





Kuersetinin İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Investigation of the Effect of Quercetin on Human Breast Cancer Cell Line

Münevver BARAN¹  Özge GÖKTEPE^{2,3}  Gözde Özge ÖNDER^{2,3}  Zeynep Burçin GÖNEN³ 

Arzu YAY^{2,3} 

ÖZ

Amaç: Meme kanseri, farklı epigenetik değişiklikler ve genetik mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkan yaygın bir kanserdir. Doğal olarak oluşan Kuersetin, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser özellikler sergileyen ve çok sayıda hücre içi hedefi yöneten bir flavonoid'dir. Bu çalışma da, MCF-7 meme kanseri hücre hattında Kuersetinin apoptoz /otofaji süreçleri üzerine olası etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Araçlar ve Yöntem: Kuersetinin IC50 değerini 3-4.5-dimetil-tiyazolil-2.5-difeniletrozolyum bromid (MTT) analiz ile belirlemek için MCF-7 meme kanseri hücre hattına farklı konsantrasyonlar da ve sürelerde (24, 48 ve 72. saatte) kuersetin uygulandı ve gruplar oluşturuldu. Kontrol grubu; hiç bir uygulama yapılmayan grup, Kuersetin 1; kuersetinin IC50 dozunun uygulandığı grup, Kuersetin 2; kuersetin'in IC50 dozunun yarısının uygulandığı grup, D 1; kuersetin 1 grubunda kuersetin hazırlanmasında kullanılan DMSO oranının uygulandığı grup ve D 2; kuersetin 2 grubun da kuersetin hazırlanmasında kullanılan DMSO oranının uygulandığı grup. Kuersetinin apoptotik etkisini değerlendirmek için TUNEL boyama yöntemi kullanılırken, otofajik etkisini ortaya çıkarmak için LC3/2 ve Beklin-1 immünofloresan boyama yöntemi uygulandı.

Bulgular: Kuersetinin hücreler üzerine etkisine bakıldığında, hücre canlılığının doz ve zamana bağlı olarak inhibe olduğu görüldü. Bunun yanında otofaji belirteçleri olan Beklin-1 ve LC3/2 immunreaktivitesinin de arttığı gözlemlendi.

Sonuç: Sonuç olarak, kuersetinin apoptoz ve otofaji yolları ile MCF-7 meme kanseri hücrelerini ölüme götürdüğü gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: apoptoz; kuersetin; MCF-7 hücre hattı; otofaji

ABSTRACT

Purpose: Breast cancer is a common cancer that occurs due to different epigenetic changes and genetic mutations. Naturally occurring Quercetin is a flavonoid that exhibits antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties and manages multiple intracellular targets. In this study, it was aimed to investigate the possible effect of Quercetin on apoptosis/autophagy processes in MCF-7 breast cancer cell line.

Materials and Methods: Quercetin was applied to MCF-7 breast cancer cell line at different concentrations and times (24, 48 and 72 hours) to determine the IC50 value of quercetin by 3-4.5-dimetil-tiyazolil-2.5-difeniletrozolyum bromid (MTT) analysis, and groups were formed. Control group; no treatment group, Quercetin 1; IC50 dose of quercetin administered group, Quercetin 2; group in which half the IC50 dose of quercetin was administered, D 1; In the quercetin 1 group, the DMSO ratio used in the preparation of the quercetin was applied, and D 2; In the quercetin 2 group, the DMSO ratio used in the preparation of the quercetin was applied, While TUNEL staining method was used to evaluate the apoptotic effect of quercetin, LC3/2 and Beclin-1 immunofluorescence staining method was applied to reveal its autophagic effect.

Results: When the effect of quercetin on cells was examined, it was observed that cell viability was inhibited depending on dose and time. In addition, it was observed that the autophagy markers Beclin-1 and LC3/2 immunoreactivity increased, too.

Conclusion: In conclusion, it was observed that quercetin led to death of MCF-7 breast cancer cells through apoptosis and autophagy pathways.

Keywords: apoptosis; autophagy; MCF-7 cell line; quercetin

Gönderilme tarihi: 06.10.2021; Kabul edilme tarihi: 29.03.2022

¹ Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

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

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

Sorumlu Yazar: Münevver Baran, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye. e-posta: b.munevver@hotmail.com

Makaleye atf için: Baran M, Göktepe Ö, Önder GÖ, Gonen ZB, Yay A. Kuersetinin insan meme kanseri hücre hattı üzerine etkisinin incelenmesi. Ahi Evran Med J. 2022;6(3):261-269. DOI: 10.46332/aemj.1005558

GİRİŞ

Meme kanseri, yüksek malignite ve mortalite açısından önemli bir kanser çeşididir.¹ Meme kanserinde tedaviye yönelik olarak cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri kullanılmakla birlikte ölüm oranı halen yüksek seviyelerdedir.²

Meme kanseri çeşitli morfolojik, histopatolojik ve prognostik özelliklere sahip olmasıyla oldukça heterojen bir hastalık grubu olmasından dolayı tedavilere farklı şekillerde cevap vermektedir.³ Tedaviye yanıtı arttırmak için meme kanserinin özelliklerinin belirlenmesi ve özgün ilaçların geliştirilmesi hastalığın prognozu açısından önemlidir.⁴

Hastalıkların tedavisinde kullanılan doğal ürünler ve bunların türevleri malign bozuklukların önlenmesinde fitokimyasalların önemini kanıtlamıştır.⁵ Çeşitli kanser türlerine karşı kullanılan fitokimyasallar anti-kanser özelliklere sahiptir.⁶ Birçok bitkinin içeriğinde bulunan Flavonoidler, düşük moleküler ağırlığa sahip polifenolik bileşiklerdendir.⁷ Bu bileşikler, kanserojen sürecin belirli aşamalarına müdahale edebilir, hücre proliferasyonunu inhibe edebilir ve çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebilir.⁸ Bu nedenle bilimsel çalışmaların çoğunluğu biyoyararlılığı oldukça yüksek olan kuersetin molekülü ile yapılmaktadır.⁹ Kuersetin lipofilik olduğundan, hücre zarları geçebilir ve birçok hücre içi yolağı tetikleyebilir.¹⁰ Çeşitli doğal biyoaktif moleküllerin varlığının yanı sıra, etkili kanser tedavisinin hala geliştirilmesi gerekmektedir. Dahası, etkili bir tedaviyi tasarlamak için, bu tür doğal moleküllerin tanınmış hücre hedefleriyle etkileşimlerini anlamak çok önemlidir. Hem in vivo ve hem de invitro çalışmalarla, Kuersetinin meme dahil çeşitli kanser hücrelerinde inhibe edici etkisi gösterilmiştir.¹¹ MCF-7 meme kanseri hücre hattı sıklıkla klinik öncesi araştırmalarda tercih edilmektedir.¹² MCF-7 hücreleri, östrojen reseptörü (ER) pozitif meme kanseri hücre hattı olup değişen nükleer reseptör ekspresyon seviyeleri ile farklı östrojen reseptörü pozitif olan tümör sınıflarını temsil etmektedir.¹³

Önemli anti-tümör aktiviteye sahip olan Kuersetinin hücre içi hedeflerinin farklı moleküler yollara sahip olduğuna inanılırken, bu aktivitenin tam mekanizmaları net değildir.¹⁰ Otofajiyi ve apoptozu doğal ürünlerle hedeflemek,

çeşitli bozuklukların önlenmesi ve tedavisi için potansiyel bir terapötik strateji olarak kabul edilir. Birkaç çalışma, kuersetinin anti-kanser etkilerinin, kanser hücrelerinde ve ksenograf modellerinde otofaji ve apoptozu indükleme kabiliyetiyle ilişkili olduğunu göstermektedir.¹⁴⁻¹⁸ Kuersetinin apoptozisi tetikleyen etkilerini gösteren bu çalışmalarla birlikte, moleküler hedeflerini belirlemek için Kuersetinin farklı apoptotik yollar üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar devam etmektedir. Literatürdeki mevcut bilgilere ek olarak bu çalışma ile MCF-7 meme kanseri hücre hattında apoptoz ve otofaji mekanizmaları üzerine Kuersetinin olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

ARAÇLAR ve YÖNTEM

Hücre Kültürü

MCF-7 hücre hattının kültürü için Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerinin içerisine %10 Fetal Sığır Serum (FBS), %1 L-Glutamin ve Penisilin Streptomisin ilave edildi. 25 cm²'lik flasklardaki taze besiyerine ekilen hücreler 37°C'lik nemli atmosfere sahip %5 CO₂ içeren nemli ortam içeren inkübatör içinde yeterli yoğunluğa ulaşana kadar büyütüldü. Daha sonra tripsin ilave edilerek pasajlama protokolü uygulandı. Hücreler tekrar besiyeri ile süspansiyon halinde bir araya getirildi ve flasklara ekilerek aynı atmosferde büyütülmeye devam edildi.

Kuersetinin Hazırlanması

Kuersetin (Sigma Aldrich) DMSO'da çözdürüldü ve hazırlanan 10mM'lık stok çözeltisi filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Uygulamada doz belirlemek için kullanılacak olan kuersetin çözeltileride besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

MTT Hücre Canlılık Testi

Hücre kültüründe ilaç uygulamaları çalışmalarında sitotoksik ya da proliferatif etkileri belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.¹⁹

Kuersetinin IC50 (hücrelerin %50'nin öldüğü konsantrasyon) dozunun belirlenmesi amacıyla MTT hücre canlılık testi uygulandı. Bu amaçla, kuersetin dozları 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM ve 40 µM olarak belirlendi.²⁰ Aynı zamanda uygulanan dozların zamana bağlı etkisini görmek

için 24, 48 ve 72. saatler analiz edildi. Öncelikle yeterli sayıda 96 kuyucuklu plakaya 3×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Belirlenen dozlar üç farklı kuyuya olacak şekilde uygulandı. Kontrol grubuna hiçbir ilaç uygulanmadı. Belirlenen süre sonunda ilgili plakada ki hücreler üzerine 10µl MTT solüsyonu eklenip, 4 saat süreyle 37°C'lik, %5 CO₂'li nemli atmosferde inkübasyona bırakıldı. MTT solüsyonu dökülerek hücrelerin üzerine DMSO eklenmiştir. Plakalardaki renk değişimi absorban değerleri 570 nm dalga boyunda olan spektrofotometre ile okunmuştur. Böylelikle Kuersetinin MCF 7 hücre hattındaki hücrelerin canlılığı üzerine dozun (IC50 değeri) etkisi ve etkinlik zamanı belirlendi ve ardından çalışma için gruplar oluşturuldu;

Kontrol grubu: İlaç uygulaması yapılmayan hücre hattı grubu, Kuersetin 1 grubu: Hücrelere üzerine Kuersetinin IC50 dozunun uygulandığı grup, Kuersetin 2 grubu: Kuersetinin belirlenen IC50 dozunun yarısının uygulandığı grup, D 1 grubu: Kuersetin 1'in hazırlanmasında kullanılan DMSO oranının uygulandığı grup ve D 2 grubu: Kuersetin 2'nin hazırlanmasında kullanılan DMSO oranının hücrelere uygulandığı grup.

24 kuyucuklu platalere hücre ekimi yapıldıktan sonra belirlenen dozlarda kuersetin ve DMSO eklenerek 24 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklar DPBS ile iki kez yıkandı ve hazırlanan formaldehit solüsyonu ile tespit işlemi yapıldı.

TUNEL Boyama Metodu

Apoptozu değerlendirmek için TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick endlabeling) boyamasında ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit'i (EMD Millipore, Darmstadt, Germany) kullanıldı ve Datasheet üzerindeki talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Hücre ekilmiş yuvarlak lameller buffer ile yıkandı, equilibration buffer da bekletildikten sonra yıkamadan TUNEL karışımı ile 1 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında lamellerin üzerine stop/wash buffer uygulandı ve 37°C'lik etüvde bekletildi. Yıkama işleminden sonra antidigoxigenin conjugate solüsyonunda 30 dk. oda ısısında muamele edildi. Tekrar lameller yıkandı ve çekirdek boyaması için DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) damlatıldı. Su bazlı kapatıcı

ile lam üzerine yuvarlak lameller kapatıldı. Olympus BX51 floresan mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) altında hücreler incelendi ve fotoğraflar çekildi.

İmmunofloresan Boyama Metodu

Hücre hattında LC-3/2 ve Beklin-1 ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için immunofloresan boyama tekniği uygulandı. Daha önceden ekilmiş olan yuvarlak lameller buffer ile yıkandıktan sonra goat serum ile 60 dk. inkübasyona bırakıldı. Ardından hücreler LC-3/2 ve Beklin-1 antikorları ile overnight olacak şekilde +4°C'de bekletildi. Ertesi gün buffer ile iki kez yıkandıktan sonra oda sıcaklığında sekonder antikor ile inkübe edildi. Tekrar buffer ile yıkanan lamellere çekirdek boyaması için DAPI damlatıldı. Hücreler yıkama işleminin ardından su bazlı kapatıcı ile kapatıldı. Olympus BX51 floresan mikroskopta incelendi ve fotoğraflandı.

İstatistiksel Analiz

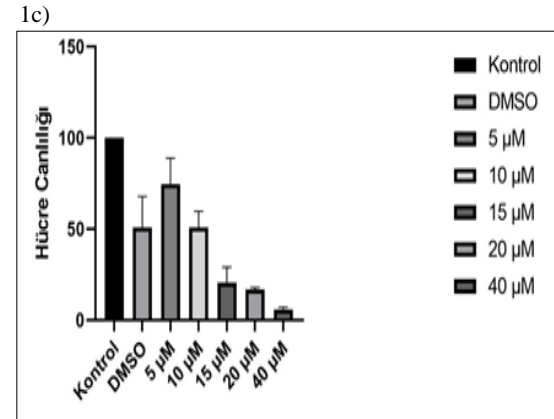
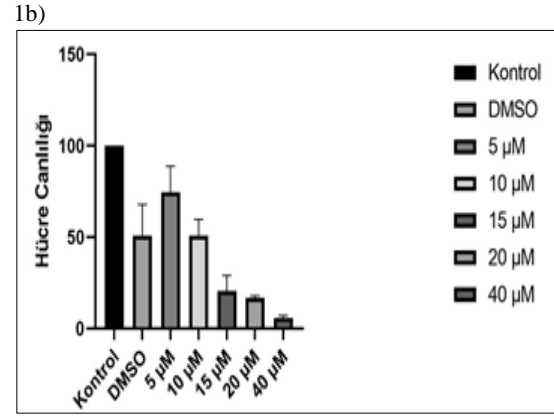
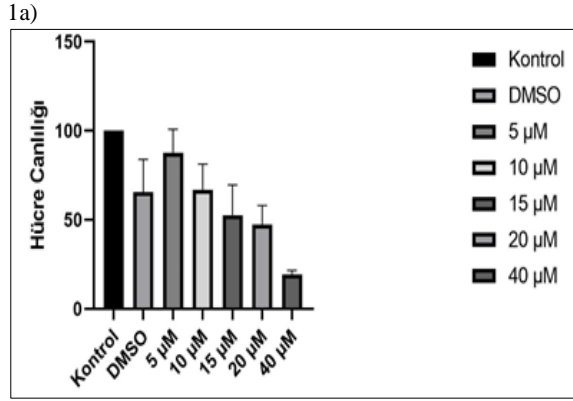
Tüm istatistiksel analizler Graphpad prism Version 8.0 istatistik yazılım programı aracılığı ile gerçekleştirildi. Verilerin Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile verilerin normal dağılıma uygunluğuna bakıldı. Normal dağılım gösterenler gruplarda One Way Anova uygulanırken, normal dağılım göstermeyen gruplarda ise Kruskal Wallis testleri yapıldı. Anlamlılık gösteren değişkenlerin post-hoc karşılaştırmaları One Way Anova testi için Bonferroni, Kruskal Wallis testi için Dunn's testi ile gerçekleştirildi. $p < 0.05$ 'ten küçük olan p değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

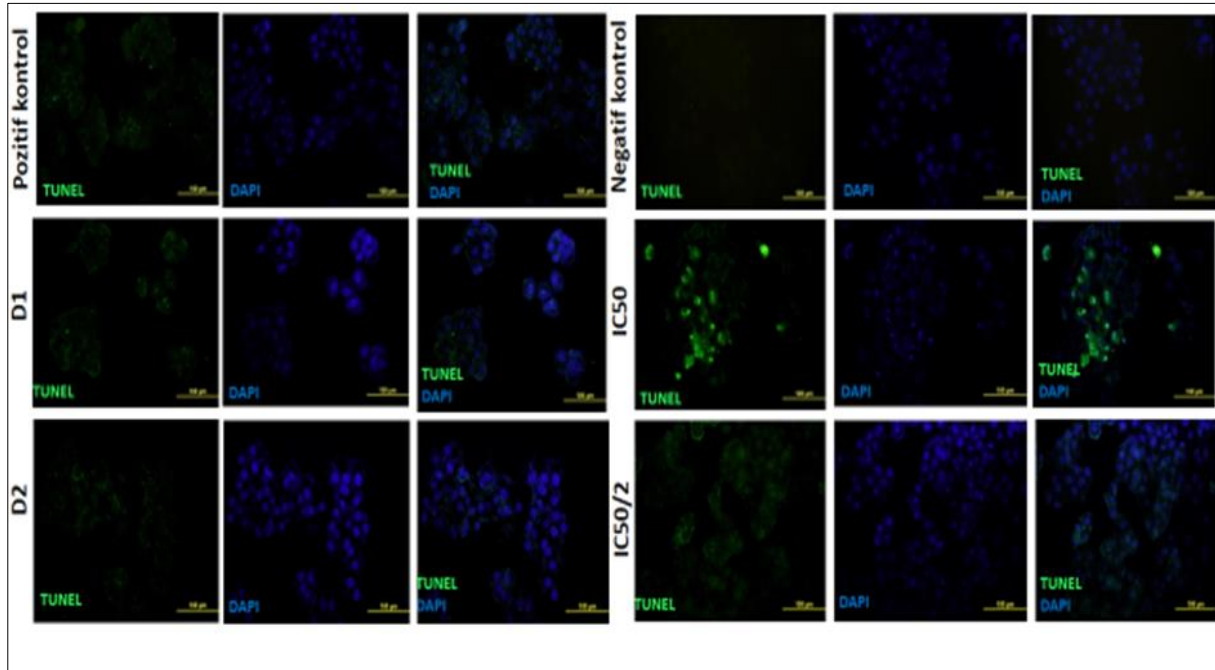
Hücre canlılığını test etmek için MTT analizi yapıldı. İlk olarak kuersetin'in farklı dozları MCF-7 hücreleri üzerine uygulandı ve 24, 48 ve 72 saat aralıklar ile hücre canlılıklarına bakıldı. Yüzde canlılık değerlerinin doz gruplarına (5 µM ile 40 µM dozları arasında) göre karşılaştırmaları one sample t test ile bakıldı ve istatistiksel olarak 5 µM ile 40 µM dozları arasında anlamlı bir azalmanın olduğu gözlemlendi (Şekil 1). Uygulama saatlerinin birbiri ile karşılaştırılması tek yönlü ANOVA testi ile yapıldı. MTT analiz sonuçlarına göre 24. saatte ki IC 50 dozu 15 µM olarak belirlendi. Kuersetin uygulanan MCF-7 hücre gruplarında

kontrol grubuna göre hücre canlılığında 24. saat sonunda doz artışına bağlı olarak azalma gözlemlendi. Sonuç olarak kuersetinin hücre canlılığı üzerine negatif etkisinin yanı sıra proliferasyonu inhibe edici özelliğe sahip olduğunu gösterdi. Böylece hücreler apoptoza giderken otofaji yolundaki değişimleri değerlendirebilmek için 24 saatlik uygulama işleminin çalışma açısından yeterli olabileceği gösterilmiştir (Şekil 1).

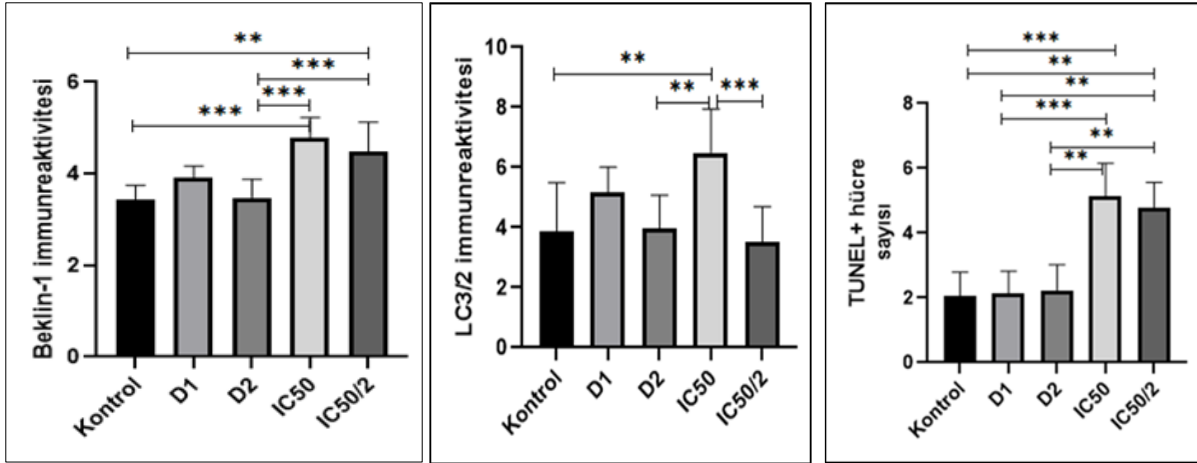
TUNEL metodu ile MCF-7 hücre hattı üzerine kuersetinin farklı dozlarının apoptoz üzerine olası etkisi ile değerlendirildiğinde TUNEL (+) apoptotik cisimcikler floresan mikroskopta yeşil ışımalar şeklinde görüldü (Şekil 2).



Şekil 1. Kuersetinin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi. 24 saat (1a), 48 saat (1b) ve 72 saat (1c) boyunca farklı konsantrasyonlarda kuersetin uygulaması sonucunda elde edilen hücre canlılığı grafikleri.



Şekil 2. İlk sütundaki yeşil yansımalar TUNEL+ apoptotik cisimcikleri göstermektedir. DAPI: 4,6-diamidino-2'-phenylindole. Skala bar: 100 µm'dir (Tunel boyama).



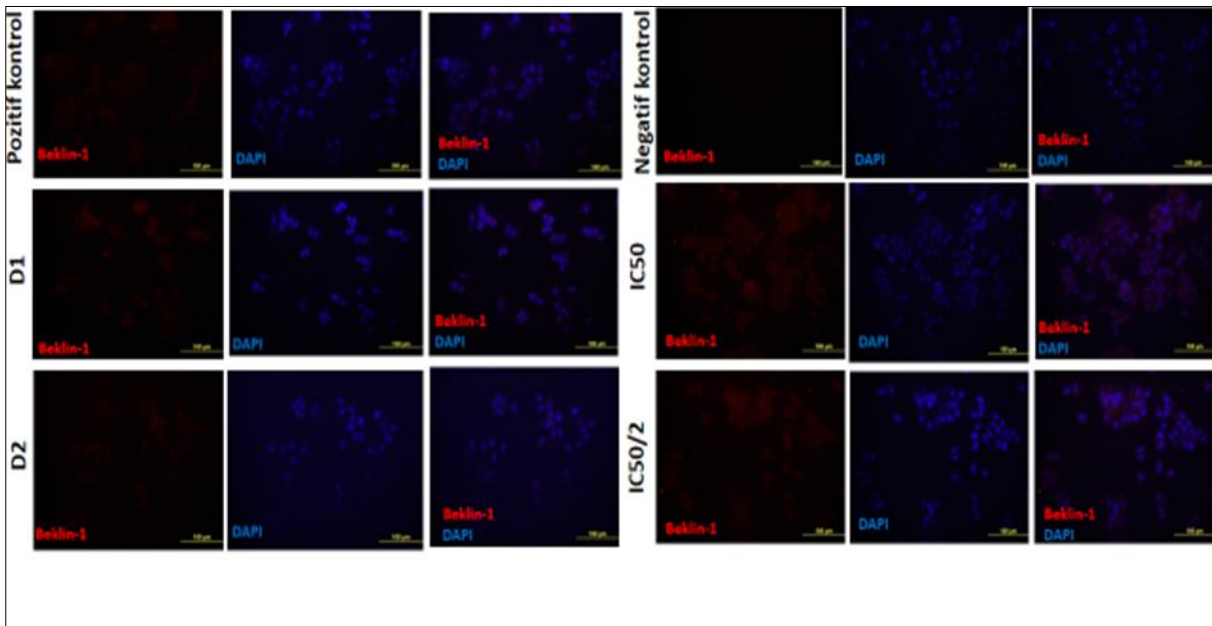
Şekil 3. MCF-7 hücrelerine uygun konsantrasyonda kuersetin uygulaması sonucunda elde edilen TUNEL pozitif hücre sayısı, Beklin-1 ve LC3/2 immünreaktivite sonuç grafikleri (** p<0.01, *** p<0.001).

IC50 grubu hem kontrol hem de D1 grubu ile aralarında anlamlı bir farklılık vardı (p<0.001). IC50/2 grubuyla ayrı olmak üzere kontrol, D1 ve D2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi. Ayrıca IC50 ile D2 grubu arasında farklılık vardı (p<0.01). Diğer gruplar arasında farklılık görülmemiştir (p>0.999) (Şekil 3).

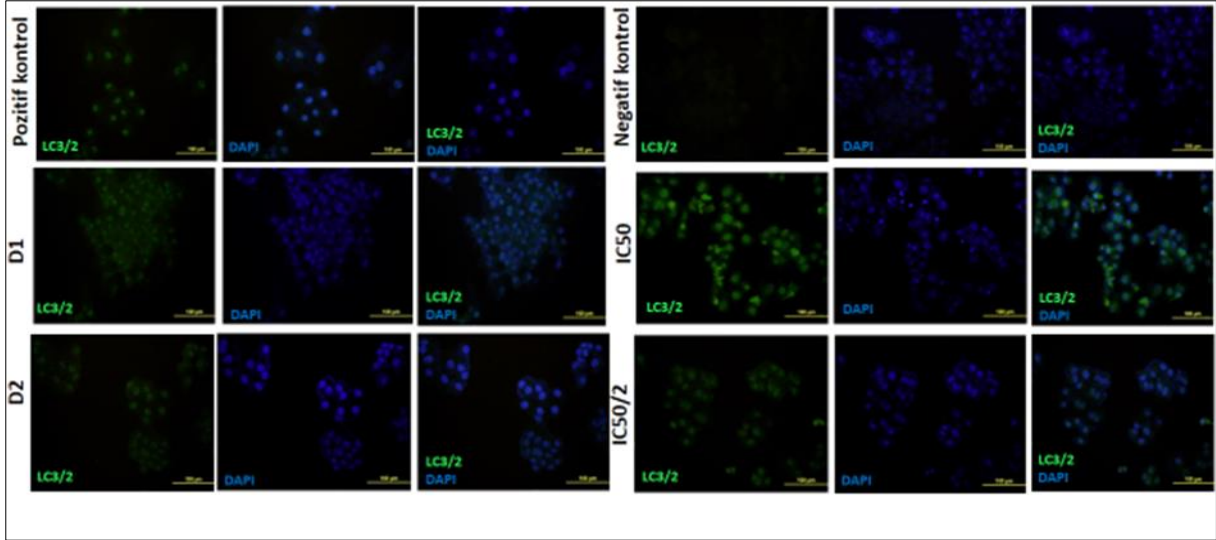
Kuersetinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkisinde otofaji markerlarından hem LC3/2 hem Beklin-1 immünreaktivitesi değerlendirildiğinde IC50 dozunun uygulandığı grupta en yüksek immünreaktivite olduğu gözlemlendi (Şekil 3). Floresan mikroskopta hücre sitoplazmalarında kırmızı yansımalar Beklin-1 ekspresyonunu gösterdi. IC50 grubuna ait Beklin-1 immünreaktivite yoğunluğunun hem kontrol

grubu ile hem de D2 grubu ile aralarında anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (p<0.001). Bu farklılık IC50/2 grubu ile D2 grubu arasında da gözlemlenmiştir (p<0.001). Diğer taraftan ise kontrol grubu ile IC50/2 grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlemlendi (p<0.01). Kalan gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (p>0.05) (Şekil 4).

Floresan mikroskopta sitoplazma içerisinde dağılık halde yeşil floresan ışımalar da LC3/2 ekspresyonu işaret etti. LC3/2'ün immünreaktivite yoğunluğuna bakıldığında IC50 grubu ile hem kontrol grubu arasında hem de D2 grubu arasında farklılık gözlemlendi (p<0.01). Aynı zamanda IC50 grubu ile IC50/2 grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık görüldü (p<0.001) (Şekil 5).



Şekil 4. Kuersetinin uygulanan MCF-7 meme kanseri hücre hattında gruplardaki Beklin-1 ekspresyonları. Beklin-1 ekspresyonu floresan mikroskopta hücrede kırmızı floresan yansımalar şeklinde görülmektedir. DAPI: 4,6-diamidino-2'-phenylindole. Skala bar: 100 µm'dir (İmmüno-floresan boyama).



Şekil 5. Kuersetin uygulanan MCF-7 meme kanseri hücre hattında gruplardaki LC3/2 ekspresyonları. LC3/2 ekspresyonu floresan mikroskopta hücre sitoplazmasında dağınık halde yeşil floresan yansımalar şeklinde görülmektedir. DAPI: 4,6-diamidino-2'-phenylindole. Skala bar: 100 µm'dir (İmmunofloresan boyama).

TARTIŞMA

Kadınlarda genetik, hormonal ve çevresel faktörlere bağlı olarak gelişen meme kanserinin önlenmesinde flavonollerin rol oynayabileceği bildirilmektedir.²¹ Çeşitli doğal maddeler arasında flavonlar, flavonoller ve flavanonlar gibi flavonoidler, kanser tedavisinde kullanılan en umut verici gruplardan biridir.²² Flavonoidler ile uzun yıllar çalışılmış olmasına rağmen, biyolojik aktivitelerinde ki hücrel mekanizmaları hala netliğe kavuşmamıştır.

Meme kanseri hücreleri, içerdikleri hormon reseptörleri aracılığı ile östrojene duyarlı olabilir. Serbest radikal süpürücüsü özelliğine sahip olan kuersetin, DNA hasarlarını önleyerek östrojen agonisti/antagonisti olarak hareket eder. Yapılan çalışmalara göre besinlerde bulunan östrojenik flavonoidlerden olan kuersetin, meme kanserinin doza bağlı olarak ilerlemesine neden olabilir.²³ Kuersetinin, farklı orjinde kanser hücre dizilerinde büyüme ve proliferasyonu baskıladığı, hücre siklusunu G1 veya G2 fazında durdurduğu, anti-anjiyojenik, anti-proliferatif, anti-inflamatuar, metastazı baskılayıcı ve apoptozisi indükleyici işlevleri olduğu gösterilmiştir.⁹

Kuersetin potansiyel bir antikanser ajan olarak umut vaatmektedir. İn vitro çalışmalar ile flavonoidlerin, kinaz aktivitesiyle apoptoz indüksiyonu ve proliferasyon inhibisyonu gibi çeşitli anti-kanser etkileri açıklanmaya çalışılmıştır.²⁴ Kaspaz kaskadının doğrudan aktivasyonu ve

mitokondriyal yol aracılığıyla apoptozun uyarılmış indüksiyonu, nazofarengeal karsinom CNE2 ve HK1 hücreleri, timustan türetilmiş HPBALL ve oral skuamöz karsinom SCC-9 hücreleri dahil olmak üzere farklı orjinde insan hücre dizilerinde bildirilmiştir.²⁵⁻²⁸

Apoptoz, fitokimyasallar tarafından hedeflenip premalign veya malign hücreleri yok etmek için önemli bir yolaktır. Kemoterapinin asıl hedeflerinden bir tanesi, kanserli hücrelerde apoptozu indüklemektir.¹⁰ Kuersetin ayrıca p38MAPK yolu ile Twist'in baskılanması aracılığıyla meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükler.²⁹ Samarn Dechsupa ve ark. Kuersetinin sadece anti-proliferasyon özelliğine sahip olmadığını, aynı zamanda ksenografıtlı meme kanserinde bir apoptoz indükleyici olduğunu göstermişlerdir.³⁰ Kuersetinin kanser hücrelerinde apoptozu indüklemesinden dolayı bu molekül onkoloji alanında ayrı bir öneme sahip olmuştur. Kuersetinin kanser hücreleri üzerindeki pro-apoptotik etkisinin yanı sıra, tümörijenik olmayan hücrelerdeki apoptotik aktivitesi de rapor edilmiştir.³¹

Meme kanserlerinin çoğunun östrojen reseptörü pozitif ve östrojen, östrojen reseptörüne bağlanarak kanser hücreleri büyümesinde, hayatta kalmasında ve gen ekspresyonunu düzenleyici mekanizmasında önemli bir rol oynar. Chou ve arkadaşları, MCF-7 hücre hattında kuersetinin 10, 50, 100, 150 ve 175 µM farklı dozları uygulandıktan 24. ve 48. saatlerdeki etkisi değerlendirildiğinde, hücreleri doza ve zamana bağlı olarak inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Hücre

siklusu analizi ile G0/G1 fazında hücre sayısının anlamlı şekilde azaldığı ve apoptotik hücre ölümünün indüksiyonu yoluyla canlı MCF-7 hücrelerinin yüzdesini azalttığı görülmüştür.³² Bir başka çalışmada ise, MCF-7 meme kanseri hücreleri 24 saat kuersetin (25-100 µM) ile muamele edildikten sonra yapılan Hoechst 33342 boyaması sonucunda indüklenmiş kromatin yoğunlaşması ile apoptotik hücre ölümü gözlenmiştir.³³

MDA-MD-453 meme kanseri hücre hattında 24 saat uygulanan 100 µM Kuersetinin, G1 fazında bulunan hücrelerin fraksiyonunda bir azalma ile ilişkili G2/M fazındaki hücre fraksiyonunda bir artışa neden olduğu bildirilmiştir.³⁴ Bir başka hücre hattında yapılan çalışmada, kuersetin (24 saatlik inkübasyon için 5-40 µM) konsantrasyonuna bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı ve akut miyeloblastik lösemi HL60 hücrelerinde çok düşük apoptotik etkiye neden olduğu görülmüştür.³⁵ Çalışmamızda ise, MCF-7 hücre hattına 24 saatlik 15 µM'lık kuersetin uygulanması sonrasında en yüksek TUNEL immünreaktivitesi IC50 dozunda görülmektedir.

Otofaji, apoptoz ve hücre döngüsüne ek olarak, hücrelerin proliferatif aktivitelerini düzenleyebilen bir süreçtir.³⁶ Otofaji sırasında, otofagozom oluşumuyla ilişkili bir dizi otofaji geni aktive edilir.³⁷ Beklin-1, otofaji mekanizmasında sitoplazmada görev alan ve otofagozom için gerekli bir proteindir. Vezikül oluşumunda hücredeki diğer proteinlerle etkileşerek süreç başlatılmış olur.³⁸ Otofaji sürecinde LC3/2 proteini sitoplazmada yer alan otofagozomların membranına bağlı olarak bulunan bir protein olup aynı zamanda geç dönem otofaji belirteci olarak da bilinir.³⁹ Otofajinin indüklenmesi ile LC3/2 hücrede sitoplazmada yaygın granüler dağılım şekli olup otofagozomların yansımalarının bir belirteçidir.

Kuersetinin otofajiyi uyardığı ve yüksek glikoz kaynaklı hasara karşı insan umbilikal ven endotel hücrelerini (HUV-EC'ler) koruduğu görülmüştür. LC3/2 ve Beklin-1 ekspresyonu, kuersetin ile tedavi edilen hücrelerde artarken, p62 protein seviyesi, tek başına yüksek glikoza kıyasla yüksek glikoz koşulu altında önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir.⁴⁰

Kuersetin tedavisinden sonra doza ve zamana bağlı bir şekilde önemli ölçüde yukarı-regüle edilmiş LC3/2 ekspresyonu ve aşağı regüle edilmiş P62 ekspresyonu gözlemlendi. Ayrıca, hücreleri kuersetin (80 µmol/L) ile muamele edilip 0, 6, 12 ve 24. saat sonra yapılan analiz sonuçları, kuersetin tedavisi ile LC3'ün yukarı regülasyonu gösterilmiştir. Birlikte ele alındığında kuersetinin, HCC hücrelerinde otofajiyi indüklediği görülmüştür.⁴¹ Çalışmamızda ise, immüno floresan boyama ile Beklin-1 ve LC3/2'nin en yüksek immünreaktivitesi IC 50'de görülmektedir.

Kuersetinin, CAOV3 insan yumurtalık kanseri hücrelerinde p-STAT3/Bcl-2 ekseni yoluyla endoplazmik retikulum stresini indükleyerek, aynı zamanda mitokondriyal aracılı apoptoz ve koruyucu otofajiyi teşvik ettiği gösterilmiştir.¹⁸ Kuersetinin etkilerine yönelik yapılan çalışmaların çoğu in-vitro olmasına rağmen, yapılan in-vivo çalışmalarda da kuersetinin biyoyararlanımının öne çıktığı düşünülmektedir. In vivo bir çalışmada ise, MCF-7 ve CT-26 tümörleri taşıyan fareler, kontrol grubuna kıyasla kuersetin (50, 100 ve 200 mg/kg) ile tedavi edilen grupta tümör hacminde önemli bir azalma sergilediği görülmüştür. TUNEL metoduna göre, kontrol gruplarına göre tedavi edilenlerde apoptotik hücre yüzdesinde bir artış gözlenmiş olmasına rağmen, istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı bildirilmiştir.¹⁶ Çalışmamız da kuersetinin, doza ve zaman bağımlı olarak MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Literatür ile uyumlu olarak kuersetinin apoptoz ve otofaji ile tümör ilerlemesini inhibe ettiği görülmüştür.

Kanser hücreleri mevcut kemoterapötik maddelere karşı direnç ve azalmış duyarlılık gösterebildiği için doğal ilaçlara artan bir ihtiyaç vardır. Kuersetinin diğer pek çok aktivitesinin yanında apoptotik ve otofajik olarak biyolojik aktivite göstermesi nedeni ile kanser önleyici doğal bir ajan olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Bu yaklaşımları daha iyi açıklayabilmek için gelecekte yapılacak diğer tedaviye yönelik çalışmalara öncülük edebileceğine inanılmaktadır.

Çıkar Beyannamesi

Herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını yazarlar beyan etmektedirler.

Etik Kurul İzni

Bu çalışma, hücre kültürü ile ilgili olduğundan etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Ana fikir/Planlama: MB. Veri toplama/İşleme: MB, GÖÖ, ÖG. Veri analizi ve yorumlama: MB, AY, ZBG. Literatür taraması: MB, ÖG Yazım: MB, AY, GÖÖ. Gözden geçirme ve düzeltme: MB, GÖÖ, ÖG, AY, ZBG. Danışmanlık: MB, AY, ZBG.

KAYNAKÇA

- Akkuzu MZ, Küçüköner M, Irtegun S, ve ark. Meme kanserinde Brca-1 ve Brca-2'de sık görülen polimorfizm mutasyonlarının bölgemizde varlığı. *Dicle Med J.* 2019;46(4):623-631.
- Kampa M, Nifli AP, Notas G, Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2007;159:79-113.
- Sonnenblick A, Fumagalli D, Sotiriou C, Piccart M. Is the differentiation into molecular subtypes of breast cancer important for staging, local and systemic therapy, and follow up? *Cancer Treat Rev.* 2014;40:1089-1095.
- Eliyatkın N, Yalcın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular classification of breast carcinoma: from traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. *J Breast Heal.* 2015;11:59-66.
- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):768-780.
- Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ. Dietary polyphenolic phytochemicals—promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *Int J Cancer.* 2007;120(3):451-458.
- Birman, H. Bitkisel flavonoid bileşiklerinin biyoaktiviteleri ve muhtemel etki mekanizmaları. *İst Tıp Fak Derg.* 2012;75(3):46-49.
- Cárdenas M, Marder M, Blank VC, Roguin LP. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorg Med Chem.* 2006;14(9):2966-2971.
- Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Biolito S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(1):6-15.
- Chien SY, Wu YC, Chung JG. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum Exp Toxicol.* 2009;28(8):493-503.
- Lamson DW, Brignall MS. Antioxidants and cancer III: Quercetin. *Altern Med Rev.* 2000;5(3):196-208.
- Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Res.* 2015;35(6):3147-3154.
- Sweeney EE, McDaniel RE, Maximov PY, Fan P, Craig Jordan V. Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: Significant clinical progress despite limitations. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2012;9(2):143-163.
- Granato M, Rizzello C, Gilardini Montani MS, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways. *J Nutr. Biochem.* 2017;41:124-136.
- Jia L, Huang S, Yin X, Zan Y, Guo Y, Han L. Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt-mTOR pathway mediated autophagy induction. *Life Sci.* 2018;208:123-130.
- Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari A, et al. Anti-cancer and apoptosis inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2017;38(2):819-828.
- Kim H, Moon JY, Ahn KS, Cho SK. Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:596496.
- Liu Y, Gong W, Yang ZY, et al. Quercetin induces protective autophagy and apoptosis through ER stress via the p-STAT3/Bcl-2 axis in ovarian cancer. *Apoptosis.* 2017;22(4):544-557.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
- Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari, A, et al. Anti-cancer and apoptosis inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology reports.* 2017;38(2):819-828.
- Corre LL, Chalabi N, Delort L, Bignon Y, Bernard-Gallon DJ. Differential expression of genes induced by resveratrol in human breast cancer cell lines. *Nutr Cancer.* 2006;56(2):193-203.
- Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, et al. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo.* 2005;19(5):895-909.
- Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, et al. Estrogen receptor α mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2001;60(3):595-602.
- Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, Sesso HD. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009;89(3):905-912.
- Lautraite S, Musonda AC, Doehmer J, EdwardsGO, Chipman JK. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis.* 2002;17(1):45-53.
- Haghiac M, Walle T. Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutr Cancer.* 2005;53(2):220-231.
- Mozhgan FS, Seyed BJ, Bahareh H. The *Cuscuta kotschyana* effects on breast cancer cells line MCF7. *J Med Plants Res.* 2011;5(27):6344-6351.
- Russo M, Spagnuolo C, Bilotto S, Tedesco I, Maiani G, Russo GL. Inhibition of protein kinase CK2 by quercetin enhances CD95-mediated apoptosis in a human thymus-derived T cell line. *Food Res Int.* 2014;63(Part B):244-51.
- Ranganathan S, Halagowder D, Sivasithambaram ND. Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One.* 2015;10:e0141370.
- Dechsupha S, Kothan S, Vergote J, et al. Quercetin, Siamois 1 and Siamois 2 induce apoptosis in human breast cancer MDA-MB-435 cells xenograft in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(1):56-61.
- Ishikawa Y, Kitamura M. Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK-and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int.* 2000;58(3):1078-1087.
- Chou CC, Yang JS, Lu HF, et al. Quercetin mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Arch Pharm Res.* 2010;33(8):1181-1191.

33. Lee YK, Park S Y, Kim YM, Lee WS, Park OJ. Regulation of MCF-7 cell apoptosis by phytochemical Quercetin through AMPK-mTOR signaling pathway. *Cancer Prev. Res.* 2010;15(4):320-325.
34. Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch Pharm Res.* 2008;31(10):1281-1285.
35. De Blas E, Estan MC, de Frutos, MDCG, Ramos J, del Carmen Boyano-Adanez M, Aller P. Selected polyphenols potentiate the apoptotic efficacy of glycolytic inhibitors in human acute myeloid leukemia cell lines. Regulation by protein kinase activities. *Cancer Cell Int.* 2016;16(1):1-16.
36. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 2014;24(1):9-23.
37. Nencioni A, Cea M, Montecucco F, et al. Autophagy in blood cancers: biological role and therapeutic implications. *Haematologica.* 2013;98(9):1335-1343.
38. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007;9(10):1102-1129.
39. Martinet W, De Meyer GR, Andries L, Herman AG, Kockx MM. Detection of autophagy in tissue by standard immunohistochemistry possibilities and limitations. *Autophagy.* 2006;2(1):55-57.
40. Rezabakhsh A, Rahbarghazi R, Malekinejad H, Fathi F, Montaseri A, Garjani A. Quercetin alleviates high glucose-induced damage on human umbilical vein endothelial cells by promoting autophagy. *Phytomedicine.* 2019;56:183-193.
41. Wu L, Li J, Liu T, et al. Quercetin shows anti-tumor effect in hepatocellular carcinoma LM3 cells by abrogating JAK2/STAT3 signaling pathway. *Cancer Med.* 2019;8(10):4806-4820.