

Embelin'in insan meme kanseri MCF-7 ve MDA MB-231 hücre proliferasyonu üzerindeki sitotoksik etkisinin tamoxifen ve docetaxel ile karşılaştırılması

Comparison of the cytotoxic effect of Embelin with tamoxifen and docetaxel on human breast cancer MCF-7 and MDA MB-231 cell proliferation

Gülsüm ABUŞOĞLU¹ (ID), Cengiz KOÇAK² (ID), Fatma Emel KOÇAK³ (ID), Bahadır ÖZTÜRK⁴ (ID), Hüsamet VATANSEV⁴ (ID)

ÖZET

Amaç: Meme kanseri son yıllarda hızla gelişen tanı ve tedavi stratejilerine rağmen kadınlarda en sık görülen kanser türü olup kansere bağlı ölüm sebebidir. Embelin, güçlü bir XIAP inhibitörü ve antiöstrojenik etkileri olan bir bileşiktir. Çalışmamızda, hormon reseptör negatif (MDA-MB-231) ve pozitif (MCF-7) olmak üzere iki farklı insan kaynaklı meme kanseri hücre hattında, etkilerini farklı hücre yolaklarla gösteren Embelin'in antitümöral etkinliklerini, halen meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan tamoksifen ve docetaxel'in etkileri ile karşılaştırarak araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Embelin'in etkilerini hücre düzeyde göstermek için, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi (xCELLigence) ile sitotoksikite analizleri ve IC₅₀ hesaplamaları yapılmıştır. Bundan sonraki diğer tüm çalışmalar için hücreler Embelin'in sitotoksikite analizlerinde belirlenen IC₅₀ dozuyla muamele edilmiş ve histopatolojik ve immünohistokimyasal (Ki-67, Bax, Bcl-2, Cyclin D1) analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Hücre sitotoksikite analizleri sonucunda,

ABSTRACT

Objective: Despite the rapidly developing diagnosis and treatment strategies in recent years, breast cancer is the most common type of cancer in women and is the cause of cancer-related death. Embelin is a potent XIAP inhibitor and a compound with antiestrogenic effects. In our study, we aimed to investigate the antitumoral activities of Embelin, which shows its effects through different cellular pathways, in two different human breast cancer cell lines, hormone receptor negative (MDA-MB-231) and positive (MCF-7) and we compared the effects of Embelin with tamoxifen and docetaxel, which are currently widely used in the treatment of breast cancer.

Methods: To demonstrate the effects of Embelin at the cellular level, cytotoxicity analyzes and IC₅₀ calculations were performed with a real-time cell electronic detection system (xCELLigence). For all subsequent studies, cells were treated with the IC₅₀ dose of Embelin which determined in cytotoxicity assays and histopathological and immunohistochemical (Ki-67, Bax, Bcl-2, Cyclin D1) analyzes were performed.

Results: As a result of cell cytotoxicity analyzes,

¹Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Konya

²Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Bölümü, Uşak

³Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Kütahya

⁴Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Konya



İletişim / Corresponding Author : Gülsüm ABUŞOĞLU

Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Selçuklu, Konya - Türkiye

E-posta / E-mail : tekinglsm@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 15.09.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 13.01.2022

Embelin'in, doz ve zaman bağımlı olmak üzere, her iki kanser hücre tipinde antiproliferatif etki gösterdiği gözlenmiştir. Embelin uygulanan hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiklerinden, IC_{50} değerleri MCF-7 için $63 \mu M$ ve MDA-MB-231 için $64 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Ki-67 ile boyanmış olan preparatların incelenmesi sonucunda, Embelin uygulanan kanser hücrelerinde, hücre sayısının ve Ki-67 proliferasyon indeksinin azaldığı ($p < 0,05$) bulunmuştur. Embelin'in hücre siklusu üzerine olan etkilerini analiz etmek amacıyla, Cyclin D1 ile boyanan preparatları incelediğimizde, her iki bileşiğin de hücre siklusunun S1 fazı için gerekli olan Cyclin D1 düzeylerini azalttığı ($p < 0,05$) görülmüştür. Embelin'in apoptotik yollar üzerine olan etkisini görmek için, proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 ile boyanmış olan preparatlar incelenmiştir. Buna göre, Bax ekspresyon düzeyi artarken ($p < 0,05$), Bcl-2 ekspresyon düzeyi azalmıştır ($p < 0,05$).

Sonuç: Genel olarak Embelin'in, her iki meme kanser hücre tipinde de, doz ve zamana bağlı olmak üzere kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, özellikle hormon reseptörü negatif MDA MB-231 hücrelerinde hem Tamoxifen hem de Docetaxel ile kıyaslandığında Embelinin, istatistiksel olarak moleküler düzeyde daha etkin olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Özellikle de hormon reseptör negatif olan meme kanserinde daha etkili olduğu sonucuna varılarak Embelin, ileride meme kanser tedavisinde alternatif yeni bir antitümöral ajan olabilir. Bu çalışmanın sonuçları gelecekteki *in vivo* çalışmalara yol gösterici olabilir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, docetaxel, embelin, tamoksifen

it was observed that Embelin had an antiproliferative effect in both cancer cell types in a dose and time dependent manner. IC_{50} values were calculated as $63 \mu M$ for MCF-7 and $64 \mu M$ for MDA-MB-231 from the proliferation curve graphs of Embelin exposed cells. As a result of the examination of the preparations stained with Hematoksilin-Eosin (H&E) and Ki-67, it was found that the cell number and Ki-67 proliferation index decreased ($p < 0.05$) in cancer cells treated with Embelin. In order to analyze the effects of Embelin on the cell cycle, when we examined the preparations stained with Cyclin D1, it was observed that embelin decreased the Cyclin D1 levels required for the S1 phase of the cell cycle ($p < 0.05$). In order to see the effect of Embelin on apoptotic pathways, preparations stained with proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2 were examined. Accordingly, while Bax expression level increased ($p < 0.05$), Bcl-2 expression level decreased ($p < 0.05$).

Conclusion: In general, Embelin inhibits cancer cell proliferation in both breast cancer cell types, depending on dose and time. We found that Embelin was statistically more effective at the molecular level when compared to both Tamoxifen and Docetaxel, especially in hormone receptor-negative MDA MB-231 cells. By concluding that it is more effective especially in hormone receptor-negative breast cancer, Embelin may be an alternative new antitumoral agent in the treatment of breast cancer in the future. The results of this study may guide for *in vivo* studies in future.

Key Words: Breast cancer, docetaxel, embelin, tamoxifen

GİRİŞ

Pek çok risk faktörüne sahip meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve tedavi modalitesindeki gelişmelere rağmen meme kanserinin genel sağ kalım oranı düşüktür (1). Meme kanseri insidansında her ne kadar yaşla beraber bir artış

olsa da (2), Batı ülkelerinde ve Ortadoğu bölgesinde özellikle genç kadınlarda da meme kanseri görülme sıklığı artmıştır (3,4). Meme kanseri morbidite ve mortalitesindeki bu artışın nedenlerinden birisi, muhtemelen kanser hücrelerinin çoğalmasına neden olan ve geleneksel kemoterapiye direnç kazandıran birçok agresif molekülün olması olabilir

(5, 6). Bu nedenle, meme kanserinde terapötik olarak hedeflenebilen ve aktif olan bazı moleküllere gereksinim vardır.

Meme kanserleri, hormon reseptör pozitif ve negatif olmak üzere hücre yüzeyinde yer alan östrojen ve progesteron reseptör düzeylerine göre sınıflandırılmaktadır (7). Buna göre hormon reseptör pozitif tümörler, tamoksifen ve aromataz inhibitörleri gibi anti-östrojenlerle genel olarak tedaviye iyi yanıt vermekte ve bu nedenle hormon reseptör pozitifliği iyi prognozla ilişkilendirilmektedir. Böylece östrojen reseptör (ER) antagonistleri ile yapılan terapilerde genel anlamda başarı elde edilmektedir (8). Progesteron reseptörü (PR), ER ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) patolojik olarak az ekspresyonu ile karakterize olan üçlü negatif meme kanseri (TNBC) (9), yüksek metastaz potansiyeline sahip olup, standart tedavilere direnç göstermekte ve teşhis edilen vakaların yaklaşık %15-20'sini kapsamaktadır (10).

Meme kanseri, esasen kemoterapiye duyarlı bir tümör olup, metastatik hastalıkta şifa sağlanamasa bile, kemoterapi ve eğer hormon reseptörleri pozitif ise, tamoksifen veya aromataz inhibitörü ilaçlarla uzun süreli yaşam sağlanabilmektedir. Tamoksifenin yanı sıra rutin tedavi protokolüne göre en sık kullanılan kemoterapötikler antrasiklin grubu (doksorubisin) ve taksan grubu (paklitaksel ve dosetaksel) ilaçlardır.

Apoptotik mekanizmaların disfonksiyonuyla, transforme hücrelerin hayatta kalma süresinin uzaması ve bu hücrelerin proliferasyonuna yol açması, kanserin en bariz özelliğidir (11). Apoptoza direnç, çok sayıda kanser türünde yaygındır ve tedavi direncinde çok önemli bir faktördür. Dolayısıyla apoptotik yollar kanser tedavisi için hedef haline gelmiştir. (12). Apoptozis inhibitör proteinler (IAP), kaspaz aktivasyonunu ve programlanmış hücre ölümünü düzenleyen majör protein ailelerinden biridir. XIAP, bilinen en güçlü kaspaz inhibitörü olup, özellikle de kaspaz 3, 7, 9 üzerinde etkili olduğu görülmüştür (13). Hemen hemen tüm doku ve hücre tiplerinde eksprese edilen fakat normal dokulara göre, tümör hücrelerinde daha fazla eksprese edilen XIAP, kanser hücrelerinin

direnç kabiliyeti kazanmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, XIAP'yi hedeflemeye yönelik çalışmalara eğilim artmış olup, şu anda temel tedavilere karşı direncin üstesinden gelmeye yardımcı olmak için XIAP inhibitörleri geliştirilmektedir (14). XIAP özellikle Orta Doğu bölgesinde meme kanseri ve diğer kanserlerde umut verici bir terapötik moleküler hedef olarak bulunmuştur (15).

Spesifik XIAP inhibitörü olan ve kimyasal yapısı koenzim Q10 (ubikininon)'e benzeyen Embelin (2,5-dihidroksi-3-undesil-1,4-benzokininon), Embelia ribes bitkisinden elde edilen, hücre geçirgen özellikli bir benzokininon derivatıdır (16). Yapılan çalışmalarda, Embelin'in, proapoptotik etkileri ile birlikte, güçlü anti-östrojenik ve zayıf progesteronel aktiviteye sahip olduğu ve hatta güçlü bir kontraseptif etkisi olduğu gösterilmiştir (17-19). Çeşitli onkogenik faktörler, inflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve protein kinazların da aracılık ettiği Embelin'in antikanser aktivitesi, lösemi, prostat, meme, mide ve beyin glioma gibi farklı kanser hücre hatlarında incelenmiştir (20-24). Ayrıca Embelinin, anti-inflamatuvar, analjezik, antidiyabetik ve antioksidan gibi farklı biyolojik etkilerinin olduğu da söylenmektedir. (12).

Kanser gibi görülme sıklığı gittikçe artan ve tedavi şansı erken tanıya bağlı olan hastalık türleri ile ilgili olarak, toplumun sağlık beklentilerinin karşılanabilmesi için, bu alanda yapılan çalışmaların hız kazanması ve elde edilen bilimsel verilerin hızlı biçimde ürüne dönüştürülebilmesi gerekmektedir. Günümüzde hastaya ve hastalıklara yaklaşımda en önemli amaç, en erken dönemde, mümkünse patolojik değişim henüz tek hücre düzeyindeyken tanı koyabilmek ve tedaviye başlayabilmektir. Bu, ancak *in vitro* yöntemlerin etkinliğini arttırmakla mümkün olacaktır.

Bu çalışmanın amacı, hormon sensitif MCF-7 (ER ve progesteron reseptör pozitif) ve hormon non-sensitif MDA MB-231 (ER ve progesteron reseptör negatif) insan kaynaklı meme kanseri hücre hatlarında, Embelin'in moleküler düzeydeki antiproliferatif etkilerini, meme kanserinin rutin tedavi protokolünde yer alan ve kullanılan Tamoksifen ve Docetaxel'in moleküler

düzeydeki etkileri ile sitolojik, morfolojik ve sitotoksik olarak karşılaştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasalların hazırlanması

Tamoksifen ile Embelin 1000 µmol/L, Docetaxel ise 1000 nmol/L olacak şekilde %0,1'lik DMSO'da çözülerek 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilmiş ve -40°C'de stoklanmıştır. İlaçların diğer dozları hazırlanan bu stoklardan dilüsyon yapılarak ayarlanmıştır.

Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan ilaçların meme kanseri hücreleri proliferasyonundaki etkilerinin gözlemlenmesi açısından ATCC den temin edilen insan meme kanseri hücre serisi olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, nemlendirilmiş, %5 CO₂'e sahip ve 37°C'lik atmosferde, %10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin streptomisin glutamin (PSG) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi yerinde kültüre edilmiştir. Hücreler %70-80 konflüent olduğunda, tripsin-EDTA ile kaldırılıp 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 75 cm²'lik flasklarda besi yerine alınarak pasajlanmıştır.

Embelin, tamoksifen ve docetaxel'in hücre proliferasyonuna etkilerinin belirlenmesi

Her iki hücre hattı için de önceden, 16 kuyulu e-platelerin (mikroelektrot içeren özel hücre kültürü kapları) her bir kuyusuna 100'er µl DMEM eklenip, DMEM'in yarım saat kuyulara yerleşmesi beklenilmiştir. Ardından hücre sayımı yapılarak her bir kuyucukta MCF-7 için 1 x 10³ ve MDA MB-231 için 1,5 x 10³ hücre olacak şekilde e-plate'lere, kuyucuk başına 100'er µl hücre ekimi yapılmıştır. 24 saat sonra hücreler Embelin (12,5-100 µM), Tamoksifen (12,5-100 µM) ve Docetaxel'in (12,5-100 nM) farklı dozlarıyla muamele edilerek, hücre proliferasyonundaki değişiklikler, mikroelektrot içeren özel hücre kültürü kaplarında, inkübatör içindeki xCELLigence (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) cihazı ile gözlemlenmiştir.

Sitolojik ve immünohistokimyasal analizler: hücre bloklarının hazırlanması

Hücre blokları, her bir ilaç için, her bir ilacın belirlenen IC50 dozu ile muamele edilmiş hücrelerden hazırlanmıştır. Hücreler, enzimatik işlem uygulanmaksızın, steril bir kazıyıcı ile kaldırılmış ve supernatant atılmıştır. Hücreler %90 etil alkol ve %10 nötral tamponlanmış formalin ile oda sıcaklığında 30 dakika tespit edilmiş ve steril dibi konik eppendorf tüplere transfer edilmiştir. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve tüplerin dibindeki pellet, sitoblok kiti (Shandon Cytoblock Cell Block Preparation System, Thermo Fisher Scientific Inc., Cheshire, UK) kullanılarak kasetler içerisine bloklanmıştır. Kasetler, oda sıcaklığında 12 saat %10 nötral formalinde bekletilerek tespit edilmiş ve daha sonra hücre blokları parafine gömülmüştür.

Histolojik ve immunohistokimyasal boyama işlemleri

Formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüş olan hücre bloklarının, 4 µm kalınlığında yarı-otomatik rotary mikrotom (Leica RM2245, Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA) ile kesitleri alınmıştır. Kesitler, H&E ile otomatik side stainer ve coverslipper (Tissue-Tek Prisma/Film, Sakura Finetek Inc., CA, USA) kullanılarak boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir (Olympus BX51, Tokyo, Japan). İmmunohistokimyasal boyama işlemleri için de otomatik slide staining sistem (Roche Ventana BenchMark GX, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) kullanılarak, Ki-67 (rabbit monoclonal primary antibody, clone 30-9, Roche), Bcl-2 (rabbit monoclonal primary antibody, clone SP66, Roche), Cyclin-D1 (rabbit monoclonal primary antibody, clone SP4-R, Roche) ve Bax (rabbit polyclonal primary antibody, Dako) immün boyamaları yapılmıştır. Herhangi bir ilaçla muamele edilmemiş hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. H&E ile boyanmış kesitler ışık mikroskopunda incelenmiştir (Olympus BX51). Rastgele seçilmiş 10 sahadan H&E ile boyanmış hücrelerin sayımı yapılarak ortalamaları alınmıştır. Ki-67, Bcl-2, Bax ve Cyclin-D1 boyamaları

ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir (Olympus BX51). Rastgele seçilmiş alanlardan her 100 hücrede pozitif boyanmış hücreler sayılarak pozitif boyanan hücre yüzdeleri hesaplanmıştır.

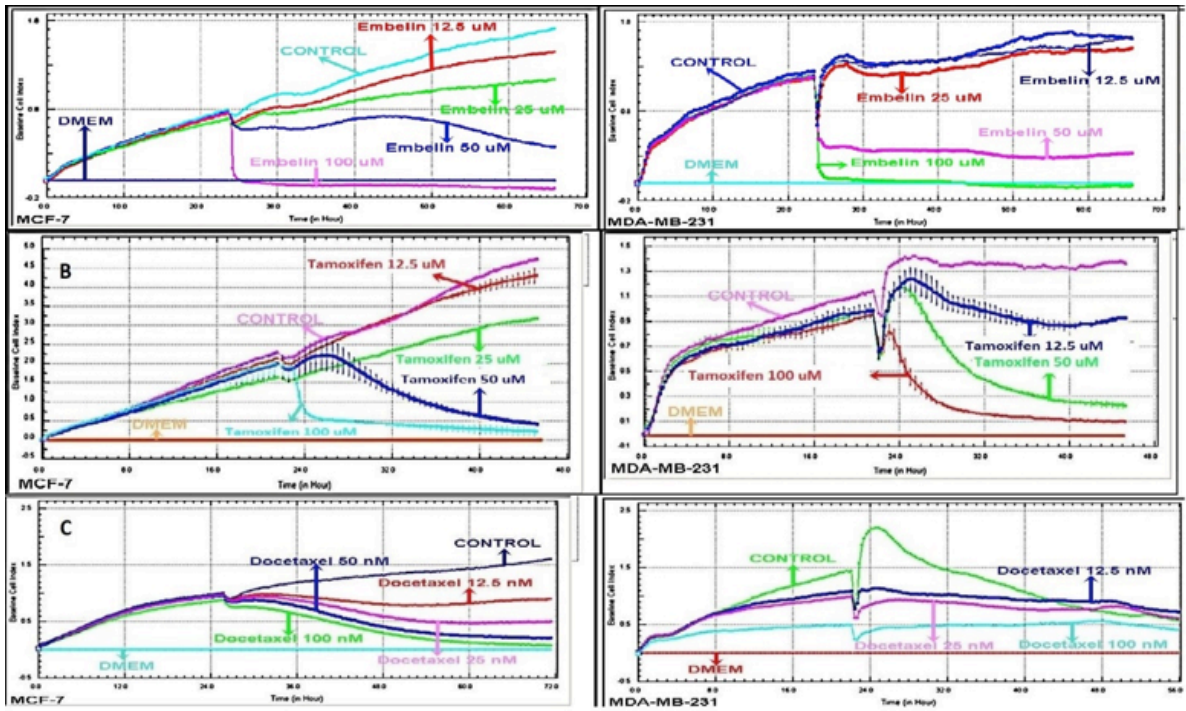
İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism version 6.05 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) programı ile yapılmıştır. Histopatolojik ve immünohistokimyasal skorlama değerlerinin karşılaştırılması ki-kare testi ile yapılmıştır. 0,05'den küçük olan P değerleri, anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Embelin, Docetaxel ve Tamoksifen'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkileri

Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edilmiştir. Embelin, Tamoksifen ve Docetaxel'in, kontrol ile karşılaştırıldığında; hücreleri doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüş olup (Şekil 1), IC₅₀ dozları Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Embelin, Tamoksifen ve Docetaxelin MCF-7 ve MDA MB-231 hücrelerine doz ve zaman bağımlı etkileri

Tablo 1. Embelin, Docetaxel ve Tamoxifenin MCF-7 ve MDA MB-231 hücreleri için hesaplanan IC₅₀ değerleri

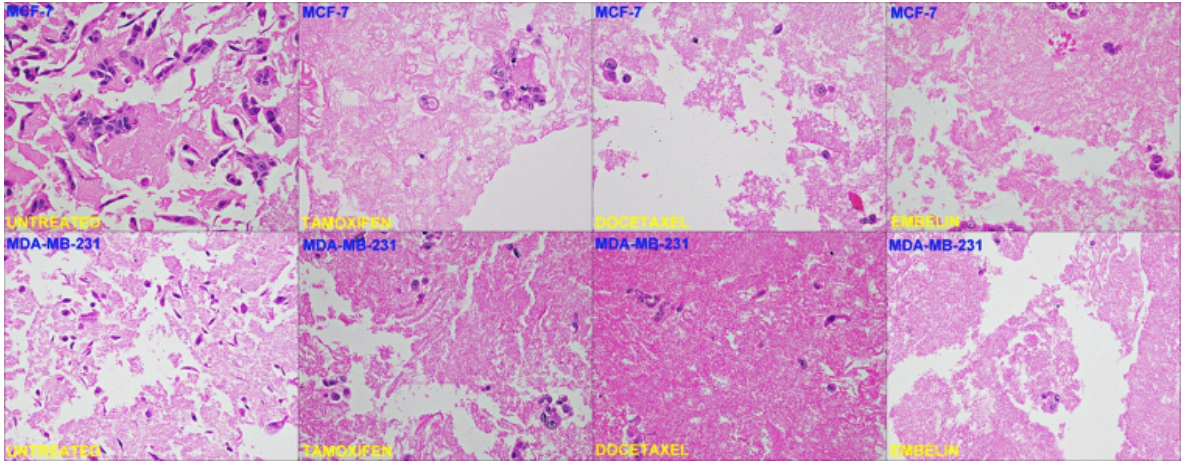
	MCF-7	MDA-MB-231
Embelin (IC ₅₀)(µM)	63	64
Tamoxifen (IC ₅₀)(µM)	40	50
Docetaxel (IC ₅₀)(nM)	43	32

IC₅₀: hücrelerin %50'sini inhibe eden inhibitör (ilaç) konsantrasyonu, µM: mikromolar, nM: nanomolar

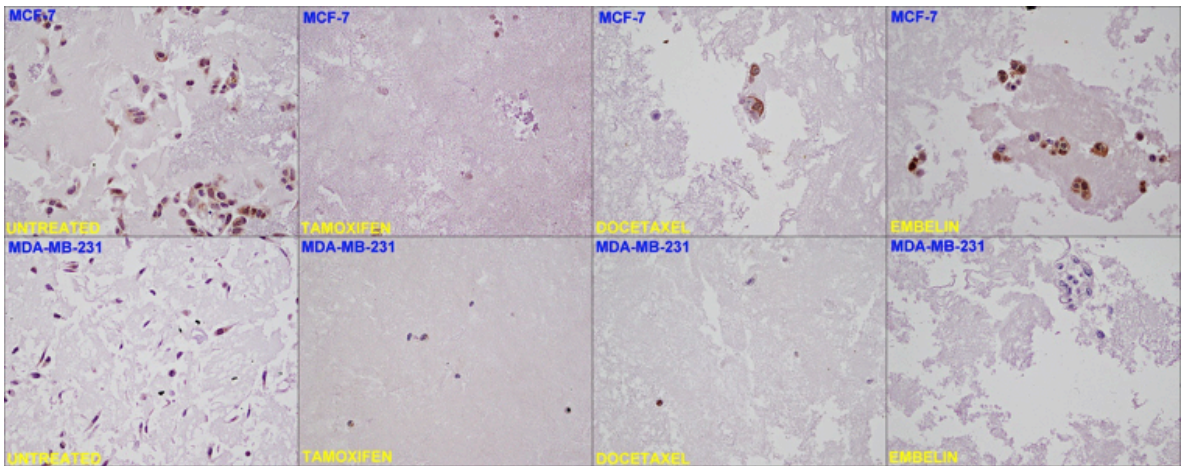
Histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak boyanmış hücre bloklarının değerlendirilmesi

Her iki hücre hattı için histopatolojik skorlar, hem ilaçla muamele edilmiş hem de ilaçla muamele edilmemiş meme kanseri hücreleri için Tablo 2'de gösterilmiştir. H&E, Bax, Bcl-2, Bax/Bcl-2, Ki-67 ve Cyclin-D1 skorlama değerlerine göre, ilaçla muamele edilmemiş hücreler ile Docetaxel, Tamoxifen ve Embelin ile muamele edilmiş hücreler arasında

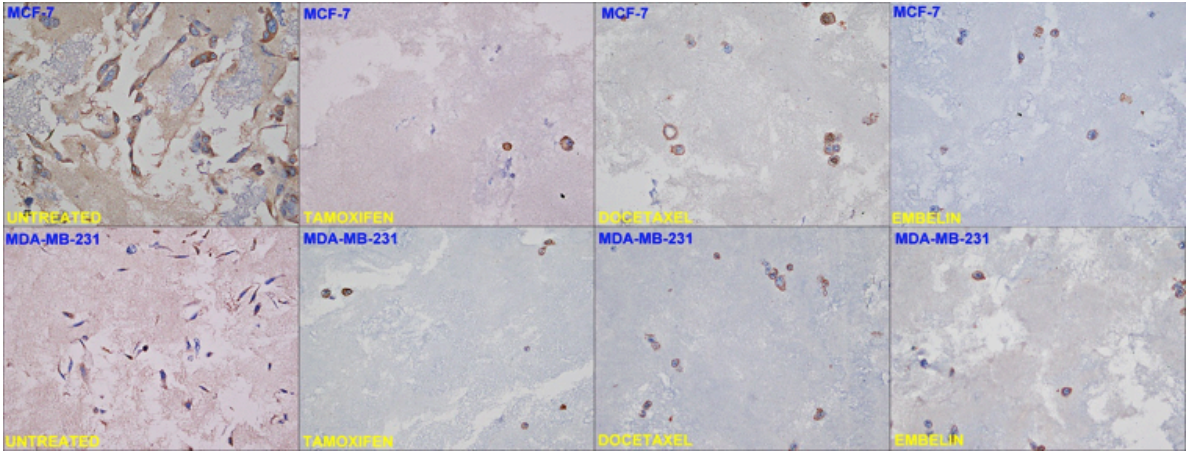
istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($p<0,05$). Histopatolojik ve immünohistokimyasal skorlama değerleri için sadece Tamoxifen, Docetaxel ve Embelin ile muamele edilmiş hücreler kendi aralarında karşılaştırıldığında; H&E (Şekil 2), Bax (Şekil 3), Bcl-2 (Şekil 4), Cyclin-D1 (Şekil 5), Ki-67 (Şekil 6) ve Bax/Bcl-2 skorlama değerleri arasında istatistiksel olarak farklılıklar olduğu görülmüştür ($p<0,05$).



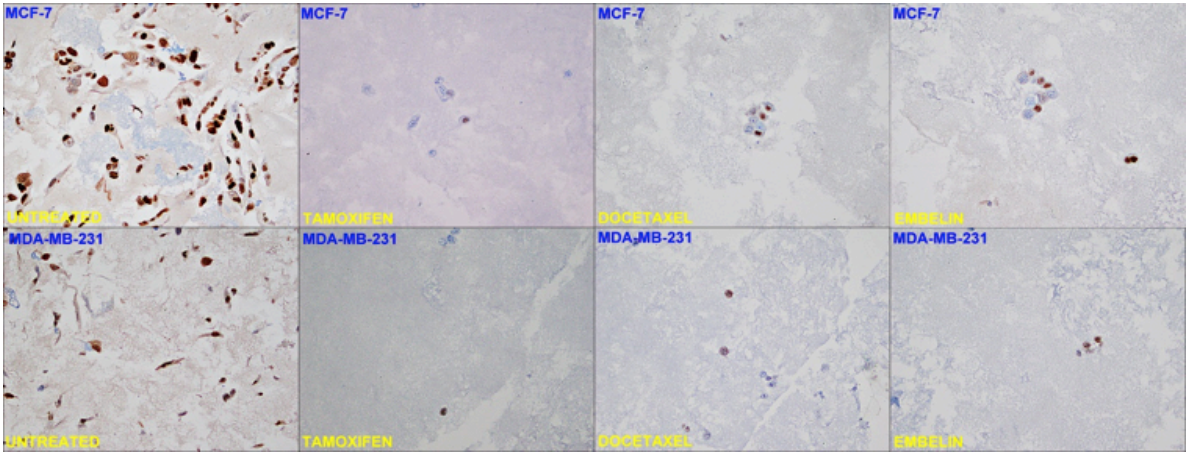
Şekil 2. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için H&E ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (H&E x 400)



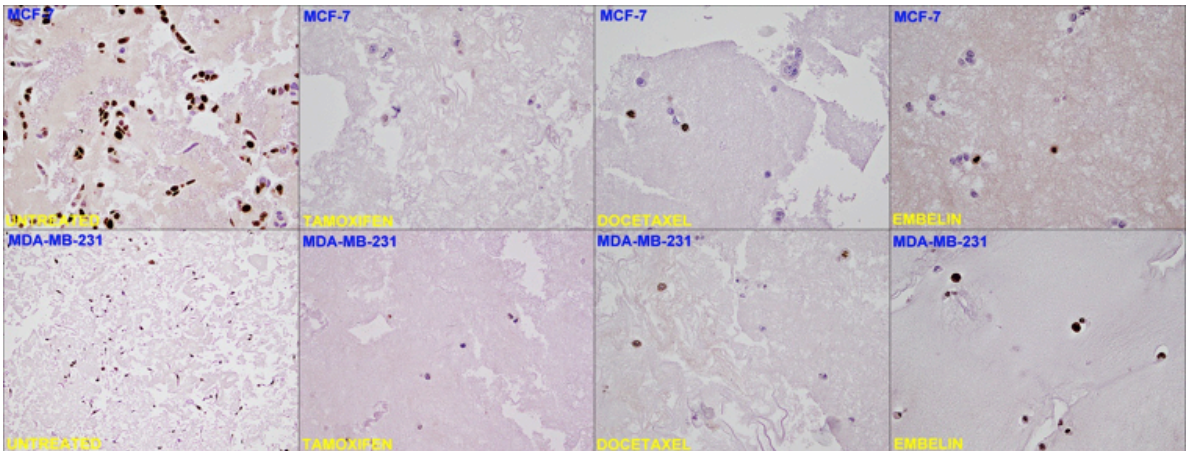
Şekil 3. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için BAX ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (BAX x 400).



Şekil 4. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için Bcl-2 ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (Bcl-2 x 400).



Şekil 5. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için Cyclin D1 ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (Cyclin D1 x 400).



Şekil 6. Kontrol, Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin için Ki-67 ile boyanmış hücre bloklarının mikroskopik görünümü (Ki-67 x 400).

Embelin, Docetaxel ve Tamoksifen'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoza etkileri

Docetaxel, Tamoksifen ve Embelin'in MCF-7 ve MDA MB-231 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisi için antiapoptotik Bcl-2 ve proapoptotik Bax analizleri yapılmış olup, ilaçlarla muamele edilen ve muamele edilmeyen hücreler arasındaki farkları

veren skor değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Ayrıca apoptoz skorlama değerleri için sadece Tamoksifen, Docetaxel ve Embelin ile tedavi edilen hücreleri kendi aralarında karşılaştırdığımızda (Tablo 2); Bcl-2, Bax, Bax/Bcl-2, skorlama değerleri, hücreler arasında da yine önemli farklılıklar göstermiştir ($p < 0,05$).

Tablo 2. Kontrol hücre blokları ile Embelin, Tamoksifen ve Docetaxel uygulanan hücre bloklarında H&E, Ki-67, Bcl-2, Bax, cyclin-D1 ve Bax/Bcl-2 oranı patolojik skorlama değerlerinin karşılaştırılması

MCF-7	Kontrol	Embelin	Docetaxel	Tamoksifen	χ^2	p
H&E (n)	77	20	35	16	63,08	< 0.001
Ki-67 (%)	84	30	50	23	47,97	< 0.001
Bcl-2 (%)	79	35	55	32	28,15	< 0.001
Bax (%)	30	75	59	80	24,95	< 0.001
Bax/Bcl-2	0,38	2,14	1,07	2,50	187,00	< 0.001
Cyclin-D1 (%)	80	25	55	21	50,85	< 0.001
MDA-MB-231	Kontrol	Embelin	Docetaxel	Tamoksifen	χ^2	p
H&E (n)	85	10	24	43	78,74	< 0.001
Ki-67 (%)	98	15	20	47	96,40	< 0.001
Bcl-2 (%)	85	25	35	59	42,20	< 0.001
Bax (%)	10	85	68	34	69,09	< 0.001
Bax/Bcl-2	0,12	3,40	1,94	0,58	434,04	< 0.001
Cyclin-D1 (%)	90	15	30	58	67,91	< 0.001

Bcl-2: B-cell lymphoma 2, Bax: Bcl-2-associated X protein. Patolojik skorlama değerleri ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır. 0,05'den küçük olan P değerleri ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

TARTIŞMA

Stratejik olarak hedeflenen kanser tedavileri, hücre büyümesi ve hücre ölüm yolları ile ilişkili mekanizmaları araştırmaya odaklanmıştır (25-28). Doğal bir benzokinon olan Embelin, *in vitro* olarak pek çok kanser türünde mitokondriye bağımlı apoptozu indükleyerek antiproliferatif özelliğini sergilemiştir. Mitokondriden salınan faktörlerle mitokondriyal yol,

anti-apoptotik (XIAP, Mcl-1, Bcl-xL ve Bcl-2) ve pro-apoptotik (Smac, Bak, Bid ve Bax) dahil olmak üzere Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir ve sitokrom c'nin mitokondriden salınması ile kaspaz-9, sitokrom c ve apoptotik proteaz aktive edici faktörden oluşan kompleks oluşmasına neden olan içsel ölüm uyarıları tarafından aktive edilir. XIAP hem kaspaz-9 hem de kaspaz-3'ü inhibe ederek kanser hücrelerinde apoptozun baskılanmasına yol açar (12). Daha önce

yapılan çalışmalarda, Embelin'in XIAP'nin güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (29, 30). Embelin'in sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkileri prostat kanseri, insan kolon kanseri, pankreatik kanseri, multipl myeloma, glioma, mesane kanseri gibi farklı türdeki kanser hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (21, 23, 31-34).

Literatürde, Embelin'in meme kanser hücrelerindeki etkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Li ve ark. (35) yaptığı bir çalışmada, Embelin'in MCF-7 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücre siklusunu G2/M fazında bloke ederek apoptosisi indüklediği gösterilmiştir. Çalışmamızda da, benzer olarak Embelin'in hücre siklusunun G1 fazı için gerekli olan cyclin D1 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Aynı çalışmada, bizim çalışmamız ile benzer olarak, Embelin'in Bax ekspresyonunu artırdığı, Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada, Embelin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatlarında doza ve zamana bağımlı olarak, antiproliferatif ve apoptotik etki gösterdiği bildirilmiştir (22). Çalışmada, bizim çalışmamızla benzer olarak, Embelin'in Bcl-2 ekspresyonunu baskıladığı, kaspaz-3 aktivasyonunu artırdığı belirlenmiştir. Ek olarak, araştırmacılar, bizim çalışmamızda da olduğu gibi Embelin'in MDA-MB-231 hücreleri üzerinde, MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisine göre daha efektif olduğunu bildirmişlerdir. Lee ve ark. (36) yaptıkları bir çalışmada, Embelin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinde invazyon ve migrasyonu tetikleyen spesifik protein analizleri yaparak, Embelinin antiproliferatif etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmanın sitotoksikite ve apoptoz sonuçları çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olup, hücre proliferasyon analizi metodu ve apoptoz sebep olan protein analizleri farklıdır. Ayrıca kendi çalışmamızda; Embelinin tüm bu moleküler etkileri, rutin tedavi protokolünde yer alan Tamoksifen ve Docetaxelin etkileri ile kıyaslanmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada;, Embelin, matrix metalloproteinaz

(MMP-2), MMP-9, vasküler endotelial growth faktör (VEGF), TNF- α converting enzim aktivasyonlarını inhibe ederek antiproliferatif ve antimetastatik etki bulunmuştur (37). Ayrıca bu çalışmalardan farklı olarak Embelinle muamele edilen MCF-7 hücreleri ile IL-1 β ile uyarılan mezenkimal kök hücrelerinin ortak kültürü, meme kanseri hücrelerinde etkin bir şekilde apoptozu indüklemiş olup, Embelin ve IL-1 β ile uyarılan kök hücrelerin birleşik etkilerinden dolayı meme kanseri tedavisi için yeni bir terapötik strateji sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir (38). Yani bu çalışmada; sinerjistik bir etki mekanizmasıyla Embelin ve IL-1 β birlikte meme kanseri tedavisinde yeni ve farklı bir terapi protokolüne öncülük etmektedirler. Tamoksifen ve Embelin'in etkilerinin karşılaştırılmalı olarak incelendiği diğer bir çalışmada, Embelin'in MCF-7 kanser hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu inhibe ettiği, Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak, P53, kaspaz-3 ve 9 ekspresyonunu artırarak apoptotik etki gösterdiği bulunmuştur (39). Çalışmanın proliferasyon ve apoptoz analizleri sonuçları kendi çalışma sonuçlarımızla benzer olmakla beraber, bazı farklılıklar göstermiştir. Bu farklılıklardan en barizi, adı geçen çalışmada Embelinin MCF-7 hücrelerindeki moleküler düzeydeki etkileri Tamoksifenin moleküler düzeydeki etkilerine göre daha etkin olmasıdır. Bizim çalışmamızda ise Embelin ve Tamoksifenin MCF-7 hücrelerindeki hem antiproliferatif hem proapoptotik etkileri istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermemiştir. Çalışmamızın diğer bir kısmında yer alan MDA-MB-231 hücrelerinde ise bunun aksi bir şekilde, hem proliferasyon hem de apoptoz açısından, Embelin Tamoksifene göre istatistiksel olarak daha etkindir. MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinin kullanıldığı başka bir çalışmada, Embelin'in, G1 fazında hücre siklusunu inhibe ettiği, Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak ve P53 ekspresyonunu artırarak apoptotik etki gösterdiği ve normal hücreler üzerinde çok az toksik etkisi olduğu belirlenmiştir (40).

Çalışmamızın asıl amacı, hormon sensitif MCF-7 ve hormon sensitif olmayan MDA-MB-231 iki farklı

insan kaynaklı meme kanser hücre hattında, XIAP inhibitörü Embelin'in etkileri araştırılarak Embelin'in moleküler düzeydeki etkilerini, meme kanser tedavisinde halen yaygın olarak kullanılmakta olan Tamoksifen ve Docetaxel'in moleküler düzeydeki etkileri ile kıyaslanmasıdır. Embelin'in etkilerini ortaya çıkarmak için gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi ile hücre kültürü, hücre sitotoksitesite analizi, histopatolojik ve immünohistokimyasal analizlerden yararlanılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda, genel olarak Embelin'in, her iki meme kanser hücre tipinde de, doz ve zamana bağlı olmak üzere kanser hücre proliferasyonu inhibe ettiğini, özellikle MDA MB-231 hücrelerinde Ki-67 proliferasyon indeksi, cyclin D1 düzeyi ve Bcl-2 ekspresyonunu hem Tamoksifen hem de Docetaxel'e göre azaltarak hücre siklusunu inhibe ettiğini, aynı şekilde Bax/Bcl-2 oranını da her iki ilaçla kıyasladığımızda daha da artırarak apoptozisi indüklediğini ortaya çıkarılmıştır. Böylece, apoptozun hem mitokondriyal hem de dışsal yollarını inhibe edebilen bir antiapoptotik protein olan XIAP'ın, meme kanseri hücrelerinde terapötik duyarlılıkta

anahtar bir rol oynama rolü olabileceğini bildirmiş olmaktadır. MCF-7 hücrelerinde ise Embelin doz ve zaman bağımlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe etmesine rağmen moleküler düzeydeki etkileri her iki ilaçla kıyaslandığında, özellikle Docetaxel'e göre daha efektif olduğu fakat Tamoksifenle istatistiksel olarak aynı etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla Embelin'in MDA-MB-231 hücreleri üzerinde, MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisine göre daha efektif olduğunu söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, tümör hücreleri invazyon ve metastaz yapabilmek için çoklu hayatta kalma yolları kullanır. Buna göre, çoklu hücrel ve redoks yollarını baskılayabilen Embelin gibi ajanlar, kanserin önlenmesi ve tedavisi için güçlü bir potansiyele sahip olabilir. Embelin'in meme kanser hücrelerinde antitümöral etkinliğini gösterdiğimiz bu *in vitro* çalışma, ileride yapılacak olan *in vivo* ve klinik faz çalışmalarına destek ve yol gösterici olabilir. Embelin, ileride özellikle triple negatif olarak sınıflandırılan ve tedavi seçeneği son derece sınırlı olan daha agresif meme kanser türünün tedavisinde, yeni antikanser ajanlar olarak kullanıma girebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Dumlupınar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2014-69 proje numarasıyla desteklenmiştir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Etik Kurulu onayı gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 2013;63(1):11-30.
2. Elomrani F, Zine M, Afif M, L'Annaz S, Ouziane I, Mrabti H, et al. Management of early breast cancer in older women: from screening to treatment. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2015;7:165-71.
3. Leclère B, Molinié F, Trétarre B, Stracci F, Daubisse-Marliac L, Colonna M. Trends in incidence of breast cancer among women under 40 in seven European countries: a GRELL cooperative study. *Cancer Epidemiol*, 2013;37(5):544-9.
4. Al Tamimi DM, Shawarby MA, Ahmed A, Hassan AK, AlOdaini AA. Protein expression profile and prevalence pattern of the molecular classes of breast cancer--a Saudi population based study. *BMC Cancer*, 2010;10:223.
5. Sayed-Ahmed MM, Hafez MM, Al-Shabanah OA, Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Al-Yahya AA, et al. Increased expression of biological markers as potential therapeutic targets in Saudi women with triple-negative breast cancer. *Tumori*, 2013;99(4):545-54.
6. Colak D, Nofal A, Albakheet A, Nirmal M, Jeprel H, Eldali A, et al. Age-specific gene expression signatures for breast tumors and cross-species conserved potential cancer progression markers in young women. *PLoS One*, 2013;8(5):e63204.
7. Pehlivanoğlu S, Aydın Acar Ç. PAK4 promotes invasive potential of MCF-7 cells in PKC-dependent manner through downregulation of E-Cadherin. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2020; 77(1): 107 - 116.
8. Oh DS, Troester MA, Usary J, Hu Z, He X, Fan C, et al. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *J Clin Oncol*, 2006;24(11):1656-64.
9. Aysola K, Desai A, Welch C, Xu J, Qin Y, Reddy V, et al. Triple negative breast cancer - an overview. *Hereditary Genet*, 2013;2013(Suppl 2).
10. Siraj AK, Pratheeshkumar P, Parvathareddy SK, Divya SP, Al-Dayel F, Tulbah A, et al. Overexpression of PARP is an independent prognostic marker for poor survival in Middle Eastern breast cancer and its inhibition can be enhanced with embelin co-treatment. *Oncotarget*, 2018;9(99):37319-32.
11. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001;411(6835):342-8.
12. Ko JH, Lee SG, Yang WM, Um JY, Sethi G, Mishra S, et al. The application of Embelin for cancer prevention and therapy. *Molecules*, 2018; 23: 621.
13. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 2007;12(9):1543-68.
14. Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ. Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ*, 2006;13(2):179-88.
15. Hussain AR, Siraj AK, Ahmed M, Bu R, Pratheeshkumar P, Alrashed AM, et al. XIAP over-expression is an independent poor prognostic marker in Middle Eastern breast cancer and can be targeted to induce efficient apoptosis. *BMC Cancer*, 2017;17(1):640.
16. Coyle R, Slattery K, Ennis L, O'Sullivan M J, Zisterer DM. The XIAP inhibitor embelin sensitises malignant rhabdoid tumour cells to TRAIL treatment via enhanced activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Int J Oncol*, 2019;55(1):191-202.
17. Githui EK, Makawiti DW, Midiwo JO. Changes in the concentrations of testosterone, luteinising hormone and progesterone associated with administration of embelin. *Contraception*, 1991;44(3):311-7.
18. Wango EO. Anti-fertility effects of embelin in female Sprague-Dawley rats may be due to suppression of ovarian function. *Acta Biol Hung*, 2005;56(1-2):1-9.
19. Johri RK, Pahwa GS, Sharma SC, Zutshi U. Determination of estrogenic/antiestrogenic potential of antifertility substances using rat uterine peroxidase assay. *Contraception*, 1991;44(5):549-57.
20. Hu R, Yang Y, Liu Z, Jiang H, Zhu K, Li J, et al. The XIAP inhibitor Embelin enhances TRAIL-induced apoptosis in human leukemia cells by DR4 and DR5 upregulation. *Tumour Biol*, 2015;36(2):769-77.
21. Park N, Baek HS, Chun YJ. Embelin-induced apoptosis of human prostate cancer cells is mediated through modulation of akt and β -catenin signaling. *PLoS One*, 2015;10(8):e0134760.

22. Shah P, Djisam R, Damulira H, Aganze A, Danquah M. Embelin inhibits proliferation, induces apoptosis and alters gene expression profiles in breast cancer cells. *Pharmacol Rep*, 2016;68(3):638-44.
23. Wang A, Zhang B, Zhang J, Wu W, Wu W. Embelin-induced brain glioma cell apoptosis and cell cycle arrest via the mitochondrial pathway. *Oncol Rep*, 2013;29(6):2473-8.
24. Wang DG, Sun YB, Ye F, Li W, Kharbuja P, Gao L, et al. Anti-tumor activity of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibitor embelin in gastric cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 2014;386(1-2):143-52.
25. Shanmugam MK, Kannaiyan R, Sethi G. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. *Nutr Cancer*, 2011;63(2):161-73.
26. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, 2007;131(5):966-79.
27. Hsieh YS, Yang SF, Sethi G, Hu DN. Natural bioactives in cancer treatment and prevention. *Biomed Res Int*, 2015;2015:182835.
28. Bishayee A, Sethi G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. *Semin Cancer Biol*, 2016;40-41:1-3.
29. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Embelin, an inhibitor of X chromosome-linked inhibitor-of-apoptosis protein, blocks nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling pathway leading to suppression of NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene products. *Mol Pharmacol*, 2007;71(1):209-19.
30. Nikolovska-Coleska Z, Xu L, Hu Z, Tomita Y, Li P, Roller PP, et al. Discovery of embelin as a cell-permeable, small-molecular weight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of a traditional herbal medicine three-dimensional structure database. *J Med Chem*, 2004;47(10):2430-40.
31. Dai Y, Qiao L, Chan KW, Yang M, Ye J, Ma J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to the inhibitory effects of Embelin on colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 2009;69(11):4776-83.
32. Peng M, Huang B, Zhang Q, Fu S, Wang D, Cheng X, et al. Embelin inhibits pancreatic cancer progression by directly inducing cancer cell apoptosis and indirectly restricting IL-6 associated inflammatory and immune suppressive cells. *Cancer Lett*, 2014;354(2):407-16.
33. Heo JY, Kim HJ, Kim SM, Park KR, Park SY, Kim SW, et al. Embelin suppresses STAT3 signaling, proliferation, and survival of multiple myeloma via the protein tyrosine phosphatase PTEN. *Cancer Lett*, 2011;308(1):71-80.
34. Fu X, Pang X, Qi H, Chen S, Li Y, Tan W. XIAP inhibitor Embelin inhibits bladder cancer survival and invasion in vitro. *Clin Transl Oncol*, 2016;18(3):277-82.
35. Li Y, Li D, Yuan S, Wang Z, Tang F, Nie R, et al. Embelin-induced MCF-7 breast cancer cell apoptosis and blockade of MCF-7 cells in the G2/M phase via the mitochondrial pathway. *Oncol Lett*, 2013;5(3):1005-9.
36. Lee H, Ko JH, Baek SH, Nam D, Lee SG, Lee J, et al. Embelin inhibits invasion and migration of mda-mb-231 breast cancer cells by suppression of cxc chemokine receptor 4, matrix metalloproteinases-9/2, and epithelial-mesenchymal transition. *Phytother Res*, 2016;30(6):1021-32.
37. Dhanjal JK, Nigam N, Sharma S, Chaudhary A, Kaul SC, Grover A, et al. Embelin inhibits TNF- α converting enzyme and cancer cell metastasis: molecular dynamics and experimental evidence. *BMC Cancer*, 2014;14:775.
38. Liang YH, Wu JM, Teng JW, Hung E, Wang HS. Embelin downregulated cFLIP in breast cancer cell lines facilitate anti-tumor effect of IL-1 β -stimulated human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Sci Rep*, 2021;11:14720.
39. Sumalatha KR, Abiramasundari G, Chetan GK, Divya T, Sudhandiran G, Sreepriya M. XIAP inhibitor and antiestrogen embelin abrogates metastasis and augments apoptosis in estrogen receptor positive human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Mol Biol Rep*, 2014;41(2):935-46.
40. Nigam N, Grover A, Goyal S, Katiyar SP, Bhargava P, Wang PC, et al. Targeting mortalin by embelin causes activation of tumor suppressor p53 and deactivation of metastatic signaling in human breast cancer cells. *PLoS One*, 2015;10(9):e0138192.