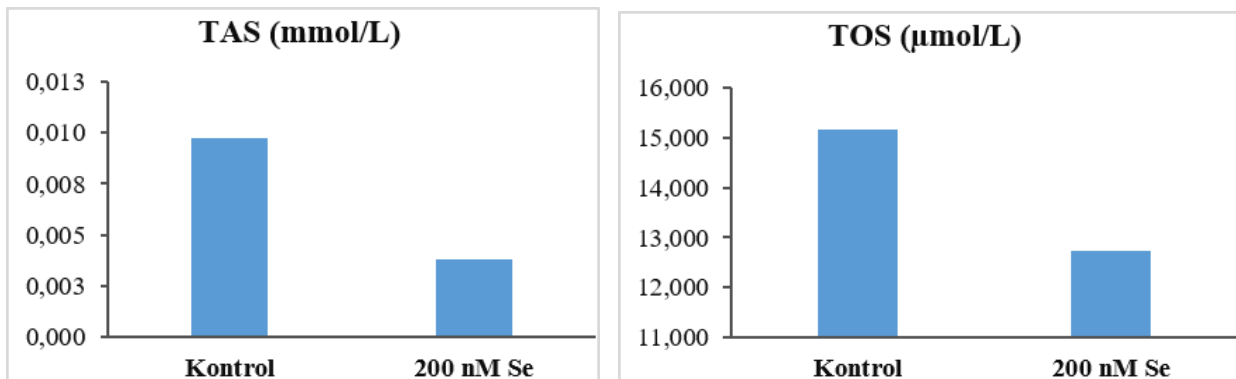
Çalışmadan elde edilen veriler, IBM SPSS 21 paket programı ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testiyle belirlendi. Bağımsız örneklem testlerinden Oneway ANOVA ile gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (Ort  $\pm$  Ss) olarak verildi. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  kabul edildi.

## 3. Bulgular

Çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücrelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında selenyum ile tedavi edilen grupta; canlılık yüzdesinin ve proliferasyonun istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azaldığı belirlendi (Tablo 1). Total antioksidan ve oksidan değerleri hesaplandığında kontrol grubuna göre selenyum grubunda azaldığı gözlemlendi. OSİ değerinin selenyum grubunda %11 arttığı belirlendi (Şekil 1).

Tablo 1. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde canlılık ve proliferasyon değerleri

MCF-7	Kontrol	200 nM Se	p değeri
Canlılık (%)	98 $\pm$ 2,0	97 $\pm$ 3,6	0,696
Proliferasyon (O.D.) (Ort $\pm$ Ss)	0,451 $\pm$ 0,018	0,448 $\pm$ 0,036	0,847



Şekil 1. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde TAS ve TOS değerleri (Ort  $\pm$  Ss)

## 3. Sonuçlar ve tartışma

Diyetle tüketilen mikrobelerin kanser mekanizmasındaki rolünü araştırmak, kanseri kontrol etme ve önleme yollarını bulmak için değerli bir yaklaşım oluşturmaktadır [10–12]. Mikrobesin olarak selenyumun birçok biyolojik aktivitede rol oynadığı bilinmektedir. Selenyum bileşiklerinin kimyasal form, konsantrasyon ve metabolik aktivitesine bağlı olarak, farklı hücrelerde pro-oksidan veya anti-oksidan gibi davranabildiği bildirilmektedir [5,6,13–15].

Literatürde selenyumun farklı kimyasal formlarının, doğal bileşenler ve sitotoksik ajanlarla birlikte kombine edilerek çeşitli kanser hücrelerinde etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur [15,19–23]. Bu çalışmalarda selenyumun metilseleninik asit, metilselenosistein ve nanopartikül formlarının, askorbik asit, folik asit, sisplatin ve diğer anti-kanser ilaçlar ile birlikte kombinasyonunun kanser tedavisinin etkinliğini arttırmak için kullanılabilmesi gösterilmiştir [15,19–25]. Önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, in vitro olarak çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan sodyum selenitin normal hücre dizilerinde anti-oksidan olarak davrandığı belirlenmiştir. Sodyum selenitin 100-200 nM konsantrasyon aralığında, 48 saat süreyle uygulanmasının laktodehidrogenaz (LDH) salınımını azalttığı, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH) seviyelerini arttırdığı ve bu etkileri en fazla 200 nM konsantrasyonda gerçekleştirdiği gözlenmiştir [17,18]. Bu çalışmada selenyumun sodyum selenit formunda MCF-7 meme kanseri hücre dizisindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Çetin ve arkadaşları, 24 saat süreyle 200 nM selenyum uyguladıkları meme kanseri hücrelerinde reaktif oksijen türlerinde anlamlı değişiklik oluşmadığını rapor etmişlerdir [20]. 48 saat süreyle uygulanan sodyum selenitin tek başına nasıl bir etki göstereceğini araştırdığımız çalışmamızda, meme kanseri hücrelerinde canlılığın, proliferasyonun ve total antioksidan-oksidan değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azaldığı, oksidatif stres indeksinde artış olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaların ışığında selenyumun sinerji oluşturarak etki gösterebileceği desteklemekte ve tek başına etkin olabilemesi için in vitro olarak daha uzun sürelerde uygulanması gerekmektedir. Ayrıca çalışmalardan elde edilen sonuçların in vivo ortamda da belirlenmesi selenyumun kanser tedavisindeki rolünün belirlenmesine katkı sağlayacaktır. Bu ön değerlendirme, kanserin önlenmesi ve tedavisinde mikrobeyin tüketiminin tek başına yeterli olamayacağı, bununla birlikte kullanılan mevcut kanser ilaçlarının etkinliğinin artırılmasına katkı sağlayabileceğini desteklemektedir.

### Kaynaklar

- [1] Ullah, F.M. (2019). Breast cancer: Current perspectives on the disease status. *Adv Exp Med Biol*, 1152, 51–64.
- [2] Ganz, P.A. & Pamela, G.J. (2015). Breast cancer survivorship: Where are we today? *Adv Exp Med Biol*, 862, 1–8.
- [3] Maughan, K.L., Lutterbie, M.A., Ham, P.S. (2010). Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*, 1(81), 1339–46.
- [4] Soyocak, A. & Koc, G. (2020). Effect of black grape extract on MMP-9 gene expression in breast cancer cells. *Biological Diversity and Conservation*, 13, 194–199.
- [5] Azizi, E., Shoebi, S., Gabriele, L., G. & Oveisi, M.R. (2003). The inhibitory effects of ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, and sodium selenite on proliferation of breast cancer cell lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 173–177.
- [6] Suzuki, M., Endo, M., Shinohara, F., Echigo, S. & Rikiishi, H. (2010). Differential apoptotic response of human cancer cells to organoselenium compounds. *Cancer Chemother Pharmacol*, 475–484.
- [7] Supuran, C.T., Casini, A. & Scozzafava, A. (2003). Protease inhibitors of the sulfonamide type: Anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. *Med Res Rev*, 23, 535–558.
- [8] Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A. & Khanna, K. (2007). From selenium to selenoproteins: Synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*, 9, 775–806.
- [9] Zimmerman, M.T., Bayse, C.A., Ramoutar, R.R. & Brumaghima, J.L. (2015). Sulfur and selenium antioxidants: Challenging radical scavenging mechanisms and developing structure-activity relationships based on metal binding. *J Inorg Biochem*, 145, 30–40.
- [10] Mueller, A.S., Mueller, K., Wolf, N.M. & Pallauf, J. (2009). Selenium and diabetes: An enigma? *Free Radical Research*, 43, 1029–1059.
- [11] Boasalis, M.G. (2008). The role of selenium in chronic disease. *Nutrition in Clinical Practice*, 23, 152–160.
- [12] Rocourt, C.R. & Cheng, W.H. (2013). Selenium supranutrition: Are the potential benefits of chemoprevention outweighed by the promotion of diabetes and insulin resistance? *Nutrients*, 1349–1365.
- [13] Rikiishi, H. (2007). Apoptotic cellular events for selenium compounds involved in cancer prevention. *J Bioenerg Biomembr*, 39(1), 91–98.
- [14] Gupta, R., Anwar, F. & Khosa, R.L. (2014). Cytotoxic activity of sulphamide with selenium to decrease raised lipid profile in the treatment hepatocarcinogenesis. *AJADD*, 2(1), 14–21.
- [15] Berggren, M., Sittadjody, S., Song, Z., Samira, J.L., Burd, R. & Meuillet, E.J. (2009). Sodium selenite increases the activity of the tumor suppressor protein, pten in DU-145 prostate cancer cells. *Nutr Cancer*, 61, 322–331.
- [16] Whanger, P.D. (2001). Selenium and the brain: A review. *Nutr Neurosci*, 45(3), 164–178.
- [17] Pastacı Ozsobacı, N., Duzgun Ergun, D., Durmus, S., Tuncdemir, M., Uzun, H., Gelisgen, R. & Ozcelik, D. (2018). Selenium supplementation ameliorates electromagnetic field-induced oxidative stress in the HEK293 cells. *J Trace Elem Med Biol*, 50, 572–579.
- [18] Duzgun Ergun, D., Dursun, S., Pastacı Ozsobacı, N., Hatırnaz Ng, O., Naziroglu, M. & Ozcelik, D. (2020). The potential protective roles of zinc, selenium and glutathione on hypoxia induced TRPM2 channel activation in transfected HEK293 cells. *J Recept Signal Transduct Res*, 40(6), 521–530.

- [19] Guo, C.H., Hsia, F.S., Shih, M.Y., Hsieh, F.C. & Chen, P.C. (2015). Effects of selenium yeast on oxidative stress, growth inhibition, and apoptosis in human breast cancer cells. *Int J Med Sci*, 12(9), 748–758.
- [20] Cetin, S.E., Naziroglu, M., Cig, B., Ovey, I.S. & Kosar, P.A. (2017). Selenium potentiates the anticancer effect of cisplatin against oxidative stress and calcium ion signaling-induced intracellular toxicity in MCF-7 breast cancer cells: Involvement of the TRPV1 channel. *J Recept Signal Transduct Res*, 37, 84–93.
- [21] Alkudhayri, A.A., Wahab, R., Siddiqui, M.A. & Ahmad, J. (2020). Selenium nanoparticles induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer (MCF-7) and liver (HEPG2) cell lines. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 12, 324–330.
- [22] Ganash, M.A. (2021). Anticancer potential of ascorbic acid and inorganic selenium on human breast cancer cell line MCF-7 and colon carcinoma HCT-116. *J Can Res Ther*, 17(1), 122-129.
- [23] Pi, J., Jin, H., Liu, R.Y., Song, B., Wu, Q. & Liu, L. (2012). Pathway of cytotoxicity induced by folic acid modified selenium nanoparticles in MCF-7 cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 1051–1062.
- [24] Brozmanova, J., Manikova, D., Vlckova, V. & Chovanec, M. (2010). Selenium: A double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol*, 919–938.
- [25] Zeng, H. & Combs, G.J. (2008). Selenium as an anticancer nutrient: Roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem*, 1–7.