



## KUERSETİN, KURKUMİN VE KOMBİNASYONLARININ MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

*THE INVESTIGATION OF ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF QUERCETIN, CURCUMIN AND THEIR COMBINATIONS ON BREAST CANCER CELL LINES*

Ergül MUTLU ALTUNDAĞ<sup>1,\*</sup>, Eda BECER<sup>2,3</sup>, Duygu GENÇALP<sup>1</sup>, H. Seda VATANSEVER<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Doğu Akdeniz Üniversitesi, Dr. Fazıl Küçük Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Mağusa, Kuzey Kıbrıs, 99628, Mersin 10, Türkiye

<sup>2</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs, Mersin 10, Türkiye

<sup>3</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, DESAM Enstitüsü, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs, Mersin 10, Türkiye

<sup>4</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji, Manisa, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Meme kanseri, kadınlarda malignite ve mortalite oranı yüksek olan ve Doğu Akdeniz bölgesinde sıklıkla görülen bir kanser türüdür. Kuersetin ve kurkumin, kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etme özelliği olduğu bilinen flavonoid türleridir. Bu çalışmanın amacı, antikanser özelliğe sahip olduğu bilinen kuersetin ve kurkumin flavonoidlerinin tek başına ve kombine kullanımının metastatik ve metastatik olmayan meme kanser hücre hatlarındaki antiproliferatif etkisinin belirlenmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, kuersetin, kurkumin ve kombinasyonları M4A4 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerine uygulandı. Hem M4A4 hem de MCF-7 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanıldı. Combosyn programı kullanılarak %50'sini inhibe eden (IC50) ve kombinasyon indeks (CI) değerleri belirlendi.

**Sonuç ve Tartışma:** M4A4 hücre popülasyonunun IC50 etkin kuersetin dozu 72 saat sonucunda 49 µM olarak, MCF-7 hücre popülasyonu için ise 72 saat sonunda 120 µM olarak hesaplandı. M4A4 ve MCF-7 hücrelerine uygulanan kurkumin polifenolü için IC50 dozları sırasıyla 27 µM ve 54 µM olarak belirlendi. MCF-7 hücrelerine uygulanan kuersetin: kurkumin kombinasyonlarının sinerjistik etki gösterdiği, M4A4 hücreleri için ise antagonistik etki gösterdiği belirlendi. Hücrelere farklı doz ve zamanlarda kuersetin ve kurkumin uygulanmasının sonucunda, her iki polifenolün ayrı ayrı hücre canlılığını inhibe ettiği bulundu. Elde edilen bulgular, kuersetin ve kurkumin polifenoliyle birlikte kombinasyonun metastatik olmayan meme kanserinde kullanılabileceğini gösterirken, metastatik meme kanseri için farklı kombinasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ergül Mutlu Altundağ  
e-posta / e-mail: ergulmutlu81@gmail.com

**Anahtar Kelimeler:** Antiproliferatif etki, kuersetin, kurkumin, meme kanseri

## ABSTRACT

**Objective:** Breast cancer is a type of cancer that has high malignancy and mortality rates in women and is frequently seen in the Eastern Mediterranean region. Flavonoids such as quercetin and curcumin are known to have an ability to inhibit the growth of cancer cells. The aim of this study was to determine the antiproliferative effect of quercetin and curcumin which are flavonoids known to have anticancer properties on human metastatic and non metastatic breast cancer cell lines of alone and in combination usage.

**Material and Method:** Cell growth and cytotoxicity of quercetin, curcumin and quercetin:curcumin combinations were measured with MTT assay both on M4A4 and MCF-7 breast cancer cell lines. Combosyn program was used to determine IC50 and combination index (CI) values.

**Result and Discussion:** Half-maximal inhibitory concentrations (IC50) of quercetin for 72 hours were 49  $\mu$ M and 120  $\mu$ M on M4A4 and MCF-7 cells, respectively. IC50 doses for curcumin on M4A4 and MCF-7 cells were determined as 27  $\mu$ M and 54  $\mu$ M, respectively. It was determined that quercetin:curcumin combinations applied were shown a synergistic and antagonistic effect on MCF-7 and M4A4 cells. It was found that both quercetin and curcumin treatment inhibit cell viability in a dose and time-dependent manner. Findings show that combination with quercetin and curcumin polyphenol can be used in non-metastatic breast cancer, while different combination studies are needed for metastatic breast cancer.

**Keywords:** Antiproliferative effect, quercetin, curcumin, breast cancer

## GİRİŞ

Küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelen meme kanseri, kadınlarda yüksek malignite ve mortaliteye sahip önemli bir kanser türüdür [1]. Kadınlarda ortaya çıkan her dört kanser türünden birinin meme kanseri olduğu, bunun yanında daha az sıklıkta erkek bireylerde de görüldüğü bildirilmiştir [2]. Meme kanserinde hormon durumu sadece önemli prognostik bilgileri için değil, aynı zamanda neoadjuvan ve adjuvan tedavi kararları için de önem taşımaktadır [3]. Meme kanserinde östrojen reseptör (ER) durumu tümör derecesi ve histolojisi ile yakından ilişkilidir. Vakalarının %70'inin östrojen reseptör pozitif (ER+) olduğu rapor edilmiştir [4, 5]. Tamamlanan klinik çalışmalar, genç kadınlarda meme kanserinin, yaşlı kadın popülasyonuna kıyasla daha yüksek histolojik dereceye, olumsuz hormonal duruma ve genel olarak daha yüksek ölüm oranına sahip olduğunu doğrulamıştır [6]. Bu bağlamda meme kanserini tedavi etmeye yönelik olarak cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri kullanılmakla beraber günümüzde mortalite oranı halen yüksek oranlarda seyretmektedir. Bu süreçte, iyileşme potansiyeli yüksek olan meme kanserini tedavi etmeye yönelik yeni terapi ve tedavi seçeneklerinin oluşturulması için çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla, kanser hücrelerinin büyümesini etkileyebildikleri tespit edilen polifenoller yoğun ilgi görmekte ve önemli fitokimyasal grup olarak karşımıza çıkmaktadır [7]. Flavonoidler, birçok bitkide bulunan düşük moleküler ağırlığa sahip olan polifenolik bileşiklerdir [8]. Flavonoidler; soğan, elma, çay, şarap ve zeytinyağı gibi birçok meyve ve sebzede büyük ölçüde bulunmaktadır [9, 10]. Kuersetin, diyetle alınabilen ve kanser tedavisinde kullanılan ilgi çekici bir polifenoldür. Biyolojik ve farmakolojik çalışmalar kuersetinin antioksidan, antienflamatuvar, antiproliferatif ve antikanser etkileri olduğunu göstermiştir [11, 12]. Sarı renkli bir polifenol olan kurkumin ise anti-tümör, antioksidan ve antienflamatuvar aktiviteler gibi biyofonksiyonel

özellikleri nedeniyle son yıllarda büyük ilgi gören diğer bir polifenoldür [13]. Kurkuminin kanser tedavisinde birçok hücre yolak üzerine etkisi olduğu rapor edilmiştir [14]. Kurkuminin antikanser aktivitesinin sergilediği ana etki mekanizmaları arasında apoptozu indüklemeye ve çeşitli hücre sinyal yollarını etkileyerek tümör proliferasyonunu önleme etkisi yer almaktadır [15]. MCF-7 klinik öncesi laboratuvar deneylerinde sıklıkla kullanılan bir meme kanseri hücre hattıdır [16]. MCF-7 hücreleri, östrojen reseptörü (ER) pozitif meme kanseri hücre deneyleri ve birçok alt klonun farklı ER sınıflarını temsil ettiği araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakta ve değişen nükleer reseptör ekspresyon seviyeleri ile farklı (ER+) tümör sınıflarını temsil etmektedir [17]. M4A4 (insan meme duktal karsinomu) meme kanseri hücre hattı ise MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattından türetilmiş olan östrojen negatif (ER-), yüksek metastatik özelliğe sahip bir hücre hattıdır [18, 19]. Daha önce farklı hücre hatları üzerinde sinerjistik etkinliği tanımlanmış olan kuersetin ve kurkumin kombinasyonunun M4A4 hücreleri üzerine olan etkisi henüz bilinmemektedir [20]. Bu çalışma kapsamında polifenol olarak bilinen kuersetin ve kurkuminin ayrı ayrı ve kombine dozlarının MCF-7 ve M4A4 meme kanseri hücre hatları üzerindeki antikanser aktiviteleri belirlenmiş ve karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Hücre Kültürü:** M4A4 [ER(-)] (CRL-2914) ve MCF-7 [pozitif, ER(+)] (HTB-22) hücreleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edildi. M4A4 ve MCF-7 hücreleri 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda, %10 Fetal sıgır serumu (Capricorn Scientific, FBS-11B), %1 Penisilin/Streptomisin (Biochrom, A2213) ve %1 L-glutamin (EMD Millipore, K0282) içeren RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Biochrom, Germany) kültür vasatı kullanılarak, 37°C, %5 kısmi CO<sub>2</sub> basıncı ve nemli ortam içeren inkübatörler içerisinde yetiştirildi. Hücreler hem makroskopik hem de mikroskopik olarak düzenli aralıklarla kontrol edildi.

**Sitotoksiste Deneyi:** Hücrelerin yaşaması ve proliferasyonu MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Glentham Life Sciences, GC4568) testi ile kantitatif ve kolorimetrik olarak belirlendi. MTT testinin yapılması için MCF-7 ve M4A4 hücreleri 96 kuyucuklu plaklar içerisine 24 saat önceden 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 100 µL besi ortamı içerisinde ekildi. Kuersetin için 5, 10, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlar, kurkumin için ise 1, 5, 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonlar 96 kuyucuklu plaklar içerisinde yer alan hücrelere uygulanarak 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C, %5 kısmi CO<sub>2</sub> basıncı ve nemli ortam içeren inkübatörler içerisinde inkübe edildi. Ardından her bir kuyucuğa 10 µL MTT solüsyonu ilave edildi. Plaklar MTT solüsyonu ilavesini takiben 3 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besi ortamı uzaklaştırılarak kuyucuklara 100 µL DMSO ilave edildi ve 20 dk. daha inkübasyona bırakıldı. Ardından mikropalak okuyucu spektrofotometre ile (Varioskan Flash Multimode Microplate Reader, Skanlt Software 2.4.5, Thermo Scientific) 540 nm

dalga boyunda ölçüm yapıldı. Kuersetin ve kurkumin için her bir konsantrasyon 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen veriler aşağıda belirtilen formül kullanılarak her bir grup için hücre canlılığının %50 inhibe olduğu dozlar (IC50) kuersetin ve kurkumin uygulanmış olan hücrelerde ayrı ayrı belirlendi.

$$\% \text{ Hücre canlılık oranı} = (\text{Atest} - \text{Ablank} / \text{Akontrol} - \text{Ablank}) \times 100$$

**CompuSyn Kombinasyon Analizi:** Kombinasyon analizi için uygun dozların belirlenmesinde kuersetin ve kurkumin polifenollerinin tekil olarak uygulandığı hücre sitotoksitesite testi sonuçları baz alındı. CompuSyn bilgisayar yazılımı kullanılarak her iki polifenolün IC50 değerlerinin birbirine oranına göre etkin doz ve süresi belirlendi. Belirlenen doz ve sürede tekrar MTT deneyi yapıldı. Buradan elde edilen absorbans değerlerinden kombinasyon indeks değerleri CompuSyn bilgisayar programı ile belirlendi. Sinerjik etkinin belirlenmesinde CompuSyn programı ile çizilen Fraksiyonel etki (Fa) ve kombinasyon indeksi (CI) grafiği (Fa-CI) ile y ekseninde bulunan 1 değerinin altında kalan değerler sinerjistik etki, 0.5 değerinin altında kalanlar ise güçlü sinerjistik etki gösteren değerler olarak belirlendi [21].

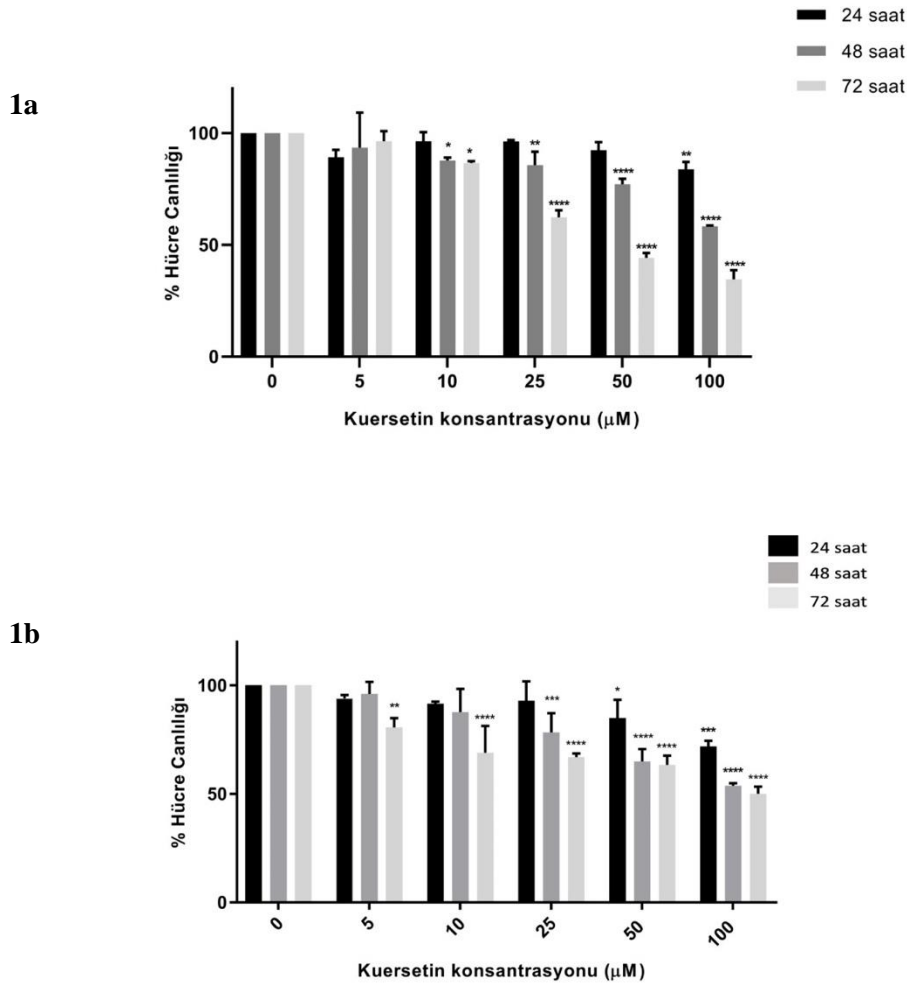
**İstatistiksel Analiz:** Deneysel sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizinin gerçekleştirilmesinde Graphpad Prism V-8 bilgisayar yazılımı kullanıldı. Kuersetin ve kurkumin uygulanmış hücre grupları ile kontrol grupları arasında hücre canlılığının inhibisyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı 2-way ANOVA, Tukey's test ile belirlendi. Anlamlılık değerleri;  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$  olarak değerlendirildi.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Kuersetin ve kurkumin polifenollerinin metastatik (M4A4) ve metastatik olmayan (MCF-7) meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri MTT testi ile belirlendi. M4A4 ve MCF-7 hücrelerine kuersetin uygulaması 5, 10, 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında, kurkumin uygulaması ise 1, 5, 10, 25 ve 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında olacak şekilde 5 farklı dozda 24, 48 ve 72 saat aralıklarında yapıldı. MTT uygulamasından sonra spektrofotometrik olarak elde edilen absorbans verileri istatistiksel olarak değerlendirildi. Buna göre M4A4 hücrelerinin kuersetin uygulamasından 24 saat sonra sadece 100  $\mu\text{M}$  doz uygulanan hücre grubunda %83.89 oranında anlamlı bir canlılık gözlemlenirken, 48 ve 72 saat sonra 10, 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda doza ve zamana bağımlı bir şekilde hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe olduğu gözlemlendi. 10, 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında kuersetin uygulanmasıyla, M4A4 hücrelerinde 48 saat sonra sırasıyla %87.71, %85.72, %77.11, %58.33 canlılık gözlemlenirken, 72 saat sonucunda ise sırasıyla %86.63, %62.31, %44.33 ve %35.35 oranında canlılık gözlemlendi (Şekil 1a). Buna göre hücre

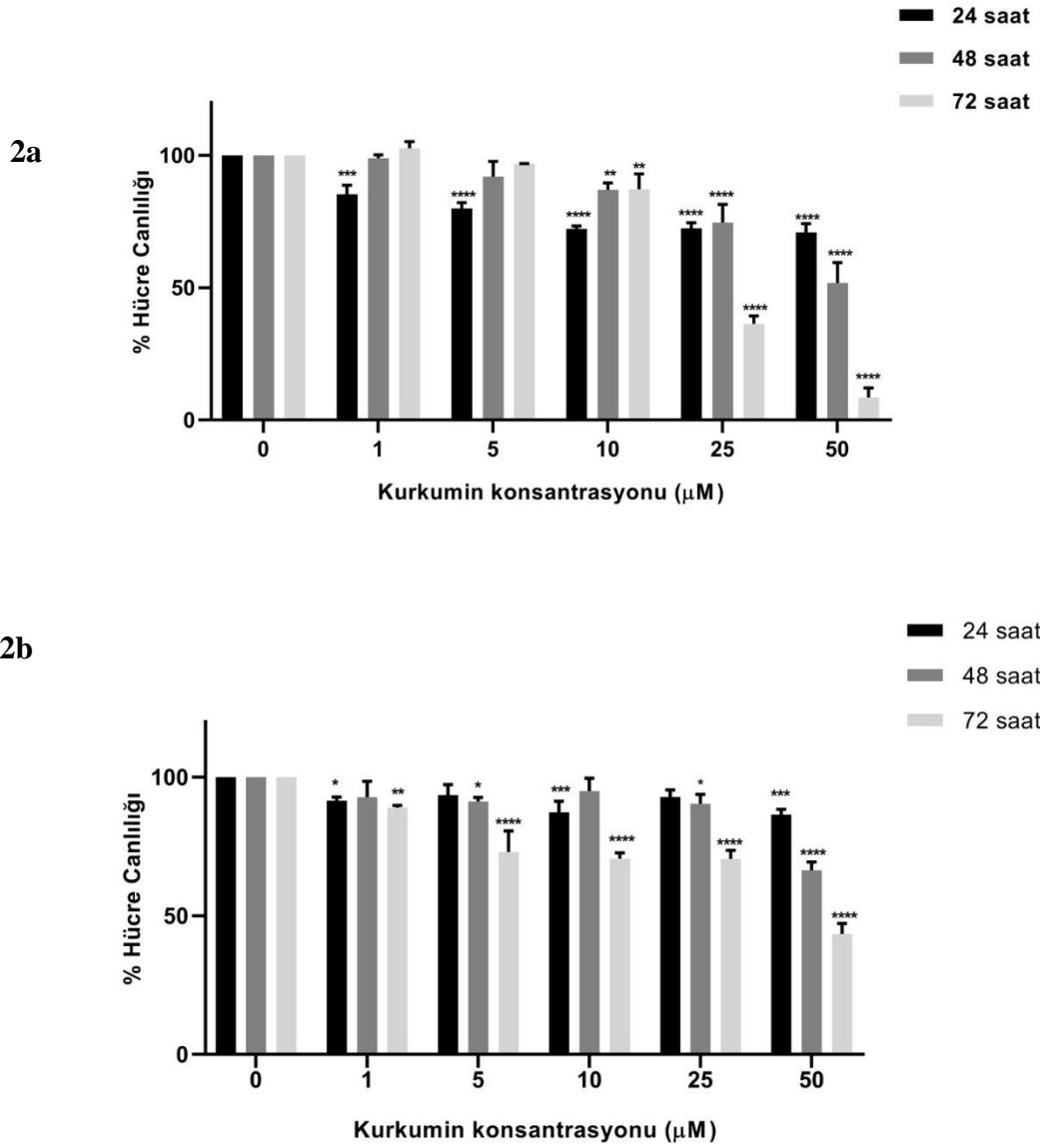
popülasyonunun %50'sini inhibe eden etkin doz M4A4 hücreleri için 72 saat sonucunda 49 µM olarak hesaplandı. MCF-7 hücrelerine ise kuersetin uygulanmasından 24 saat sonra 50 ve 100 µM doz uygulanan grupta sırasıyla %84.97 ve %71.95 oranında hücre canlılığı üzerine anlamlı bir inhibitor etkisi tespit edildi. Kuersetinin 48 saat sonra 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda elde edilen verilere göre hücre canlılığını sırasıyla %78.33, %64.94 ve %53.5 inhibe ettiği görüldü. Bunun yanında 72 saat sonra elde edilen veriler incelendiğinde uygulama yapılan 5, 10, 25, 50, 100 µM'daki konsantrasyonlar için sırasıyla %80.66, %68.92, %66.91, %63.39, %53.75 oranında hücre canlılığını anlamlı bir şekilde doz bağımlı olarak inhibe ettiği bulundu (Şekil 1b). MCF-7 hücre hattında hücre popülasyonunun %50'sini inhibe eden kuersetin konsantrasyonu 72 saat sonunda 120 µM olarak hesaplandı.

M4A4 hücrelerine 1, 5, 10, 25 ve 50 µM kurkumin uygulaması ile 24, 48 ve 72 saat sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 24 saat sonucunda sırasıyla %85.35, %79.97, %72.21, %72.41 ve %70.93 oranında anlamlı bir canlılık gözlemlendi. Kurkuminin 10, 25 ve 50 µM dozları için 48 ve 72. saat sonuçları incelendiğinde hücre canlılığı 48. saatte sırasıyla %87.06, %74.62, %51.88 ve 72. saatte sırasıyla %87.25, %36.35 ve %8.59 olarak bulundu (Şekil 2a). MCF-7 hücrelerine 5, 10 ve 50 µM dozlarında kurkumin uygulamasından 24 saat sonra, sırasıyla %93.56 %87.31 ve %86.56 oranlarında anlamlı bir canlılık olduğu görüldü. Bunun yanı sıra, 48 saat sonra elde edilen veriler 5, 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda kurkumin uygulanan hücrelerde sırasıyla %91.22, %95.05, %66.41 canlılık olduğunu gösterdi. 72 saat sonra elde edilen veriler incelendiğinde ise, 1, 5, 10, 25 ve 50 µM kurkumin uygulanan MCF-7 hücrelerinde sırasıyla %89.09, %73.04, %70.68, %70.54 ve %43.47 olarak hücre canlılığı tespit edildi. M4A4 ve MCF-7 hücrelerine uygulanan kurkumin polifenolü için IC50 dozları sırasıyla 27 µM ve 54 µM olarak belirlendi.



**Şekil 1.** Kuersetin polifenolünün M4A4 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi. M4A4 meme kanseri hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kuersetin ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği. (Şekil 1a). MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kuersetin ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği (Şekil 1b). Deneyle 3 tekrarlı olarak yapıldı ve anlamlılık değerleri  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.0001$  \*\*\*\* olarak değerlendirildi.

M4A4 ve MCF-7 hücre gruplarına ayrı ayrı kuersetin ve kurkumin uygulamalarını takiben her iki polifenolün bir arada kullanıldığı kombinasyon uygulamaları gerçekleştirildi. Kombinasyon dozlarının hazırlanmasında her iki polifenolün IC50 değerlerinin birbirine oranına göre etkin doz ve süre belirlendi. M4A4 hücre grubu için kuersetin:kurkumin konsantrasyon oranı 1.8:1, MCF-7 hücre grubu için ise 2.2:1 olarak belirlendi.



**Şekil 2.** Kurkumin polifenolünün M4A4 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi. M4A4 meme kanseri hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kurkumin ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği (Şekil 2a). MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kurkumin ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği (Şekil 2b). Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı ve anlamlılık değerleri  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.0001$  \*\*\*\* olarak değerlendirildi.

Buna göre M4A4 hücreleri Tablo 1a'da, MCF-7 hücreleri ise Tablo 1b'de gösterilen kombinasyon dozları ile 72 saat boyunca muamele edildi ve ardından hücre canlılığını belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı.

**Tablo 1a.** M4A4 meme kanseri hücrelerine uygulanan kuersetin:kurkumin kombinasyonlarının konsantrasyonlarını göstermektedir.

Gruplar	Kuersetin Konsantrasyonu	Kurkumin Konsantrasyonu
Konsantrasyon 1 (K-1)	5 µM	2.7 µM
Konsantrasyon 2 (K-2)	10 µM	5.5 µM
Konsantrasyon 3 (K-3)	25 µM	13.8 µM
Konsantrasyon 4 (K-4)	50 µM	27.7 µM
Konsantrasyon 5 (K-5)	100 µM	55.5 µM

**Tablo 1b.** MCF-7 meme kanseri hücrelerine uygulanan kuersetin:kurkumin kombinasyonlarının konsantrasyonlarını göstermektedir.

Gruplar	Kuersetin Konsantrasyonu	Kurkumin Konsantrasyonu
Konsantrasyon 1 (K-1)	5 µM	2.27 µM
Konsantrasyon 2 (K-2)	10 µM	4.54 µM
Konsantrasyon 3 (K-3)	25 µM	11.3 µM
Konsantrasyon 4 (K-4)	50 µM	22.7 µM
Konsantrasyon 5 (K-5)	100 µM	45.45 µM

M4A4 ve MCF-7 hücre hatları için her iki polifenolün kombine kullanımı sonucunda elde edilen kombinasyon indeksi ve fraksiyonel etki değerleri belirlendi (Tablo 2a ve Tablo 2b).

**Tablo 2a.** M4A4 meme kanseri hücre hattına uygulanan farklı kombinasyon grupları için elde edilen kombinasyon indeksi ve fraksiyonel etki değerleri.

Gruplar	Kombinasyon İndeksi (CI)	Fraksiyonel Etki (Fa)
K-1	3.34	0.019
K-2	4.18	0.03
K-3	6.26	0.076
K-4	2.73	0.45
K-5	1.19	0.90

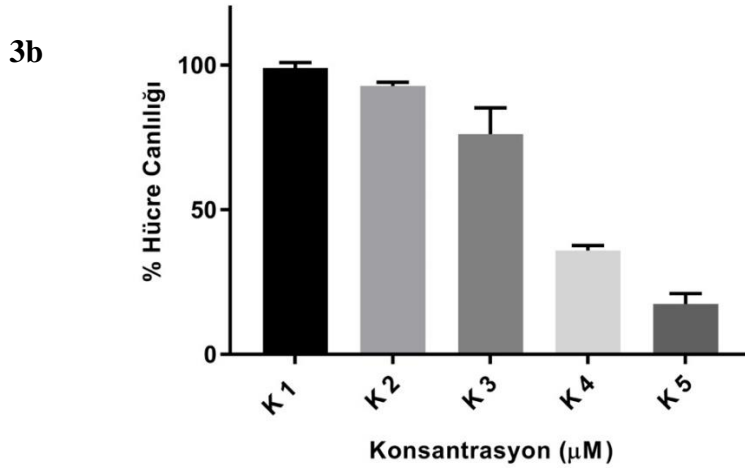
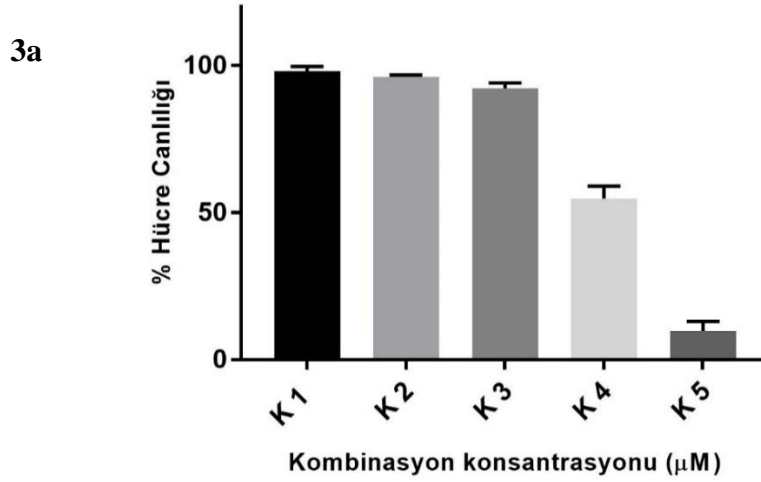
**Tablo 2b.** MCF-7 meme kanseri hücre hattına uygulanan farklı kombinasyon grupları için elde edilen kombinasyon indeksi ve fraksiyonel etki değerleri.

Gruplar	Kombinasyon İndeksi (CI)	Fraksiyonel Etki (Fa)
K-1	3640	0.01
K-2	57.83	0.07
K-3	5.91	0.23
K-4	0.24	0.64
K-5	0.06	0.82

Graphpad Prism V.8 yazılım programı kullanılarak elde edilen absorbans değerlerinden hücre canlılık grafikleri çizildi. Tablo IIa' da belirtilen kombinasyon indeks (CI) değerleri incelendiği zaman M4A4 hücrelerine uygulanmış K1-K5 olmak üzere 5 farklı kombinasyon dozu içerisinde sinerjistik



etkileşim gösteren bir kombinasyon uygulamasının olmadığı görüldü. Bunun yanında uygulanan tüm konsantrasyonların antagonistik etki gösterdiği tespit edildi. Kombinasyon analizinden elde edilen sonuçlara göre M4A4 hücrelerinde antagonizm gözlemlenen K-1, K-2, K-3, K-4 ve K-5 gruplarında kombinasyon uygulamalarının sırasıyla %98.1, %96.28, %92.4, %54.84 ve %9.89 oranında hücre canlılığına neden olduğu belirlendi (Şekil 3a).

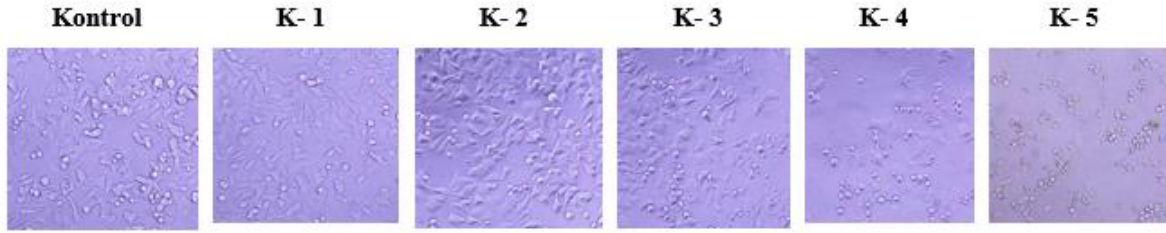


**Şekil 3.** Kombinasyon gruplarının M4A4 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi. M4A4 hücrelerine uygulanan kombinasyon gruplarına ait hücre canlılık grafiği (Şekil 3a). MCF-7 hücrelerine uygulanan kombinasyon gruplarına ait hücre canlılık grafiği (Şekil 3b).

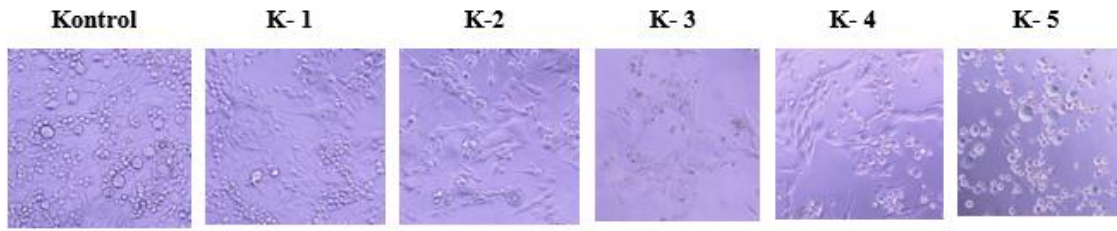
Tablo 2b’de yer alan MCF-7 hücrelerine uygulanmış kombinasyon dozlarına ait kombinasyon indeksi değerleri incelendiği zaman ise K-4 kombinasyonunun ‘sinerjizm’, K-5 kombinasyonunun ise ‘güçlü sinerjizm’ etkisi gösterdiği tespit edildi. Kombinasyon analizinden elde edilen sonuçlara göre K-

1, K-2, K-3, K-4 ve K-5 gruplarında kombinasyonların sırasıyla %99, %92.83, %76.14, %35.91 ve %17.47 oranlarında canlılığa yol açtığı belirlendi (Şekil 3b). 72 saat boyunca kombinasyon grupları ile muamele edilen M4A4 ve MCF-7 hücre gruplarına ait MTT uygulaması sonucu elde edilen mikroskop görüntüleri verildi (Şekil 4a, 4b).

#### 4a



#### 4b



**Şekil 4.** Kombinasyon dozları uygulanan M4A4 (4a) ve MCF-7 (4b) hücrelerinin 72 saat sonucunda MTT ile muamelesi ardından elde edilen mikroskop görüntüleri.

Bu çalışma meme kanseri tedavisinde, yeni tedavi ve terapi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamak amacıyla metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hücre hatlarında *in vitro* şartlar altında yürütülmüştür. Günümüzde büyük ilgi toplayan kuersetin ve kurkumin polifenollerinin antioksidan, antienflamatuvar, antiproliferatif ve antikanser etkileri olduğu daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [11, 12, 13].

Bu çalışmamızda metastatik özelliğe sahip bir meme kanseri hücre hattı olduğu bilinen M4A4 ve metastatik karakterde olmayan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının kuersetin ve kurkumin polifenollerini ile muamelesi sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Aynı ayrı ve kombine dozlar şeklinde yapılan uygulamaların neticesinde her iki hücre hattında da hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Buna göre M4A4 hücre grubunda kuersetin ve kurkumin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki inhibitor etkisi ilk kez belirlenmiş olup literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. M4A4 hücre grubuna uygulanan kuersetinin 72 saat sonunda elde

edilen sonuçlarına bakıldığında, kuersetin ajanının doz bağımlı bir şekilde M4A4 hücrelerinde hücre canlılığını inhibe ettiği bulunmuştur. Aynı şekilde kurkumin uygulaması da M4A4 hücre canlılığını önemli ölçüde inhibe etmiştir. Literatüre göre; M4A4 metastatik meme kanser hattı ile gerçekleştirilmiş herhangi bir sitotoksikite çalışması bulunmamaktadır. Elde edilen sonuçların yeni ve farklı kombinasyon denemeleri yapılması açısından literatüre değerli ve önemli bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir. Bunun yanında benzer çalışmalar kuersetin uygulaması yapılmış olan MCF-7 hücrelerinde 48 saat sonunda hücre canlılığında doza bağımlı bir inhibisyon olduğunu daha önce rapor etmiştir [22, 23]. Benzer sonuçlar bu çalışma sonucunda da elde edilmiştir. Kuersetin maruziyetine bırakılan MCF-7 hücrelerinde, 48 ve 72 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda doza bağımlı bir azalma gözlemlenmiş, 72 saat sonucunda en yüksek doz olan 100 µM konsantrasyonda %50.05 canlılık tespit edilmiştir. Daha önce MCF-7 hücreleri üzerinde kurkumin polifenolünün inhibitör etkisi tanımlanmıştır [24]. Bu çalışma ile de MCF-7 hücreleri üzerinde de doz ve zaman bağımlı bir inhibisyon doğrulanmıştır. Elde edilen veriler 72 saat sonunda 50 µM kurkumin uygulaması yapılmış olan MCF-7 hücrelerinde %43.47 oranında hücre canlılığı olduğunu göstermiştir. Kombinasyon uygulamaları sonucunda elde edilen veriler incelendiği zaman ise K-4 ve K-5 kombinasyonlarının MCF-7 hücrelerinde sinerjistik etkileşim gösterdiği ve sırasıyla %36 ve %17.47 oranlarında hücre canlılığına neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre; polifenollerin kombine kullanımının ayrı halde kullanımına göre daha etkin olduğunu doğrulanmaktadır. Kombine kullanım MCF-7 hücre hattında tedavi edici potansiyele sahipken, M4A4 hücrelerinde durum aynı değildir. M4A4 hücrelerinde kombinasyon uygulamaları sonucunda elde edilen hücre canlılığı verileri metastatik karakterde olan bu hücrelerin kuersetin ve kurkuminin ayrı ayrı daha güçlü ve farklı kombinasyonlarının denenmesi gerektiğini göstermektedir. M4A4 hücreleri için her iki ajanın birlikte kullanıldığı kombinasyon gruplarındaki dozlar bu iki polifenolün bu dozlarında antagonist etki yaratmıştır. Her iki hücre hattı için de elde edilen sonuçların altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılması için ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacaktır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**KAYNAKLAR**

1. Akkuzu, M.Z., Küçüköner, M., Irtegun, S., Akdeniz, N., Uraççı, Z., Kaplan, M.A., Büyükbayram, H., Işıkoğan, A. (2019). Meme Kanserinde Brca-1 ve Brca-2' de Sık Görülen Polimorfizm Mutasyonların Bölgeimizde Varlığı. *Dicle Med J*, 46, 623–631.
2. Elbachiri, M., Fatima, S., Bouchbika, Z., Benchekroun, N., Jouhadi, H., Tawfiq, N., Sahraoui, S., Benider, A. (2017). Breast cancer in men: About 40 cases and literature review. *Pan Afr. Med. J*, 28, 287.
3. Foley, N.M., Coll, J.M., Lowery, A.J., Hynes, S.O., Kerin, M.J., Sheehan, M., Brodie, C., Sweeney, K.J. (2018). Re-Appraisal of Estrogen Receptor Negative/Progesterone Receptor Positive (ER–/PR+) Breast Cancer Phenotype: True Subtype or Technical Artefact? *Pathol. Oncol. Res*, 24, 881–884.
4. Anderson, W.F, Chatterjee, N., Ershler, W.B, Brawley, O.W. (2002). Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res. Treat*, 76, 27–36.
5. Nadji, M., Gomez-Fernandez, C., Ganjei-Azar, P., Morales, A.R. (2005). Immunohistochemistry of Estrogen and Progesterone Receptors Reconsidered. *Am. J. Clin. Pathol*, 123, 21–27.
6. Erić, I., Erić, A.P., Kristek, J., Koprivčić, I., Babić, M. (2018). Breast cancer in young women: Pathologic and immunohistochemical features. *Acta Clin. Croat*, 57, 497–502.
7. Kampa, M., Nifli, A.P., Notas, G., Castanas, E. (2007). Polyphenols and cancer cell growth. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, 159, 79–113.
8. Birman, H. (2012). Bitkisel Flavonoid Bileşiklerinin Biyoaktiviteleri ve Muhtemel Etki Mekanizmaları. *İstanbul Tıp Fakültesi Derg*, 75, 46–49.
9. Slimestad, R., Fossen, T., Vågen, I.M. (2007). Onions: A source of unique dietary flavonoids. *J Agr Food Chem*, 55, 10067–10080.
10. Spagnuolo, C., Russo, M., Bilotto, S., Tedesco, I., Laratta, B., Russo, G.L. (2012). Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1259, 95–103.
11. Nam, J.S., Sharma, A.R., Nguyen, L.T., Chakraborty, C., Sharma, G., Lee, S. (2016). Application of bioactive quercetin in oncotherapy: From nutrition to nanomedicine. *Molecules*, 21(1), E108.
12. Mutlu Altundağ, E., Yılmaz, A.M., Koctürk, S., Taga, Y., Yalçın, A.S. (2017). Synergistic Induction of Apoptosis by Quercetin and Curcumin in Chronic Myeloid Leukemia (K562) Cells. *Nutr Cancer*, 70, 97-108.
13. Nagahama, K., Utsimi, T., Kumano, T., Maekawa, S., Oyama, N., Kawakami, J. (2016). Discovery of a new function of curcumin which enhances its anticancer therapeutic potency. *Sci. Rep*, 6, 30962.

14. Troselj, K., Kujundzic, R. (2014). Curcumin in Combined Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des*, 20, 6682–6696.
15. Kunnumakkara, A.B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N.K., Prasad, S., Aggarwal, B.B. (2017). Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br. J. Pharmacol*, 174, 1325–1348.
16. Comşa, Ş., Cîmpean, A.M., Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Res*, 35, 3147–3154.
17. Sweeney, E.E., McDaniel, R.E., Maximov, P.Y., Fan, P., Craig Jordan, V. (2012). Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: Significant clinical progress despite limitations. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig*, 9, 143–163.
18. Urquidi, V., Sioan, D., Kawai, K., Agarwal, D., Woodman, A.C., Tarin, D., Goodison, S. (2002). Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. *Clin. Cancer Res*, 8, 61–74.
19. Goodison, S., Viars, C., Grazzini, M., Urquidi, V. (2003). The interrelationship between DRIM gene expression and cytogenetic and phenotypic characteristics in human breast tumor cell lines. *BMC Genomics*, 4, 39.
20. Srivastava, N.S., Srivastava, R.A.K. (2019). Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. *Phytomedicine*, 52, 117–128.
21. Chou, T.C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70, 440–446.
22. Li, X., Zhou, N., Wang, J., Liu, Z., Wang, X., Zhang, Q., Liu, Q., Gao, L., Wang, R. (2018). Quercetin suppresses breast cancer stem cells (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR-signaling pathway. *Life Sci*, 196, 56–62.
23. Ranganathan, S., Halagowder, D., Sivasithambaram, N.D. (2015). Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS One*, 10(10), e0141370.
24. Liu, J.L., Pan, Y.Y., Chen, O., Luan, Y., Xue, X., Zhao, J.-J., Liu, L., Jia, H.-Y. (2017). Curcumin inhibits MCF-7 cells by modulating the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Oncol. Lett*, 14, 5581–5584.