www.biodicon.com Biological Diversity and Conservation

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 10.46309/biodicon.2020. 824105
13/3 (2020) 194-199

Effect of black grape extract on MMP-9 gene expression in breast cancer cells

Ahu SOYOCAK [*1], Gülşah KOÇ [1]
ORCID: 0000-0003-0999-2774**;** 0000-0002-9678-5652

[1] Istanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Turkey

Abstract

Metastasis is among the most important factors in the decrease in breast cancer survival and treatment failure. It is of great importance to elucidate the molecular pathways of breast cancer metastasis. Recent research shows that polyphenolic compounds in plants have anti-invasive and anti-metastatic activities. Molecular mechanism of black grape extract including abundant polyphenols on breast cancer and metastasis are not yet fully known. In our study, it was aimed to determine the effect of black grape extract applied to human breast cancer cell line on cell viability and adhesion and on MMP-9 gene expression, which is thought to have a role in metastasis. In the study, cell viability by trypan blue method, cell adhesion with 3′-[1-[(phenylamino)-carbony]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate (XTT) method and matrix metalloproteinases 9 (MMP-9) gene expression by qRT-PCR were determined in MCF-7 breast cancer cell lines. In our study, it was found that black grape extract decreased MMP-9 gene expression, cell viability and adhesion and this decrease was not statistically significant ($p > 0.05$). The study results support the hypothesis that natural anti-cancer agents such as polyphenols can be prevent cancer to occur and spread by acting on molecules such as MMP-9. However, further studies are needed to elucidate the molecular mechanisms of polyphenols.

Keywords: breast cancer, MCF-7, grape extract, MMP-9, gene expression

---------- * ----------

Siyah üzüm ekstresinin meme kanseri hücrelerinde MMP-9 gen ekspresyonu üzerine etkisi

Özet

Meme kanseri sağ kalım oranındaki düşüş ve tedavisindeki başarısızlığın en önemli etkenleri arasında metastaz görülmektedir. Meme kanseri metastazının moleküler yolaklarının aydınlatılması büyük bir öneme sahiptir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bitkilerde bulunan polifenolik bileşiklerin anti-invaziv ve anti-metastatik yeteneklere sahip olduğunu göstermektedir. Bol miktarda polifenol içeren siyah üzüm ekstresinin meme kanseri ve metastazı üzerindeki etkisi ve moleküler mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda, insan meme kanseri hücre dizisine uygulanan siyah üzüm ekstresinin hücre canlılığı ve adezyonuna etkisi ile metastazda rolü olabileceği düşünülen MMP-9 gen ekspresyonu üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. MCF-7 meme kanser hücre dizilerinde tripan blue yöntemi ile hücre canlılığı, sodium 3′-[1-[(phenylamino)-carbony]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate (XTT) yöntemi ile hücre adezyonu ve qRT-PCR ile matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9) gen ekspresyonu belirlenmiştir. Çalışmamızda, siyah üzüm ekstresinin MMP-9 gen ekspresyonunu, hücre canlılığını ve adezyonunu azalttığı, bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Sonuç olarak polifenoller gibi doğal kanser önleyici ajanların MMP-9 gibi kanserin oluşmasını ve yayılmasını sağlayan moleküllere etki ederek önleyebileceği fikri desteklenmiştir. Bununla birlikte polifenollerin etkilediği moleküler mekanizmaların aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: meme kanseri, MCF-7, üzüm ekstresi, MMP-9, gen ekspresyonu

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +904441428; Fax.: +902124255759; E-mail: ahusoyocak@aydin.edu.tr
© Copyright 2020 by Biological Diversity and Conservation Geliş tarihi: 10.11.2020; Yayın tarihi: 15.12.2020 BioDiCon. 981-1120

1. Giriş

Meme kanseri dünya çapında en yaygın görülen kanserler arasında yer almakta ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin nedenleri arasında etkin bir rol oynamaktadır. Meme kanseri sağ kalım oranındaki düşüş ve tedavisindeki başarısızlığın en önemli etkenleri arasında metastaz görülmektedir. Metastazın engellenmesi meme kanseri ile mücadelede önemli bir basamak gibi görünmektedir. Meme kanseri metastazının moleküler yolaklarının aydınlatılması bu nedenle büyük bir öneme sahiptir.

Matriks metaloproteinazlar (MMP'ler), hücre dışı matriks bileşenlerinin yeniden şekillenmesinde görevli, 20'den fazla farklı üyesi olan çinkoya bağlı endopeptidaz protein ailesi olarak tanımlanmaktadır [1,2]. MMP ailesi üyeleri, jelatinler, kolajenazlar, stromelisinler, matrilisinler ve membran tipi MMP'ler olmak üzere çeşitli gruplara ayrılmaktadır [3]. MMP'ler tümör mikro çevresinin düzenleyicileri olarak, birçok mekanizma yoluyla kanserleşme sürecinin başlamasına, gelişmesine ve ilerlemesine katkıda bulunan önemli faktörler arasında gösterilmektedir [4,5]. Özellikle metastazla ilgili MMP'ler, bazal membranları bozar, hücre dışı matriks bileşenlerini yıkıma uğratır ve hücresel invazyonu uyarır [4,5].

Jelatinaz B olarak da bilinen matriks metaloproteinaz-9 (MMP-9), 20q13.12 kromozomunda lokalize, 13 ekzon ve 12 introndan oluşan gen bölgesi tarafından sentezlenir [3,6]. MMP-9 kanser hücresi invazyonunda ve tümör metastazında oynadığı rol nedeniyle en yaygın araştırılan MMP'lerden biri olup, agresif ve metastatik meme kanseri ile kuvvetli bir şekilde ilişkisi olduğu gösterilmiştir [3,6,7]. Yapılan araştırmalarda insan meme kanserinde MMP-9'un stromal hücrelerden ekspresyonunun önemli bir prognostik etki gösterebileceği bildirilmiştir [8,9]. Araştırmalar sağlıklı meme dokusunda MMP-9 gen ekspresyonunun düşük seviyede, meme kanseri hücrelerinde ise anlamlı derecede yüksek seviyede olduğunu göstermektedir [10–13]. Bu nedenle meme kanserinde, MMP-9'un biyobelirteç olabileceği üzerinde önemle durulmaktadır. Ayrıca, tümör hücreleri tarafından yüksek MMP-9 ekspresyonunun, lenf nodu ve uzak organ metastazı ile ilişkisi belirtilmiştir [9,14,15]. Metastatik lenf nodlarında MMP-9'un aşırı ekspresyonu gösterilmiştir. Meme kanseri dokularında MMP-9 ve MMP-2 ekspresyon seviyelerinin lenf nodu metastazı ve tümör evrelemesi ile korele olduğu bulunmuştur [13].

Son yıllarda yapılan araştırmalar, bitkilerde bulunan polifenolik bileşiklerin anti-invaziv ve anti-metastatik yeteneklerine sahip olduğunu göstermektedir. Bitkisel kimyasalların önemli bir grubunu oluşturan bu polifenolik bileşikler, bitkilerin köklerinde, sebzelerde, meyvelerde, çay, kahve, kakao, şarap gibi bitkisel ürünlerde yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Polifenoller, diyetteki başlıca antioksidanlardır [16]. Diyet konsantresi olarak tüketilen üzüm ekstreleri yüksek düzeyde polifenol içermektedir. Siyah üzüm ekstresi (enoant), *Vitis vinifera* L. (Cabernet-Sauvignon ve Merlot) cinsi siyah üzümlerin kabuğu ve çekirdeğinden elde edilmektedir [17]. Ekstre antioksidan, antibakteriyel ve antialerjik özelliklere sahiptir. Ekstrenin kardiyovasküler hastalıklar, solunum ve bağışıklık sistemi hastalıkları, alerji ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde terapötik ve profilaktik amaçlarla kullanılabileceği bildirilmektedir. Ayrıca, kanser tedavisinde kemoterapötik ajanların ve iyonlaştırıcı radyasyonun zararlı etkilerine karşı kullanılabileceği önerilmektedir [18]. Bunun yanında siyah üzüm ekstresinin meme kanseri ve metastazı üzerindeki etkisi ve moleküler mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda, insan meme kanseri hücre dizisine uygulanan siyah üzüm ektresinin hücre canlılığı ve adezyonuna etkisi ile metastazda rolü olabileceği düşünülen MMP-9 gen ekspresyonu üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1 Hücre Kültürü

Çalışmamızda MCF-7 meme kanser hücre dizileri, 25 cm^2'lik flasklarda % 10 fötal bovine serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve 2 mM L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri içerisinde, 37^oC'de %5 CO_2 içeren ortamda kültüre edildi.

2.2 Üzüm ekstresi

Çalışmamızda fenolik madde içeriği folin metodu ile 47,78 mg gallik asit/ml belirlenen "Enoant" siyah üzüm ekstresi kullanıldı." Enoant" içeriğinde, kateşin (333,0 ±2,607 ppm), epikateşin (154,4 ±0,305 ppm), trans-resveratrol (6,469 ±0,05 ppm) ve kersetin (43,74 ±0,335 ppm) polifenolleri bulunmaktadır [17]. Üzüm ekstresi Enoant MCF-7 hücrelerine 2 kere 1/1000 olarak seyreltilerek elde edilen iki farklı konsantrasyonda (E1 ve E2) 24 saat süreyle uygulandı.

2.3 Hücre canlılığı

Üzüm ekstresine maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde canlılık yüzdesi tripan blue yöntemi kullanılarak belirlendi. İnkübasyon sonrasında tripsinlenerek flask tabanından ayrılan hücreler tripan blue boyasına maruz bırakıldı. 15 dk sonra boyanan cansız ve boyanmayan canlı hücrelerin miktarı neubauer lamında sayılarak belirlendi. Sayım

sonrası % hücre canlılığı formülüne göre belirlendi. Formül: 'canlı hücre sayısı/(canlı hücre sayısı+ölü hücre sayısı)x100'

2.4 Hücre adezyonu

Üzüm ekstresine 24 saat süreyle maruz bırakılmak üzere MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu platelere her kuyucukta $7x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi. Ekimi yapılan hücrelerden üzüm ekstresi uygulanan ve uygulanmayan deney grupları oluşturuldu. Her deney grubu için kuyucukların yarısında adezyonu belirlemek için yıkama işlemi yapılırken, diğer yarısında yıkama işlemi yapılmadı. Adezyon kuyucuklarında yıkama işlemi 3 kez PBS ile gerçekleştirildi. Yıkanan ve yıkanmayan kuyucuklara taze 100 µl besiyeri ve 50 µl XTT solüsyonu eklenerek ELISA cihazında 450nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçüm sonuçları formülde yerine konarak adezyon belirlendi. Deneyler 3 kez tekrarlandı. Formül: 1- [(yıkanmamış kuyucuk absorbansı-yıkanmış kuyucuk)/yıkanmamış kuyucuk)]

2.5 RNA izolasyonu

Üzüm ekstresi uygulamasından 24 saat sonra tripsinize edilen hücrelerden RNA izolasyonu ticari kit (Bio Basic, Markham, Kanada) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örneklerinin miktarları spektrofotometrik olarak mikroplate okuyucu cihazda (Thermo Scientific Drop Plate, USA) 260 nm'de ölçülerek belirlendi. Absorbans 260 ve 280 nm'de yapılan ölçüm oranı (A260/280) ~1,8-2 arasında olan RNA'lar saf olarak kabul edildi. RNA miktarları belirlenen örnekler cDNA sentezi gerçekleştirilene kadar -80°C'de saklandı.

2.6 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

MMP-9 gen ekspresyon seviyesini belirlemek üzere izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi (OneScript Plus cDNA Synthesis, Applied Biological Materials, Kanada) gerçekleştirildi. Kit içeriğinde yer alan OneScript® Plus revers transkriptaz (200 U/µl), 5X RT Buffer, dNTP (10 mM), Random (10 µM) primer, RNaseOFF Ribonükleaz Inhibitör (40 U/µl) ve nükleazsız su ile oluşturulan reaksiyon karışımına 200 ng RNA eklendi. cDNA sentezi PCR cihazında (Techne Prime termal cycler, UK); 25°C 10 dk., 42°C 50 dk. ve 85°C 5 dk.'da inkübe edilerek, gerçekleştirildi. cDNA sentezi sonrasında örnekler qRT-PCR işlemine kadar -20°C'de saklandı.

2.7 Real-time PCR (qRT-PCR) analizi

Hücrelerde MMP-9 ekspresyonu, cDNA'lar aracılığı ile qRT-PCR (MIC qPCR, Bio Molecular Systems, Avustralya) cihazı kullanılarak belirlendi. Revers transkriptaz reaksiyon ürünü cDNA'lar, PCR Master Miks (TagMan® Gen Ekspresyon Master Miks), MMP-9 genine özgü primer-prob seti (TagMan® Gene Expression Assay (20X)) ve nükleazsız su içeren reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı 2 dk 50°C, 10 dk 95°C'de inkübe edildikten sonra, 15 sn 95°C, 60 sn 60°C (40 döngü) olacak şekilde okutuldu. MMP-9 (Hs01548727_m1, Applied Biosystems) hedef gen ekspresyonu, 18S RNA (Hs99999901_s1, Applied Biosystems) housekeeping gen ile normalize edildi. qRT-PCR'da her bir örnek için 3'er kuyucukta okuma yapıldı. Gen ekspresyon seviyeleri, Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct\ gen\ -\ Ct\ housekeeping\ gen)}$ formülüne göre hesaplandı [19]. Üzüm ekstraktı uygulanmayan kontrol grubu kalibratör olarak belirlendi ve bu gruba göre gen ekspresyon seviyesi kat değişimi hesaplandı. qRT-PCR'da yapılan her okumada cDNA kalıbı içermeyen kontrol grubu (no template control, NTC) okundu.

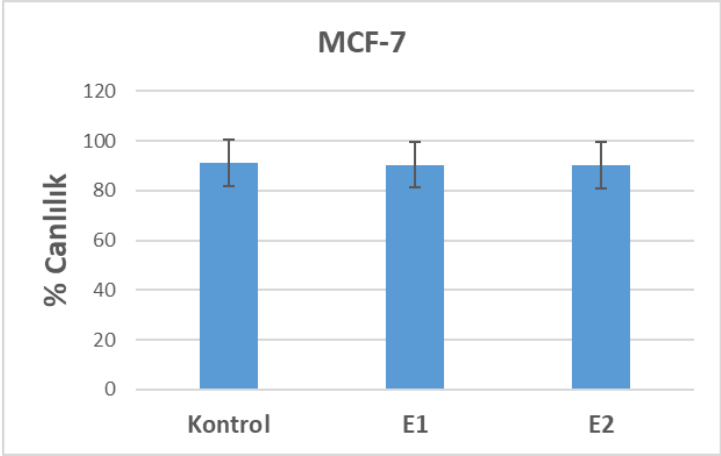
2.8 İstatistiksel Analiz

Tüm değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk normalite testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenler tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile karşılaştırıldı. Varyanslar homojen olduğu için çoklu karşılaştırmalar Tukey testi ile yapıldı. $p<0.05$ değeri anlamlılık düzeyi olarak belirlendi ve tüm analizler IBM SPSS Statistics 21 programı kullanılarak yapıldı.

3. Bulgular

1. *Hücre canlılığı*

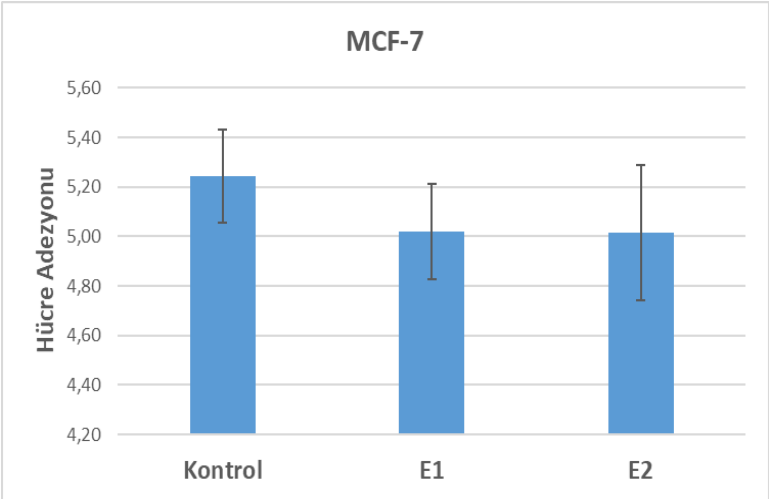
MCF-7 hücrelerine üzüm ekstresi belirli konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra hücre canlılık yüzdeleri değerlendirildi. Hücre canlılığının E1 (90,2840±9,17067) ve E2 (90,318±9,31702) konsantrasyonlarında kontrol grubuna (91,2860±9,29825) göre azaldığı bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (sırasıyla p=0,984; p=0,985) (Şekil 1).



Şekil 1. Üzüm ektresi uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre canlılık yüzdesi

2. *Hücre adezyonu*

Üzüm ekstresinin adezyona etkisi değerlendirildiğinde, MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna göre adezyonun istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalmaya neden olduğu bulundu (sırasıyla p=0,134; p=0,120) (Şekil 3).



Şekil 2. Üzüm ektresi uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre adezyonu

2. *MMP-9 gen ekspresyonu*

MCF-7 hücrelerine üzüm ekstresi uygulandıktan sonra MMP-9 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı belirlendi. Bu azalmanın kontrol grubuna göre E1 konsantrasyonu uygulanan grupta 0,81 kat, E2 konsantrasyonu uygulanan grupta -0,22 kat olduğu bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. MMP-9 Gen Ekspresyonu Kat Değişimi

Gen Ekspresyonu	**Kontrol**	**E1**	**E2**
MMP-9	1	0,81	-0,22

4. Sonuçlar ve tartışma

Tümör metastazı meme kanseri mortalitesinin başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan polifenollerin; antioksidan aktivite gösterme, gen ekspresyonunu düzenlenme, hücre döngüsünü durdurma, apoptozu uyarma, bağışıklık sistemini düzenleme, anti-invaziv

ve anti-metastatik yeteneklere sahip olduğunu göstermiştir [20]. Polifenollerin başlattığı hücresel yolakların meme dokusundaki kanserojen süreçleri geciktirebileceği ve azaltabileceği yapılan araştırmalarda önerilmektedir [21,22]. Bu araştırmalardan birinde; polifenollerce zengin Euphorbia supina ekstraktının metastatik meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinde TNF-α aracılı VCAM-1 ekspresyonunu etkili bir şekilde azalttığı, MMP-9 aktivasyonun ve hücre invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu ekstraktın normal hücrelerde minimal sitotoksisite göstermesi nedeniyle kanser metastazına karşı terapötik bir ajan olarak kullanılması önerilmiştir [23]. Başka bir çalışmada Artemisia annua L., bitkisinden elde edilen polifenollerin MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-metastatik etkileri araştırıldığında, MDA-MB-231 hücrelerinin endotel hücrelere adezyonunu VCAM-1 ekspresyonunun azaltarak inhibe ettiği, MMP-2 ve MMP-9 inhibisyonuyla hücre invazyonunu inhibe ettiği bulunmuştur [24].

Üzüm çekirdeği ekstraktları, antioksidan kapasitesi yüksek, kemopreventif ve antikanser özelliklere sahip olduğu bilinen zengin bir polifenol kaynağıdır. Moleküler etki mekanizmalarının tamamı tam olarak bilinmemekle birlikte, üzüm çekirdeği ekstresi aromataz/östrojen biyosentezini baskılaması nedeniyle meme kanserine karşı kemopreventif ajan olarak kabul edilmiştir [23,24]. Üzümün ana bileşenlerinden biri olan resveratrolün, anti-invaziv mekanizmaya olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, MCF-7 meme kanser hücre dizilerine, resveratrolün 2, 5 ve 10 μM konsantrasyonları uygulanmıştır. Araştırmada resveratrolün insan meme kanseri hücrelerinin invazyonuna ve MMP-9 ekspresyonuna olan inhibe edici etkisinin kısmen MAPK/ERK sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir [25]**.** Üzüm çekirdeği ekstraktının MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde uygulandığı bir başka çalışmada, düşük konsantrasyonların MMP-9 ve MMP-2 aktivitesini düşürerek hücre migrasyonu ve invazyonunu azalttığı gösterilmiştir [26]**.** Üzüm çekirdeği ekstresi fenolik fraksiyonun, uygun konsantrasyonlarda MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği bildirilen bir çalışmada, üzüm çekirdeği ekstresi'nin MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkisinin polifenol konsantrasyonuna ve tedavi süresine bağlı olduğu belirtilmiştir [27].

Çalışmamızda, MCF-7 hücrelerine siyah üzüm ekstresi uygulandıktan sonra hücre canlılık yüzdeleri ve hücre adezyonu değerlendirilmiştir. Siyah üzüm ekstresinin, MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna göre hücre canlılığı ve adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu ön sonuçlar, meme kanseri hücrelerinde uyguladığımız siyah üzüm ekstresinin anti-kanser etkili bitkisel destek olarak kullanılabilmesi açısından umut verici görünmektedir. Farklı doz, konsantrasyon ve maruz kalma süresi ile yapılacak ileri çalışmalar siyah üzüm ekstresinin meme kanseri üzerindeki etkisini aydınlatmada yol gösterici olacaktır.

İnsan meme kanseri hücrelerinde MMP-9 gen ekspresyonunun sağlıklı hücrelere göre arttığı farklı çalışmalarla gösterilmiştir [8–13]. Üzüm çekirdeği esktraktı uygulanan MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde düşük konsantrasyonların MMP-9 ve MMP-2 aktivitesini azaltarak, hücre migrasyonu ve invazyonunu azaltığı gösterilmiştir [24]. Bu çalışmalar meme kanserinde polifenolik bileşiklerle MMP-9 ekspresyonunu etkileyerek, invazyon ve metastazı engellenebileceği fikrini destekler niteliktedir. Çalışmamızda, siyah üzüm ekstresinin MCF-7 hücrelerinde MMP-9 gen ekspresyonunun azalttığı belirlenmiştir. Bu sonuç, siyah üzüm ekstresinin meme kanseri hücrelerindeki metastatik süreci yavaşlatabileceğini düşündürmektir.

Polifenoller gibi doğal kanser önleyici ajanların, bazı karsinogenez yolakları bloke ederek kanserin oluşmasını ve yayılmasını önleyebileceği fikri yapılan araştırmalarla her geçen gün daha da desteklenmektedir. Yapılan in vitro araştırmalarının sonuçlarının yorumlanması ve klinik uygulamasının netleştirilebilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu sayede diyetle alınan polifenollerin, prognozu iyileştirmek için mevcut tıbbi tedavi seçeneklerini desteklemesi mümkün olacaktır.

Kaynaklar

[1] Kleiner, D. E., & Stetler-Stevenson, W. G. (1999). Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 43(1), S42–S51.

[2] Klein, T., & Bischoff, R. (2011). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*, 41(2), 271–290.

[3] Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), 562–573.

[4] Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52–67.

[5] Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS Journal*, 278(1), 16–27.

[6] Huang, H. (2018). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances. *Sensors*, 18(10), 3249.

[7] Mehner, C., Hockla, A., Miller, E., Ran, S., Radisky, D. C., & Radisky, E. S. (2014). Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 5(9), 2736.

[8] Pellikainen, J. M., Ropponen, K. M., Kataja, V. V, Kellokoski, J. K., Eskelinen, M. J., & Kosma, V.-M. (2004). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clinical Cancer Research*, 10(22), 7621–7628.

[9] Vizoso, F. J., Gonzalez, L. O., Corte, M. D., Rodriguez, J. C., Vazquez, J., Lamelas, M. L., … Garcia-Muniz, J. L. (2007). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 96(6), 903.

[10] Yousef, E. M., Tahir, M. R., St-Pierre, Y., & Gaboury, L. A. (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer*, 14(1), 609.

[11] Cao, D., Polyak, K., Halushka, M. K., Nassar, H., Kouprina, N., Iacobuzio-Donahue, C., … De Marzo, A. (2008). Serial analysis of gene expression of lobular carcinoma in situ identifies down regulation of claudin 4 and overexpression of matrix metalloproteinase 9. *Breast Cancer Research*, 10(5), R91.

[12] Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2009). Distinct patterns of matrix metalloproteinase-2 and-9 expression in normal human cell lines. *Oncology Reports*, 21(3), 821–826.

[13] Li, H., Qiu, Z., Li, F., & Wang, C. (2017). The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncology Letters*, 14(5), 5865–5870.

[14] Hao, L., Zhang, C., Qiu, Y., Wang, L., Luo, Y., Jin, M., … Zhang, Y. (2007). Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Letters*, 253(1), 34–42.

[15] Wu, Z., Wu, Q., Yang, J., Wang, H., Ding, X., Yang, F., & Xu, X. (2008). Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 122(9), 2050–2056.

[16] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.

[17] Enoant. http://www.enoant.com.tr/

[18] Senel, S. N., Erdem, T. L., Ozcan, I., Uslu, E., & Oguz, N. (2018). Increase of free radical levels in the periodontal tissues of therapeutic dose radiation applied rats and potential protective effects of bioflavonoids and polyphenols (ENOANT®). *Indian Journal of Animal Research*, 52(12).

[19] Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101.

[20] Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S–3485S.

[21] Varinska, L., Gal, P., Mojzisova, G., Mirossay, L., & Mojzis, J. (2015). Soy and breast cancer: focus on angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 11728–11749.

[22] Yang, C. S., Lambert, J. D., & Sang, S. (2009). Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Archives of Toxicology*, 83(1), 11–21.

[23] Ko, Y. S., Lee, W. S., Joo, Y. N., Choi, Y. H., Kim, G. S., Jung, J.-M., … Kim, H. J. (2015). Polyphenol mixtures of Euphorbia supina the inhibit invasion and metastasis of highly metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells. *Oncology Reports*, 34(6), 3035–3042.

[24] Ko, Y. S., Lee, W. S., Panchanathan, R., Joo, Y. N., Choi, Y. H., Kim, G. S., … Kim, H. J. (2016). Polyphenols from artemisia annua L inhibit adhesion and EMT of highly metastatic breast cancer cells MDA-MB-231. *Phytotherapy Research*, 30(7), 1180–1188.

[25] Tang, F.-Y., Chiang, E.-P. I., & Sun, Y.-C. (2008). Resveratrol inhibits heregulin-β1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and cell invasion in human breast cancer cells. The Journal of Nutritional Biochemistry, 19(5), 287–294.

[26] Dinicola, S., Pasqualato, A., Cucina, A., Coluccia, P., Ferranti, F., Canipari, R., … Ricci, G. (2014). Grape seed extract suppresses MDA-MB231 breast cancer cell migration and invasion. *European Journal of Nutrition*, 53(2), 421–431.

[27] Leone, A., Longo, C., Gerardi, C., & Trosko, J. E. (2019). Pro-apoptotic effect of grape seed extract on MCF-7 involves transient increase of gap junction intercellular communication and Cx43 up-regulation: A mechanism of chemoprevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3244.