

## Selenyum Dioksit ve Paklitaksel Kombinasyonunun MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi\*

Seda BULUT <sup>1</sup>, Gözde Özge ÖNDER <sup>2,3</sup>, Arzu YAY <sup>2,3</sup>

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, bitkisel kökenli bileşik olan selenyum dioksit (SEL) ile kemoterapötik ilaç olan paklitaksel'in (PTX) kombine uygulamasının MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerine etkisinin belirlenmesidir.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda öncelikle SEL'in yarı maksimal inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla MTT testi yapıldı. Deney grupları SEL1, SEL2, SEL3, PTX, SEL1+PTX, SEL2+PTX ve SEL3+PTX şeklinde oluşturulduktan sonra apoptoz TUNEL metodu, NF-kB ekspresyonu immunofloresan boyama metodu ile hücre canlılığı ise MTT analizi ile gösterildi.

**Bulgular:** SEL'in meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı gösterildi. SEL1, SEL2, SEL3, PTX gruplarında kontrole göre apoptozun arttığı görüldü ( $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,312$ ,  $p<0,001$ ). SEL1+PTX, SEL2+PTX ve SEL3+PTX gruplarında ise PTX grubuna göre apoptozun azaldığı belirlendi ( $p=0,009$ ,  $p=0,011$ ,  $p=0,010$ ). SEL1, SEL2, SEL3, PTX gruplarında kontrole göre NF-kB immünreaktivite yoğunluğunda azalma olduğu görüldü ( $p<0,001$ ,  $p=0,002$ ,  $p>0,999$ ,  $p<0,001$ ). SEL1+PTX, SEL2+PTX ve SEL3+PTX gruplarında NF-kB ekspresyonunda PTX grubuna göre artış olduğu belirlendi ( $p>0,999$ ,  $p>0,999$ ,  $p>0,999$ ). SEL1+PTX, SEL2+PTX ve SEL3+PTX gruplarında PTX grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış olduğu görüldü ( $p>0,999$ ,  $p>0,999$ ,  $p=0,725$ ).

**Sonuç:** Mevcut çalışmada MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisinde SEL ve PTX'in antagonistik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz; MDA-MB-231; NF-kB; paklitaksel; selenyum dioksit.

### Evaluation of the Effect of Selenium Dioxide and Paclitaxel Combination on MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line

#### ABSTRACT

**Aim:** The aim of this study is to determine the effect of the combined application of the plant-derived compound selenium dioxide and the chemotherapeutic drug paclitaxel (PTX) on the MDA-MB-231 breast cancer cell line.

**Material and methods:** In our study, first of all, the MTT test was performed to determine the semi-maximal inhibitory concentration of selenium dioxide. After the experimental groups were formed as SEL1, SEL2, SEL3, PTX, SEL1+PTX, SEL2+PTX, and SEL3+PTX, apoptosis was demonstrated by the TUNEL method, NF-kB expression was demonstrated by the immunofluorescent staining method, and cell viability was demonstrated by MTT analysis.

**Results:** Selenium dioxide has been shown to decrease cell viability in breast cancer cells. Apoptosis was observed to be increased in SEL1, SEL2, SEL3, and PTX groups compared to control ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p=0.312$ ,  $p<0.001$ ). It was determined that apoptosis was decreased in the SEL1+PTX, SEL2+PTX and SEL3+PTX groups compared to the PTX group ( $p=0.009$ ,  $p=0.011$ ,  $p=0.010$ ). A decrease in NF-kB immunoreactivity intensity was observed in the SEL1, SEL2, SEL3, PTX groups compared to the control ( $p<0.001$ ,  $p=0.002$ ,  $p>0.999$ ,  $p<0.001$ ). It was determined that there was an increase in NF-kB expression in the SEL1+PTX, SEL2+PTX and SEL3+PTX groups compared to the PTX group ( $p>0.999$ ,  $p>0.999$ ,  $p>0.999$ ). There was a statistically insignificant increase in cell viability in the SEL1+PTX, SEL2+PTX, and SEL3+PTX groups compared to the PTX group.

**Conclusion:** In the current study, it was determined that SEL and PTX have antagonistic effects on the MDA-MB-231 breast cancer cell line.

**Keywords:** Apoptosis; MDA-MB-231; NF-kB; paclitaxel; selenium dioxide.

1 Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

2 Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

3 Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri, Türkiye

Sorumlu Yazar / Corresponding Author Gözde Özge ÖNDER, e-mail: gozdekorkmaz@erciyes.edu.tr

\*TYL-2021-11044 no'lu proje kodu ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Geliş Tarihi / Received: 06.09.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 27.02.2023

## GİRİŞ

Dünya Sağlık örgütü 2020 yılında dünya genelinde 2,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi konduğunu ve 685.000 kadının ise meme kanserinden öldüğünü bildirmiştir (1). Günümüzde meme kanserinde rutin tedavi olarak kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedaviye ek olarak hedef molekül tedavileri de uygulanmaktadır (2). PTX, rahim ve meme kanseri tedavisinde sıklıkla tercih edilen kemoterapötik ilaçlardan birisidir (3). PTX, hücre bölünmesi sırasında mikrotübül kompleksini etkileyerek hücre döngüsünü durdurmakta ve hücrelerde apoptozu neden olmaktadır (4, 5). Klinik çalışmalar doğrultusunda PTX'in nörotoksitesi, gastrointestinal sistem toksisitesi, miyelosupresif etki ve hipersensitivite gibi yan etkilerinin olduğu belirtilmiştir (6). Bazı insanlarda ise, kanser hücrelerinde PTX'e karşı direncin geliştiği gözlenmiştir (7). Bu negatif etkileri minimize indirmek ve PTX'in kanser hücrelerindeki etkinliğini artırmak üzere, son dönemlerde gerçekleştirilen çalışmalar yön değiştirmiştir. Bu çalışmalar kemoterapötik ilaçların çeşitli doğal bileşiklerle kombinasyonel kullanımları ile etkinliklerinin artırılması üzerine yoğunlaşmıştır (8-10).

Selenyum dioksit, insan sağlığı için esansiyel bir eser element olan selenyumun inorganik formudur (11). Selenyumun, antioksidan etkisiyle kardiyovasküler rahatsızlıklar, nörolojik problemler ve kanser gibi önemli dejeneratif hastalıkların oluşumunun engellenmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (12). Ayrıca kemoterapi ve radyoterapi ile ilişkili yan etkilere karşı alternatif olarak da önerilmektedir (13-16). Selenyumun apoptozu aktivasyonu, hücre çoğalmasının inhibisyonu, immün sistem uyarılması ve anjiyogenezin inhibisyonu gibi mekanizmalar üzerindeki etkisinden dolayı meme kanserinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (17). Ancak kullanılan takviye ajanların kemoterapötik ilaçlarla etkileşimi sonucunda tedaviye nasıl bir yön katacağı değişebilmektedir. Dolayısıyla bu etkiyi belirlemeye yönelik çalışmalar hücre proliferasyonu ve ölümünde etkili olan sinyal yollarındaki moleküller hedef alınarak yürütülmelidir. Bu yollardan biri de apoptozdur. Apoptoz, normal fizyolojik şartlarda, hasar görmüş veya yaşlanmış hücrelerin programlanmış bir mekanizmayla ölmesidir (18). Çoğu kanser çeşidinde apoptotik sinyal yolağında bozulmalar olduğu belirlenmiştir (19). Apoptoz mekanizmasında çok sayıda farklı protein görev yapmaktadır. NF-kB'da bir transkripsiyon faktörü olup bu süreçte rol almaktadır (20). NF-kB, apoptozu uyarıcı moleküle göre hücrelerde pro ya da anti-apoptotik fonksiyon gösterebilmektedir (21).

Meme kanserinde, çeşitli çalışmalarda, selenyum seviyeleri ile kanser riski ve ölüm oranı arasında ters bir ilişki olduğu söylenmektedir (22). Ancak selenyumun inorganik formu olan SEL ile yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle SEL takviyesinin PTX ile birlikte uygulanmasının meme kanseri hücrelerindeki etkilerinin belirlenmesinde hücre apoptozunun moleküler özelliklerinin anlaşılması önemli rol oynamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada SEL'in PTX ile birlikte uygulanmasının MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisinde hücre proliferasyonu, apoptoz mekanizması ile bu süreçte önemli rol oynayan NF-kB üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, TYL-2021-11044 no'lu proje kodu ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın deneysel aşamaları Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi ile Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

### Hücre Kültürü

Çalışmamızda MDA-MB-231 (ATCC kaynaklı) insan meme kanseri hücre dizisi kullanıldı. Hücreler %10 oranında FBS (Gibco, Güney Amerika), %1 L-glutamin (Thermo Fisher Scientific, Rockford, ABD) içeren Dulbecco'nun konsantre Eagle's Medium (DMEM)(Sigma Aldrich, ABD) besiyerinde kültüre edildi. Ayrıca bakteri kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisinden (Capricorn Scientific, Almanya) oluşan antibiyotik solüsyonundan %1 oranında besiyerine eklendi. Hücreler 75cm<sup>2</sup> kültür flasklarına ekildi, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletilerek canlılıklarının devamı sağlandı.

### Selenyum Dioksitin Hazırlanması

SEL (Selenium dioxide; molecular weight: 110,96 g/mol), Merck-Millipore firmasından (800653, Merck, Darmstadt, Almanya) temin edildi. Öncelikle 500µM stok SEL çözeltisi için 1,1 mg SEL tartıldı ve 20 ml steril dH<sub>2</sub>O ile çözdürüldü. Daha sonra 0,2 µm filtreden geçirilerek steril hale getirildi.

### Paklitaksel Dozunun Belirlenmesi

Sıvı formda temin edilen PTX (300 mg/50 ml, Sandoz, Novartis) dozu literatür taraması sonrası 20 nM olarak belirlendi (23-25). Stok solüsyondan besiyeri ile dilüe edilerek hazırlandı.

### Selenyum Dioksitin Yarı Maksimal İnhibitör Konsantrasyon Dozunun Belirlenmesi

SEL uygulaması sonrası yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) dozunun belirlenmesi amacıyla hücre canlılık testi olarak MTT (tetrazolyum (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi kullanıldı (26). Bu amaçla 3 adet (24, 48 ve 72 saat) 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 100µl'de 5x10<sup>3</sup> hücre gelecek şekilde ekildi. Sonra hücrelerin yapışması için 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat ön inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün farklı dozlarda SEL (14µM, 12 µM, 10 µM, 8 µM ve 6 µM) her doz için 100 µl hacimde olacak şekilde ilgili kuyucuğa eklendi. Hücreler daha sonra 24, 48 ve 72 saat boyunca 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörüne yerleştirildi. Her periyodun sonunda uygun plak üzerindeki hücrelere 10 µl MTT (Sigma Aldrich, Amerika) solüsyonu eklendi. Hücreler daha sonra 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'de 4 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında oluşan formazan kristallerini parçalamak için tüm kuyucukların hücrelerine 100 µl DMSO (Sigma Aldrich, Amerika) ilave edildi. Daha sonra 570 nm dalga boyunda spektrofotometre (Promega Glomax Multireader, Wisconsin, Amerika) ile absorbans değeri ölçüldü. Kontrolde göre ilaç uygulanan hücrelerin absorbans değerleri orantılanarak IC<sub>50</sub> dozu belirlendi.

### Deneysel Grupların Oluşturulması

MDA-MB-231 hücre hattı için SEL'in IC50 dozu belirlendikten sonra PTX ile birlikte sekiz grup oluşturuldu; Kontrol grubu, herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadan sadece besiyeri ile inkübe edilen hücre hattı grubu; SEL1 grubu, SEL'in IC50 dozunun iki katının hücrelere uygulandığı grup; SEL2 grubu, SEL'in IC50 dozunun hücrelere uygulandığı grup; SEL3 grubu, SEL'in IC50 dozunun yarısının hücrelere uygulandığı grup; PTX grubu, PTX'in belirlenen dozunun hücrelere uygulandığı grup; SEL1 + PTX, SEL'in IC50 dozunun iki katı doz ve PTX dozunun birlikte hücrelere uygulandığı grup, SEL2 + PTX, SEL'in IC50 dozu ve PTX dozunun birlikte hücrelere uygulandığı grup; SEL3 + PTX, SEL'in IC50 dozunun yarısı ve PTX dozunun birlikte hücrelere uygulandığı grup.

### Apoptoz Analizi

Apoptoz analizi için ApoptTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (EMD Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Hücreler yuvarlak lamellere ekildikten sonra selenyum dioksit ve PTX uygulamaları yapıldı. 24 saat sonra %10 formaldehit solüsyonu ile hücreler fikse edildikten sonra 0.5% Triton X-100 ile 15 dakika muamele edildi. Daha sonra TUNEL karışımı üretici firma talimatlarına göre her bir lamele uygulandı (27). Apoptozu belirlemek için, 400x orijinal büyütme ile her grup için on ayrı mikroskopik alandan görüntü rastgele alındı. TUNEL pozitif hücrelerin immünreaktivite yoğunlukları, Image J yazılımı (ImageJ, Bethesda, Amerika) kullanılarak ölçüldü.

### NF-kB Ekspresyon Analizi

MDA-MB-231 hücre hattında ilaç uygulamaları sonrası NF-kB ekspresyon düzeyini belirlemek üzere immüno floresan boyama metodu kullanıldı. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra %5 goat serumu damlatılarak 1 saat bekletildi. Tekrar fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı. Daha sonra hücreler NF-kB antikor (Santa cruz, Sc-8008, Kaliforniya, ABD) damlatılarak 1 gece +4 °C'de bekletildi. Ertesi gün hücreler 10 dk PBS ile yıkandıktan sonra FITC sekonder antikor ile 60 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkanan hücrelere çekirdek boyanması için bir dakika DAPI uygulandı. Hücreler tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kapatıcı medyum ile kapatıldı. Preparatlar Olympus BX51 floresan mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) altında incelendi. NF-kB ekspresyon düzeyini belirlemek üzere her gruptan rastgele 10 farklı alandan Image J yazılımı (ImageJ, Bethesda, Amerika) kullanılarak ölçüm yapıldı.

### Hücre Canlılığının Gösterilmesi

SEL ile PTX kombine uygulanmasının hücre canlılığına etkisi MTT metodu uygulanarak gösterildi (26). Bunun için besiyeri içerisinde 3x10<sup>3</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya hücre ekimi yapıldı. Ertesi gün belirlenen dozlarda SEL ve PTX solüsyonları belirlenen dozlarda besiyeri ile dilüe edilerek hücrelere uygulandı. Ardından hücreler 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre konuldu. Belirlenen sürenin sonunda ilgili plakadaki hücreler üzerine 10µl MTT (Sigma Aldrich, Amerika) solüsyonu eklendi. Daha sonra hücreler 4 saat süreyle 37 °C, %5

CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bütün kuyucuklardaki hücrelerin üzerine 100 µl DMSO (Sigma Aldrich, Amerika) eklendi. Plakadaki çözeltilerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Promega Glomax Multireader, Wisconsin, Amerika) ölçüldü. Kontrol grubunun absorbans değerinde hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi. Kontrol grubuna göre ilaç uygulanan hücrelerin absorbans değerleri orantılanarak yüzde canlılık değerleri hesaplandı.

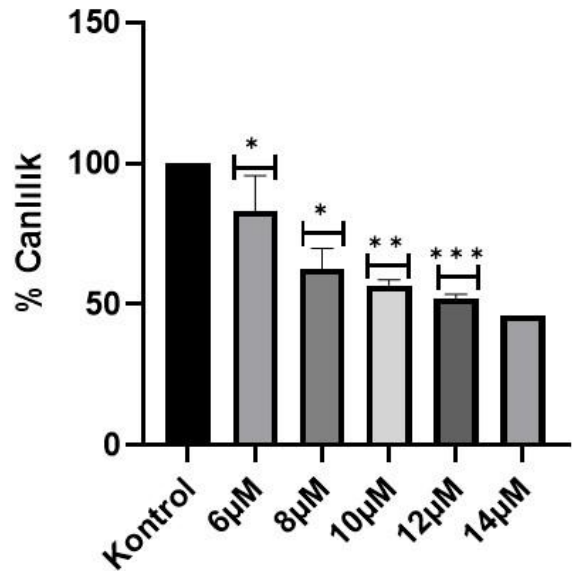
### İstatistiksel Analiz

Her antikorun immünreaktivitesinin yoğunluğu değerlendirilirken, her bir lamelden rastgele 10 farklı alandan Image J yazılım programı kullanılarak ölçüm yapıldı. Verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism 8.0.2 paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-wilk testi ile değerlendirildi. Yüzde canlılık değerlerinin doz gruplarına göre karşılaştırılmaları "one sample t test" ile yapıldı. İki'den fazla gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi kullanıldı. İki'den fazla ölçümler arası karşılaştırmalar için Friedman testi ve tekrarlı ölçümler de varyans analizi ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalar için Dunn-Bonferroni ve Tukey testleri uygulandı. Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi. Veriler ortalama (X) ± standart sapma (SS) olarak ifade edildi.

### BULGULAR

#### Selenyum Dioksitin IC50 Dozunun Belirlenmesi

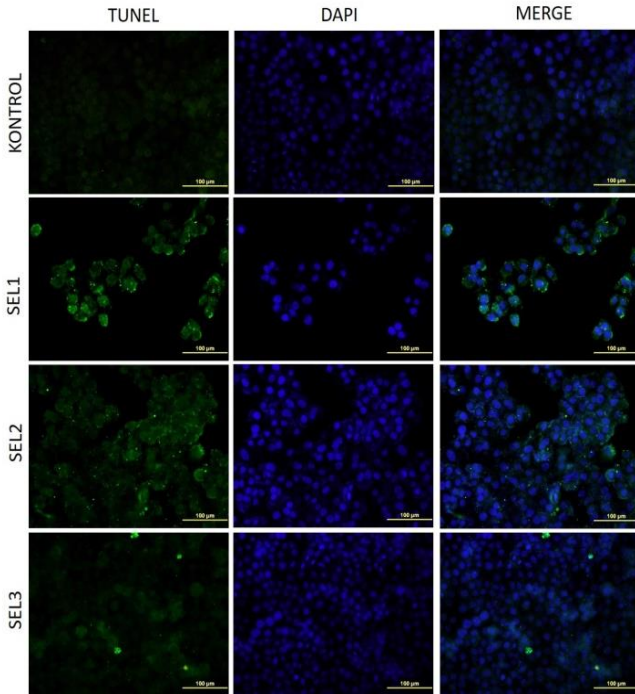
MTT analizi sonrasında 24, 48 ve 72. saatlerde SEL konsantrasyonları hücrelere uygulandıktan sonra meme kanseri hücrelerinin canlılığında önemli bir düşüş olduğu görüldü. Buna göre de IC50 dozu MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı için 12µM-24 saat olarak belirlendi (Şekil 1).



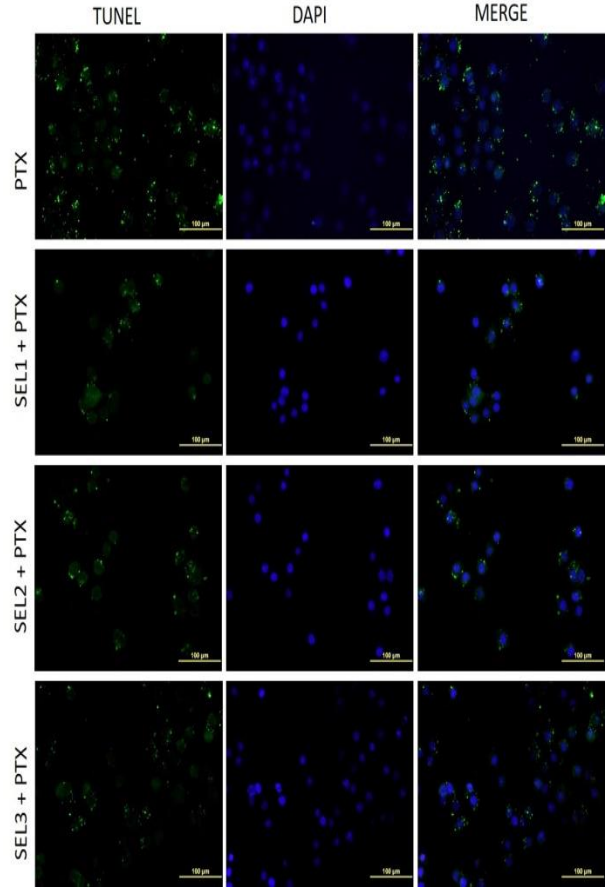
Şekil 1. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ait 24 saat SEL toksisitesi. Her bir SEL dozunun ortalama yüzde canlılık değerleri verilmiştir (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). SEL: selenyum dioksit.

### Apoptoz Analizi Bulguları

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerine SEL ve PTX uygulaması sonrası elde edilen immunofloresan görüntüler şekil 2'de gösterildi. Resimlerdeki yeşil yansımalar TUNEL+ apoptotik cisimciklerdir. Deney gruplarına ait TUNEL+ apoptotik hücre immünreaktivitesinin istatistiksel analiz sonuçları tablo 1'de verilmiştir. SEL'in tek başına meme kanseri hücrelerine uygulanması sonrasında SEL1 ve SEL2 grubunda TUNEL+ apoptotik hücre immünreaktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artma olduğu görüldü ( $p<0,001$ ). SEL3 grubunda ise kontrol grubuna göre apoptotik hücrelerde bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ( $p=0,312$ ). PTX grubunda ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmış apoptotik hücre varlığı dikkati çekti ( $p<0,001$ ). SEL ve PTX'in birlikte uygulandığı gruplara bakıldığında SEL1+PTX grubunda apoptotik hücre yoğunluğunda hem SEL1 ( $p<0,001$ ) hem de PTX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p=0,009$ ). SEL2+PTX grubunda da benzer şekilde SEL2 ve PTX gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p=0,001$ ,  $p=0,011$ ). SEL3+PTX grubu değerlendirildiğinde SEL3 grubu arasında anlamlı fark olmadığı ( $p>0,999$ ), PTX grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ( $p=0,010$ ). SEL1+PTX ( $p=0,009$ ), SEL2+PTX ve SEL3+PTX grupları ile PTX grubu arasında apoptotik hücre yoğunluğunda istatistiksel olarak bir azalma olduğu dikkati çekerken  $p=0,011$ ,  $p=0,010$ , bu üç grubun kendi aralarında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü ( $p>0,999$ ) (Şekil 2, Tablo 1).



**Şekil 2.** SEL ve PTX uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ait TUNEL görüntüleri. Resimlerdeki yeşil yansımalar hücrelerde oluşan apoptotik cisimcikleri göstermektedir. SEL: selenyum dioksit, PTX: paklitaksel.



**Şekil 2 (devamı).** SEL ve PTX uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ait TUNEL görüntüleri. Resimlerdeki yeşil yansımalar hücrelerde oluşan apoptotik cisimcikleri göstermektedir. SEL: selenyum dioksit, PTX: paklitaksel.

### NF- $\kappa$ B Ekspresyon Bulguları

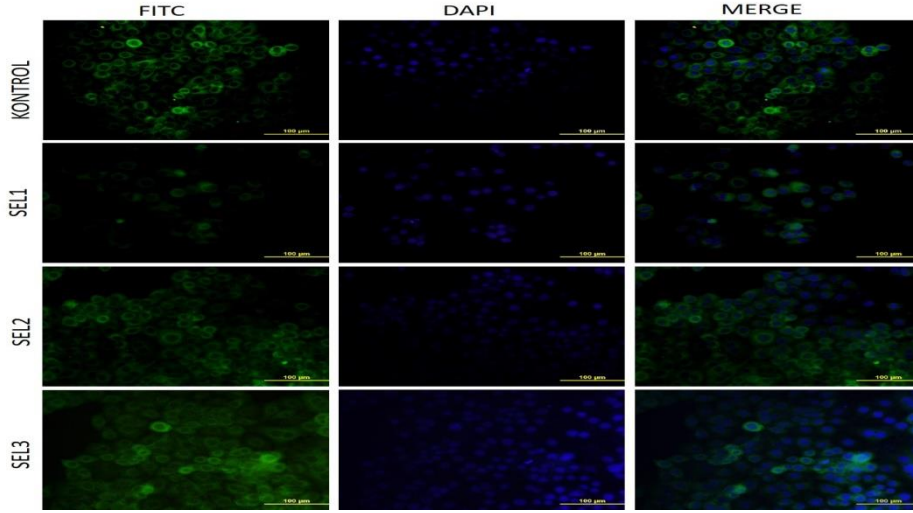
SEL ve PTX'in birlikte MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerine uygulaması sonrası NF- $\kappa$ B ekspresyonuna dair elde edilen immunofloresan görüntüler şekil 3'de gösterildi. Mikroskopik fotoğraflardaki yeşil yansımalar NF- $\kappa$ B'nın sitoplazmik yerleşim gösterdiğini belirledi. Gruplardaki NF- $\kappa$ B immünreaktivite yoğunluğunun istatistiksel sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. SEL'in tek başına uygulanması sonrasında SEL1 ve SEL2 grubunda NF- $\kappa$ B ekspresyonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p<0,001$ ,  $p=0,002$ ). PTX grubunda ise kontrol grubuna göre NF- $\kappa$ B ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı dikkati çekti ( $p<0,001$ ). SEL ve PTX'in birlikte uygulandığı gruplara bakıldığında SEL1+PTX, SEL2+PTX ve SEL3+PTX gruplarında PTX grubuna göre arttığı belirlendi. Ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0,999$ ,  $p>0,999$ ,  $p>0,999$ ) (Şekil 3, Tablo 2).



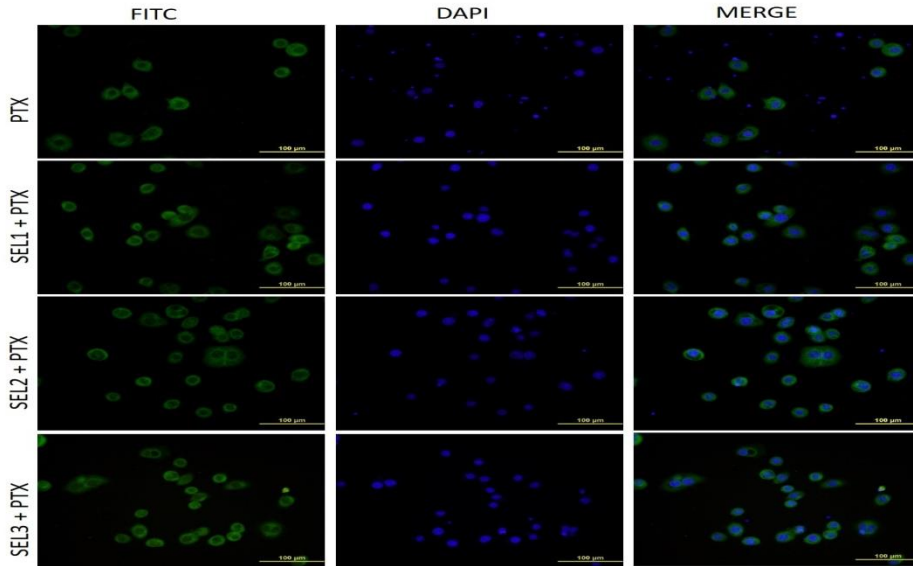
**Tablo 1.** SEL ve PTX uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ait TUNEL istatistiksel analiz sonuçları

GRUPLAR									
KONTROL	SEL1	SEL2	SEL3	PTX	SEL1+PTX	SEL2+PTX	SEL3+PTX	p	
TUNEL	(0.90±0.27) <sup>a</sup>	(4.10±0.89) <sup>b</sup>	(3.26±0.80) <sup>bc</sup>	(1.72±0.21) <sup>a</sup>	(2.94±0.48) <sup>c</sup>	(1.74±0.40) <sup>a</sup>	(1.76±0.39) <sup>a</sup>	(1.75±0.38) <sup>a</sup>	<0.001

Veriler ortalama ( $\bar{X}$ )  $\pm$  standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler farklılığı ifade etmektedir. SEL: selenyum dioksit, PTX: paklitaksel



**Şekil 3.** SEL ve PTX uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ait NF-kB ekspresyonu. Parlak yeşil yansımalar NF-kB ekspresyonunu göstermektedir.



**Şekil 3 (devamı).** SEL ve PTX uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ait NF-kB ekspresyonu. Parlak yeşil yansımalar NF-kB ekspresyonunu göstermektedir. SEL: selenyum dioksit, PTX: paklitaksel.

**Tablo 2.** SEL ve PTX uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ait NF-kB ekspresyonu istatistiksel analiz sonuçları

Gruplar									
	KONTROL	SEL1	SEL2	SEL3	PTX	SEL1+PTX	SEL2+PTX	SEL3+PTX	p
NF-kB	(8.89±2.92) <sub>a</sub>	(1.79±0.48) <sub>b</sub>	(4.62±0.77) <sub>bc</sub>	(7.62±1.14) <sub>bc</sub>	(3.31±1.85) <sub>b</sub>	(4.65±1.11) <sub>bc</sub>	(4.55±1.12) <sub>bc</sub>	(4.53±0.74) <sub>bc</sub>	<0.001

Veriler ortalama (X) ± standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler farklılığı ifade etmektedir. SEL: selenyum dioksit, PTX: paklitaksel.

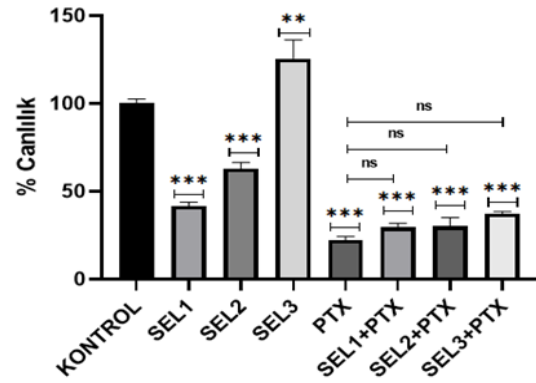
### Hücre Canlılığı Bulguları

SEL ve PTX'in kombine uygulaması sonrasında hücre canlılığı MTT analiziyle değerlendirildi (Şekil 4). SEL1 ve SEL2 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu görüldü ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ). SEL3 grubunda ise kontrol grubuna göre hücre canlılığında anlamlı bir artış olduğu belirlendi ( $p = 0,004$ ). ( $p = 0,003$ ). PTX grubunda hücre canlılığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu dikkati çekti ( $p < 0,001$ ). SEL1+PTX, SEL2+PTX ve SEL3+PTX gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ). SEL1+PTX, SEL2+PTX ve SEL3+PTX gruplarında PTX grubuna göre hücre canlılığında bir artış olduğu belirlendi. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0,999$ ,  $p > 0,999$ ,  $p = 0,725$ ) (Şekil 4).

### TARTIŞMA

Ülkemizde ve dünyada kadınların yaşamlarını olumsuz yönde etkileyen meme kanserinde, görülme sıklığının fazla olması ve büyük oranda ölüme neden olmasından dolayı tedavisine yönelik araştırmalar güncelliğini korumaktadır (2). Son zamanlarda yapılan çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda, doğal bileşiklerin anti-kanser ilaçlar ile birlikte uygulanmasının kanser hücrelerinin duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir (28). Ancak kombine kullanımın meme kanseri hücrelerini ne yönde etkileyeceği henüz tam olarak bilinmemektedir.

Bir ilacın kansere karşı aktivitesinin belirlenmesinde farklı mekanizmalar değerlendirilmekle birlikte özellikle apoptoz ilk sırada yer almaktadır (17). Selenyumun kansere karşı potansiyel etkilerinden bir kısmı antioksidan etki, anjiyogenez, DNA hasarı, ekstraselüler matris düzenlemesi, hücre döngüsü ve apoptoz gibi mekanizmalarla ilişkilidir (29). El-Bayoumy ve ark., selenyum formlarının anti-kanser özelliklerinin gösterilmesinde, kullanılacak selenyumun yapısına ve dozuna dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (17). Watrach ve ark. çalışmalarında in vitro selenyum uygulamasının meme kanseri hücre çoğalmasını %80-93 oranında inhibe ettiğini göstermiştir (30). Kuppusamy ve ark., MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmalarında SEL'in bu hücrelere karşı inhibisyon etki gösterdiğini belirtmişlerdir (22). Ayrıca selenyum formlarının kemoterapötik maddelerle uygulandığı çalışmalarda bulunmaktadır. Selenyumun bir türevi olan metilselenosistein ile taksan



**Şekil 4.** SEL ve PTX'in kombine uygulaması sonrasında MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ait hücre canlılığı. (ns: non-significant  $p > 0,999$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). SEL: selenyum dioksit, PTX: paklitaksel.

grubu ilaçlardan biri olan dosetakselin birlikte prostat kanseri hücrelerine uygulandığı bir çalışmada bu iki maddenin sinerjistik etki göstererek hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir (31). Freitas ve ark. ise, prostat kanseri hücre dizisi olan PC-3 hücreleri ile olan çalışmalarında sodyum selenitin (inorganik bir selenyum formu) dosetaksel ile kombine uygulanmasını araştırdıklarında, bu birlikte kullanımın sinerjistik etki göstererek hücre canlılığını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bu uygulamada proapoptotik faktörlerin etkilenmediği de vurgulanmıştır (32). Mevcut çalışmada, SEL ve PTX kombine uygulamasının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki etkileri araştırıldı. Selenyum dioksit ve PTX'in tek başlarına uygulandığı gruplarda doza bağlı olarak apoptozu aktive ettikleri gösterildi. Ancak selenyum dioksit ve PTX'in kombine uygulandığı gruplarda tek başına PTX uygulanan gruba göre apoptozun azaldığı dikkati çekti.

Apoptoz oldukça karmaşık bir süreçtir ve bu süreçte çok farklı moleküller çalışmaktadır. NF-kB bir transkripsiyon faktörü olup apoptoz düzenlenmesinde rol oynamaktadır (33). NF-kB hücrelerde pro- ya da anti-apoptotik etki gösterebilmektedir. Bu durumda hangi şekilde etkili olacağı apoptozu indükleyen maddenin yapısına bağlı belirlenmektedir (21). Bazı çalışmalarda NF-kB'nin pro-apoptotik etkisi olduğu bildirilmiştir. Ryan ve ark., çalışmalarında p53 uyarımının apoptozu indüklediği ve bu sırada NF-kB ekspresyonunun da arttığını söylemişlerdir (34). Aspirin ve HT29 hücreleriyle yapılan bir çalışmada

ise NF-kB aktivasyonu ile apoptozun uyarıldığını bildirilmiştir (35). NF-kB'nın anti-apoptotik etkisinin gösterildiği bazı çalışmalarda mevcuttur. Davis ve ark çalışmalarında genistein'in NF-kB inhibisyonu ile prostat kanseri hücrelerinde apoptotik yanıtı aktive ettiklerini söylemişlerdir (36). Çelik, ise çalışmasında sarı kantaron bitkisinin bazal hücreli karsinom hücre dizisinde apoptozda rol alan proteinlerin ekspresyonunu aktive ettiği, NF-kB ekspresyonunu ise inhibe ettiğini göstermişlerdir (37). Wang ve ark. ise COX-2 inhibitörü olan selekoksib'in doz ve zamana bağlı olarak MDA-MB-231 ve SK-BR-3 meme kanseri hücre hatlarında apoptozu uyardığı, NF-kB'nın ise ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir (38). Bizim çalışmamızda da SEL ve PTX'in tek başlarına uygulanmaları sonrasında NF-kB ekspresyonunun azaldığı görüldü. SEL ve PTX'in kombine uygulandığı SEL1+PTX, SEL2+PTX ve SEL3+PTX gruplarında ise NF-kB ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı, PTX grubuna göre arttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak SEL ve PTX uygulamasının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde apoptozu uyardığı, NF-kB'nın ekspresyonunu azalttığı belirlendi. Dolayısıyla bu iki madde arasında antagonist etki olduğu ve SEL'in PTX'in apoptotik etkisini azalttığı sonucuna varıldı. Dolayısıyla, bitkisel kökenli bileşiklerin kemoterapötiklerle kombine kullanılmasında dikkatli olunması gerektiği, kemoterapötik maddenin etkinliğini azaltması kanser tedavisinin yönünü değiştirebileceğine dikkat edilmelidir. Bundan dolayı bitkisel kökenli bileşiklerin kemoterapötiklerle birlikte uygulanmasına yönelik daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

**Yazarların Katkıları:** Fikir/Kavram: A. Y., G.Ö.Ö.; Tasarım: A.Y., G.Ö.Ö.; Veri Toplama: G.Ö.Ö., S.B.; Analiz ve Yorum: A.Y., G.Ö.Ö., S.B.; Literatür Taraması: G.Ö.Ö., S.B.; Makale Yazımı: A.Y., G.Ö.Ö.; Eleştirel İnceleme: A.Y.

#### KAYNAKLAR

- World health organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (Erişim tarihi: 02.11.2022).
- Saurel CA, Patel TA, Perez EA. Changes to adjuvant systemic therapy in breast cancer: a decade in review. *Breast Cancer*. 2010; 10: 196-208.
- Karlığa B, Talınlı N. 3'-N-Tiyokarbamat paklitaksel türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivite çalışmaları. *Fen Bilimleri GTÜ Dergisi*. 2004; 2(1): 25-30.
- Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Research*. 1998; 58: 3620-6.
- Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of Paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research*. 1996; 53: 816-25.
- Frederiks C, Lam S, Guchelaar H, Boven E. Genetic polymorphisms and paclitaxel-or docetaxel-induced toxicities: a systematic review. *Cancer Treatment Reviews*. 2015; 41: 935-50.
- Nemcova-Fürstova V, Kopperova D, Balusikova K, Ehrlichova M, Brynychova V, Vaclavikova R, et al. Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016; 310: 215-28.
- Chavoshi H, Vahedian V, Saghaei S, Pirouzpanah MB, Raeisi M, Samadi N. Adjuvant therapy with silibinin improves the efficacy of paclitaxel and cisplatin in mcf-7 breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017; 18: 2243-7.
- Chen NC, Chyau CC, Lee YJ, Tseng HC, Chou FP. Promotion of mitotic catastrophe via activation of PTEN by paclitaxel with supplement of mulberry water extract in bladder cancer cells. *Science Reports*. 2016; 6: 20417.
- Jiang Q, Yang M, Qu Z, Zhou J, Zhang Q. Resveratrol enhances anticancer effects of paclitaxel in HepG2 human liver cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 17: 477.
- Wilber CG. Toxicology of Se: A Review. *Clin. Toxicol*. 1980; 17: 171-230.
- Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61(16): 1988-95.
- Letavayova L, Vlckova V, Brozmanova J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology* 2006; 227: 1-14.
- Fujieda M, Naruse K, Hamazu T, Miyazaki E, Hayashi Y, Enomoto R, et al. Effect of selenium on Cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 104: e112-22.
- Francescato HD, Costa RS, Rodrigues Camargo SM, Zanetti MA, Lavrador MA, Bianchi MD. Effect of oral selenium administration on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43: 77-82.
- Tang HL, Yuen KL, Tang HM, Fung MC. Reversibility of apoptosis in cancer cells. *British Journal of Cancer*, 2009; 100: 118-22.
- El-Bayoumy K, Sinha R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res*. 2004; 551: 181-97.
- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Prof.Dr.Ramazan Demir, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006, 600.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 2005; 55: 178-94.
- Aggarwal Bb. Nuclear factor-kappaB: The Enemy Within. *Cancer Cell*. 2004; 6: 203-208.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann Tg, Hehner Sp, Droge W, Schmitz Ml. The Pro-or anti-apoptotic function of nf-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem*. 2000; 267(12): 3828-35.
- Kuppusamy UR, Wan YP, Kanthimathi MS. A comparison between selenium dioxide and selenium methionine induced cytotoxicity in estrogen receptor negative and positive breast cancer cell lines. *Journal of Food Technology*. 2005; 3(3): 280-3.
- Sprouse AA, Herbert BS. Resveratrol augments paclitaxel treatment in MDA-MB-231 and paclitaxel-resistant MDA-MB-231 breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2014; 34: 5363-74.
- Tinghua Xu, Pengxi Liu, Qingming Li, Changbin Shi, Xinjie Wang. Inhibitory effects of everolimus in

- combination with paclitaxel on adriamycin-resistant breast cancer cell line MDA-MB-231. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2020; 59(6): 828-34.
25. Zhang L, Wu C, Mu S, Xue W, Ma D. A chemotherapeutic self-sensitized drug carrier delivering paclitaxel for the enhanced chemotherapy to human breast MDA-MB-231 cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019; 181: 902-9.
  26. Yerlikaya S, Zengin G, Mollica A, Baloglu MC, Celik-Altunoglu Y, Aktumsek A. A Multidirectional perspective for novel functional products: in vitro pharmacological activities and in silico studies on ononis matrix subsp. hispanica. *Frontiers in Pharmacology*. 2017; 8: 600.
  27. Baran M, Ozturk F, Canoz O, Onder GO, Yay A. The effects of apoptosis and apelin on lymph node metastasis in invasive breast carcinomas. *Clinical and Experimental Medicine*. 2020; 20: 507-14.
  28. Nabekura T. Overcoming multidrug resistance in human cancer cells by natural Compounds. *Toxins*. 2010; 2(6): 1207-24.
  29. Alaejos MS, Romero FRD, Romero CD. Selenium and cancer: some nutritional aspects. *Nutrition* 2000; 16: 376-83.
  30. Watrach AM, Milner JA, Watrach MA, Poirier KA. Inhibition of human breast cancer cells by selenium. *Cancer Lett*. 1984; 25: 41-7.
  31. Azrak RG, Frank CL, Ling X, Slocum HK, Li F, Foster BA, et al. The mechanism of methylselenocysteine and docetaxel synergistic activity in prostate cancer cells, *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2540-8.
  32. Freitas M, Alves V, Sarmento-Ribeiro AB, Mota-Pinto A. Combined effect of sodium selenite and docetaxel on PC3 metastatic prostate cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 201; 408(4): 713-9.
  33. Aggarwal Bb. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*. 2004; 6: 203-8.
  34. Ryan Km, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*. 2000; 404: 892-7.
  35. Stark LA, Reid K, Sansom OJ, Din FV, Guichard S, Mayer I, et al. Aspirin activates the NF- $\kappa$ B signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 2007; 28 (5): 968-76.
  36. Davis JN, Kucuk O, Sarkar FH. Genistein inhibits nf-kb activation in prostate cancer cells, *Nutrition and Cancer*. 1999; 35(2), 167-74.
  37. Çelik E. Apoptotic and anti-inflammatory effects of hypericum perforatum extract in human basal cell carcinoma TE 354.T cell line. *Dicle Med J*. 2021; 48(1): 92-8.
  38. Wang G, Li J, Zhang L, Huang S, Zhao X, Zhao X. Celecoxib induced apoptosis against different breast cancer cell lines by down-regulated NF-kB pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017; 490: 969-76.