

**KARRAGENANIN İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**EXAMINATION OF CYTOTOXIC EFFECT OF
CARRAGEENAN IN HUMAN BREAST CANCER CELL
LINES**

MERVE SAYIN

DOÇ.DR. ÖZER AYLİN GÜRPINAR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

KARRAGENANIN İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Merve SAYIN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR

Nisan 2021, 99 sayfa

Bu tez çalışmasında, karragenanın belirlenen dozlarda MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3 meme kanseri hücre hatları ve sağlıklı meme epitel hücre hattı olan SVCT üzerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Karragenan, deniz yosunlarından elde edilen, galaktoz ve anhidrogalaktoz alt birimlerinin glikozidik bağlar ile birleşmesinden oluşan, sülfatlanmış polisakkarit yapısında büyük molekül ağırlıklı bir moleküldür. Karragenanlar gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakla beraber, son yıllarda farmasötik ve medikal amaçlı kullanımları da yaygınlaşmaktadır. Yapılan çalışmalar, karragenanın, immünomodülatör, antikoagulant, antitrombotik, antiviral ve anti-tümöral etkilerinin de olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, karragenanın olası anti- tümöral etkilerinin incelenmesi için *in vitro* modelde bir sitotoksisite çalışması yapılmıştır. Hücre canlılığı, (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) MTT yöntemi ile test edilmiş; akridin orange/proidium iodide (AO/PI) boyama yöntemi ile ölü ve canlı hücreleri florasan boyama yöntemi ile incelenmiştir.

Tez çalışmasında L929 fare fibroblast hücreleri 96-kuyucuklu kültür kaplarında altı tekrarlı olacak şekilde inkübe edilerek, belirlenen dozlarda (I. Dilüsyon: 1000 µg/ml, II. Dilüsyon: 250 µg/ml, III. Dilüsyon: 62.5 µg/ml, IV. Dilüsyon: 15.62 µg/ml ve V. Dilüsyon: 3.90 µg/ml) besi ortamı içinde hazırlanan karragenan, MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3 ve sağlıklı meme epitel hücre hattı olan SVCT ile inkübe edilmiştir. Karragenan uygulanmayan grup kontrol olarak belirlenmiş; inkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde MTT analizi ve AO/PI boyamaları yapılmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlarda karragenanın yüksek dozlarda sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir ve bu hücrelerde apoptotik hücre ölümüne doğru bir etki gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, karragenanın kanser oluşumu ve ilerlemesinin önlenmesi için terapilerde güvenli, daha az toksik bir madde olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir. Ancak bu konuda kuşkusuz *in vitro* ve *in vivo* çalışmanın yapılması gerektiği açıktır. Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen meme kanseri için kullanılabilirliğinin araştırılmasında *in vitro* basamak olarak ilk adımı oluşturacağı düşünülmektedir. Klinik açıdan kullanılabilmesi için *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karragenan, Meme Kanseri, Sitotoksite, MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3, SVCT Hücre hattı.

ABSTRACT

EXAMINATION of CYTOTOXIC EFFECT of CARRAGEENAN in HUMAN BREAST CANCER CELL LINES

Merve SAYIN

Master, Department of BIOLOGY

Supervisor: Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR

April 2021, 99 pages

In this thesis stage, the dose and time dependent cytotoxic effects of carrageenan on MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3 breast cancer cell lines and healthy breast epithelial cell line SVCT were investigated.

Carregenar is a sulfated polysaccharide molecule of high molecular weight, which is formed from the combination of galactose and anhydrogalactose subunits with glycosidic bonds obtained from seaweeds. Although carrageenans are widely used in the food industry, their use for pharmaceutical and medical purposes has become widespread in recent years. Studies have shown that carregenar also has immunomodulatory, anticoagulant, antithrombotic, antiviral and anti-tumoral effects.

Cytotoxicity in cells (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT test; dead and viable cells were determined by acridine orange / propidium iodide

(AO / PI) staining. The concentrations determined for application to the cells in the experiment were added to the wells with 200 µl of prepared stock solution and DMEM F-12 media. The cell lines used were prepared as carrageenan concentrations and control groups.

Carrageenan was not administered to the control group. Carrageenan MCF-7, MDAMB-231, SKBR-3 breast cancer cell lines and healthy breast epithelial cell line SVCT cells 1000 µg / ml, 250 µg / ml, 62.5µg / ml, 15.62 µg / ml, 3.90 µg / ml and DMEM F- 12 medium were applied to the control group and incubated for 24, 48 and 72 hours.

In our results, it has been shown that carrageenan has a cytotoxic effect at high doses, and it has been found that it has a direct effect on apoptotic cell death in these cells. However, it is obvious that *in vitro* and *in vivo* studies need to be done on this subject. Based on these results, it can be concluded that carrageenan is a safe, less toxic substance in therapies to prevent cancer formation and progression. It is thought to constitute the first step in the investigation of its usability for breast cancer, which is common in the world and in our country, as an *in vitro* step. In order to be used clinically, it must be supported by *in vivo* and *in vitro* studies.

Keywords: Carrageenan, Breast Cancer, Cytotoxicity, MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3, SVCT cell line

TEŞEKKÜR

Lisans dönemi ve tüm tez çalışmam boyunca bana yol gösteren, engin bilgi birikimiyle ufkumu genişleten, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, sevgili ve çok değerli hocam **Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar**'a bu zor ve yoğun dönemde benden sevgisini ve desteğini esirgemediği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans döneminde de olduğu gibi bana kapılarını sonsuza kadar açan ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen hocam **Prof. Dr. Mehmet Ali Onur**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde büyük emeği olan, beni sürekli motive eden, sorularımı asla cevapsız bırakmayan ve her zaman yanımda olan **Dr. Öğr. Üyesi Handan Sevim, Dr. Öğr. Üyesi Esin Akbay Çetin, Araş. Gör. Dr. Hanife Tanır Dönmez, Araş. Gör. Özbeyen Atalay**'a ve Hocam Uzman **Remma Pamir Gülsoy**'a teşekkürlerimi sunarım.

Dostluğu, samimiyeti, güleryüzü ve desteği ile her zaman yanımda olan **Melis Sesli Danacı, Eymen Ece Gezer** ve **Hayriye Mahim**'e çalışmalarına katkılarından ve her zaman benim yanımda olup her konuda bana destek olan sevgili arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bugünlere gelmemde büyük emeği olan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim ve kızları olmaktan gurur duyduğum babam **Tahsin Sayın**, annem **Fatma Sayın**, kardeşim **Tuğçe Sayın**, biricik teyzem **Ayşe Büyükgüzel**, dedem **Nazmi Büyükgüzel**, teyzem **Sevim Gürbüz**, eniştem **Kemal Gürbüz** ve aramızda şu an olmayan ama her zaman yanımda olduğunu ve beni gördüğünü bildiğim rahmetli anneannem **Sevinç Büyükgüzel**'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser.....	2
2.2. Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler	4
2.2.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Çevresel ve Fiziksel Faktörler	4
2.2.1.1. Ultraviyole Işınlardan Etkisi	4
2.2.1.2. Radyasyonun Etkisi.....	4
2.2.1.3. Sigaranın Etkisi	4
2.2.1.4. Alkolün Etkisi	4
2.2.1.5. Kimyasal Karsinogenlerin Etkisi	4
2.2.1.6. Virüsün Etkisi	5
2.2.2. Kanser Oluşumuna Etki Eden Genetik Faktörler	5
2.2.2.1. Protoonkogenler ve Onkogenler.....	5
2.2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	7
2.2.2.3. DNA Onarım ve Apoptoz Genleri	7
2.3. Meme Kanseri.....	9
2.3.1. Meme Kanseri Tipleri	10
2.3.1.1. Luminal A Meme Kanseri	10
2.3.1.2. Luminal B Meme Kanseri	11

2.3.1.3. Bazal Benzeri Meme Kanseri	11
2.3.1.4. HER2 Tip Meme Kanseri	11
2.4. Meme Kanseri Hücre Hatları	12
2.4.1. MCF-7 Hücre Hattı.....	12
2.4.2. SKBR-3 Hücre Hattı.....	13
2.4.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı.....	14
2.4.4. SVCT Hücre Hattı	14
2.5. Karragenan.....	15
2.5.1. Karragenan Tipleri	16
2.5.2. Karragenanın Kullanım Alanları	17
2.5.3. Karragenanın Biyolojik Fonksiyonları	18
2.5.3.1. Antikoagülan ve Antitrombotik Etki	18
2.5.3.2. Antiviral Etki	19
2.5.3.3. İmmünomodülatör Etki.....	20
2.5.3.4. Antioksidan Etki	20
2.5.3.5. Anti-tümörojenik Etki ve <i>in vitro</i> Çalışmalar	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	22
3.1. Hücrelerin Kültürü	22
3.2. Karragenan Konsantrasyonlarının Hazırlanması ve Hücreler ile Muamele	25
3.3. Hücre Canlılığının İncelenmesi.....	27
3.3.1.MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Testi.....	27
3.3.2. Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi	28
3.4. İstatiksel Analiz.....	28
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	29
4.1. Hücre Canlılığının İncelenmesi.....	29
4.1.1. MTT Testi.....	29
4.1.2. Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi.....	33
4.1.2.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattının Morfolojik Olarak İncelenmesi	33

4.1.2.2. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattının Morfolojik Olarak İncelenmesi	37
4.1.2.3. SKBR-3 Meme Kanseri Hücre Hattının Morfolojik Olarak İncelenmesi	41
4.1.2.4. SVCT Meme Epitel Hücre Hattının Morfolojik Olarak İncelenmesi	45
5. KAYNAKLAR	55
EKLER.....	61
EK 1 – Tez Çalışması Orijinallik Raporu	61
ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. a. Sağlıklı doku, b. Çevreye yayılmış kanserli doku	2
Şekil 2.2. Kanser hücrelerinin bulundukları yerden kan ve lenf damarları yoluyla vücuttaki diğer dokulara giderek yeni tümörler oluşturması	3
Şekil 2.2.2.1 Ras geninin mekanizması	6
Şekil 2.5. Karragenan molekülünün yapısı	16
Şekil 2.5.1 Karragenan tipleri	17
Şekil 3.1. Hücre hatlarının 75 cm ² 'lik flasklara ekimi	23
Şekil 3.2. MCF-7 meme kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü.....	23
Şekil 3.3. SKBR-3 meme kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü	24
Şekil 3.4. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü	24
Şekil 3.5. SVCT sağlıklı meme epitel hücre hattının morfolojik görüntüsü	25
Şekil 3.6. Karragenanın hücre hatlarına uygulanması	26
Şekil 4.1.2.1. 24. saatte MCF-7 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	34
Şekil 4.1.2.2. 48. saatte MCF-7 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	35
Şekil 4.1.2.3. 72. saatte MCF-7 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	36
Şekil 4.1.2.4. 24. saatte MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri.....	38
Şekil 4.1.2.5. 48. saatte MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	39
Şekil 4.1.2.6. 72. saatte MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri.....	40
Şekil 4.1.2.7. 24. saatte SKBR-3 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	42
Şekil 4.1.2.8. 48. saatte SKBR-3 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	43
Şekil 4.1.2.9. 72. saatte SKBR-3 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	44

Şekil 4.1.2.10 24.saatte SVCT sağlıklı meme epitel hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	46
Şekil 4.1.2.11. 48. saatte SVCT sağlıklı meme epitel hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	47
Şekil 4.1.2.12. 72. saatte SVCT sağlıklı meme epitel hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri	48



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.2.2.3. Bazı kalıtsal ailevi kanser sendromları	8
Çizelge 2.3.1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması	10
Çizelge 3.1. Hücre hatları için kullanılan besi yerleri	22
Çizelge 3.2. Karragenan konsantrasyonları	26
Çizelge 4.1.1. 24. saatte karragenanın hücre hatları üzerinde hücre canlılığına etkisinin zamana ve doza bağlı değişimi	29
Çizelge 4.1.2. 48. saatte karragenanın hücre hatları üzerinde hücre canlılığına etkisinin zamana ve doza bağlı değişimi	30
Çizelge 4.1.3. 72. saatte karragenanın hücre hatları üzerinde hücre canlılığına etkisinin zamana ve doza bağlı değişimi	31
Çizelge 4.1.4. Karragenan konsantrasyonlarının zamana ve doza bağlı olarak hücre hatları üzerinde hücre canlılığına etkisinin değişimi	33
Çizelge 4.1.5. MCF-7 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama sonucu elde edilen canlı ve ölü hücre yüzdesi.....	35
Çizelge 4.1.6. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama sonucu elde edilen canlı ve ölü hücre yüzdesi.....	39
Çizelge 4.1.7. SKBR-3 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama sonucu elde edilen canlı ve ölü hücre yüzdesi.....	43
Çizelge 4.1.8. SVCT meme epitel hücrelerine ait AO/PI boyama sonucu elde edilen canlı ve ölü hücre yüzdesi.	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
cm^2	Santimetrekare
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram

Kısaltmalar

BHK-1	Baby Hamster Kidney Fibroblasts
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CK18	Sitokeratin 18
CMV	Cytomegalo Virus
DENV1	Dang virüs tip 1
DENV2	Dang virüs tip 2
DENV3	Dang virüs tip 3
DENV4	Dang virüs tip 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E2	17 β - östradiol
ER	Estrogen Receptor
Er α	Estrogen Receptor α
Er β	Estrogen Receptor β
FBS	Fetal Bovine Serum

HeLa	Serviks kanser hücre hattı
HER-2	Human epidermal growth factor receptor-2
HIV	Human immunodeficiency virus
HPV	Human papilloma virus
HSV	Herpes simplex virüs
HUVEC	İnsan umbilikal ven endotel hücre hattı
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PBS	Phosphate Buffered Saline
PR	Progesterone Receptor
PTEN	Fosfataz & tensin homolog
Rb	Retinoblastoma
SV40	Simian virüsü
TGF- β	Transforming growth factor beta
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1. GİRİŞ

Kanser, vücudun doku ve organlarındaki hücrelerinin kontrol dışı bölünüp çoğalmasıyla meydana gelen hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılmasına neden olan onkogenlerle, tümör baskılayıcı genlerin karşılıklı etkileşimi ile karakterize edilmektedir.

Dünya üzerinde her üç insandan birine, yaşamının bir döneminde kanser tanısı konulmaktadır. Kanser türleri arasında en çok ölümle sonuçlanan akciğer kanseri olup; bunu meme, prostat ve kolon kanserleri takip eder. Meme kanseri ise dünyada en yaygın ikinci, kadınlar arasında ise ilk sırada yer alan kanser türüdür.

Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan karragenan molekülü son yıllarda farmasötik ve medikal alanlarda da kullanılmaktadır. Karragenan molekülünün, özellikle kanser hücreleri üzerinde antitümöral ve anti-proliferatif etkileri araştırılmaktadır. Karragenan, deniz yosunlarından elde edilmiş, galaktoz ve anhidrogalaktoz birimlerinden oluşan, sülfatlanmış polisakkarit yapıda bir moleküldür. Ayrıca; immünomodülatör, antikoagülan, antiviral ve anti-tümöral biyolojik aktivitelere de sahip olduğu bilinmektedir. Karragenanın kolay elde edilmesi ve toksik etkisinin düşük olması son yıllarda bu özellikleri nedeniyle de kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında karragenanın MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3 meme kanseri hücre hatları ve sağlıklı meme epitel hücre hattı olan SVCT üzerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığına olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, karragenanın bu hücreler üzerinde sitotoksik etkisini göstermiştir. Bu sonuçlar ve literatürdeki çalışmalar doğrultusunda karragenanın kullanılan meme kanseri hücre hatları üzerinde anti-tümörejenik etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Ancak, bu çalışmanın yaygın etkisinin değerlendirilebilmesi için çok daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Hücresinin normal büyüme ve farklılaşmasını sağlayan mekanizmalar üzerindeki kontrolün kaybolması ve buna bağlı olarak hücrenin sınırsız bölünüp çoğalması kanser hücrelerinin şekillenmesine neden olur [1].

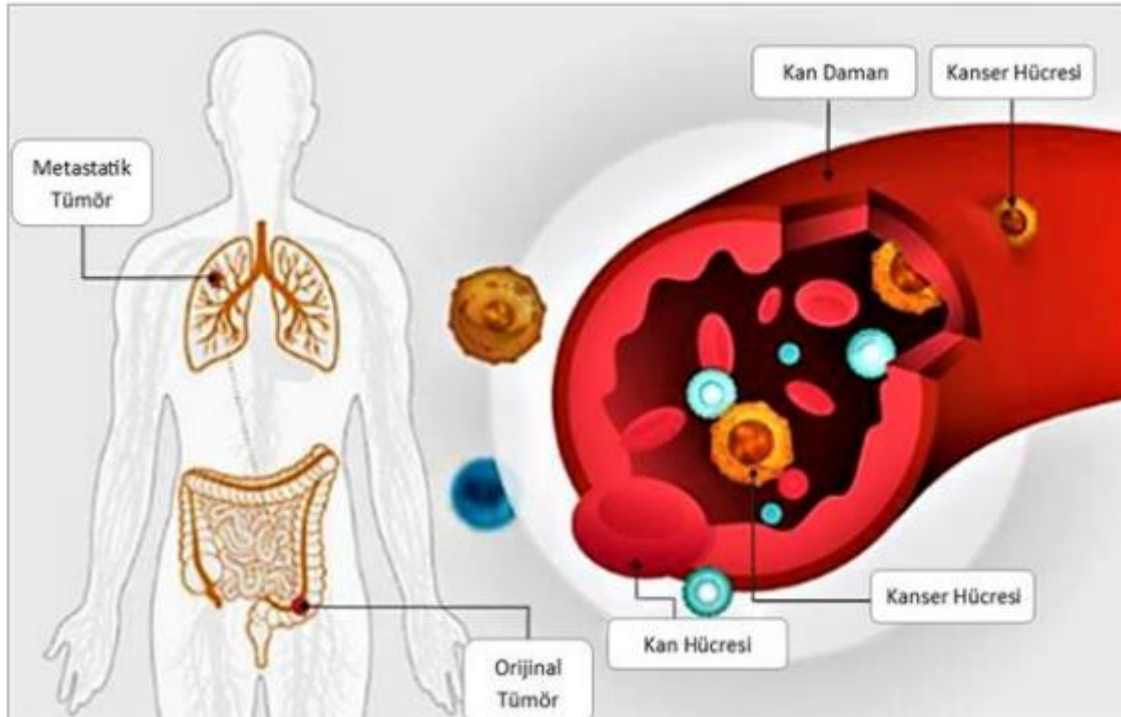
Kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayıran birçok farklılık vardır. Sağlıklı hücrelerde bölünme, büyüme ve hücre döngüsünün kontrolü hücreler arası sinyal iletimi ile düzenli bir şekilde gerçekleşir [2]. Kanserli hücreler ise hücre bölünmesi ve apoptozis olaylarındaki başlama sinyallerini bloke edip, tümör yapılarının büyümesi için gerekli olan oksijen ve besin ihtiyacının karşılanması amacıyla kan damar ağ yapıları meydana getirerek bulundukları dokuya zarar verir ve çevrelerinde bulunan sağlıklı hücreleri de olumsuz yönde etkiler [1].

Kanser hücrelerinin hücre zarı yüzeyinde bulunan karbonhidratlar da durumdan olumsuz yönde etkilenir ve moleküler yapıları bozulur [1]. Hücredeki kontrolsüz bölünmenin sonucu olarak hasar görmüş ve uzaklaştırılması gereken hücreler vücuttan uzaklaştırılamadığı için, kontrol dışı hücre bölünmesi meydana gelir ve yeni kanser hücreleri oluşur [1,2]. Oluşan kanser hücrelerinin yoğunlaşmasıyla tümör yapıları meydana gelir [1].



Şekil 2.1. a. Sağlıklı doku, b. Çevreye yayılmış kanserli doku [1]

Kanser hücrelerinin vücudun başka kısımlarına lenf ya da kan damarları yoluyla taşınıp o bölgede tümör oluşturmalarına metastaz adı verilir. Metastaz bulunduğu dokuya zarar verdiği gibi, çevre dokuları da istila edip zarar verir [3]. Metastaz sürecinde hücre-hücre ve hücre-matriks arasındaki bağlantılar çözülüp, hücre bütünlüğü bozulmaya başlamaktadır [4]. Bu olay; anjiyogenez, invazyon, hücre göçü ve proliferasyon gibi kompleks ve uzun bir süreç sonucunda meydana gelir. Kanserli hücreler ilk önce vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) molekülleri aracılığı ile anjiyogenez sağlayarak tümör hücrelerinin besin kaynağı sağlayabileceği yeni damar oluşumunu tetiklerler. Bunun sonucunda tümör hücreleri, yakınındaki çevre dokulara ya da dolaşım sistemine geçerek zarar verir [4]. Metastazın meydana gelmesinde hücre adezyon moleküllerinden integrin, laminin, kadherin ailesinin önemli modölatör etkileri vardır. Özellikle apikal-bazal hücre bütünlüğünün ve epitel hücreler arasındaki bağın bozulmasında E-kaderin miktarındaki azalma etkili olurken, N-kaderin miktarındaki artış sonucunda tümör hücreleri ekstraselüler matrikse geçip burada ilerleyerek, kanser hücrelerinin invaziv özellik kazanmasına neden olur [5].



Şekil 2.2. Kanser hücrelerinin bulundukları yerden kan ve lenf damarları yoluyla vücuttaki diğer dokulara giderek yeni tümörler oluşturmaları [1]

2.2. Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler

Kanser; hücre büyümesi, yaşlanması, ölümü sırasında meydana gelen bozulmalar, genetik değişimlerle meydana gelmesinin yanı sıra hücrelerin karsinojenlere maruz kalması sonucunda da oluşabilmektedir. Karsinogenezin temel mekanizmasında hücrede genetik hasar (mutasyon) adı verilen olay gerçekleşir. Mutasyon radyasyon, kimyasallar ve virüsler gibi eksojen kaynaklı olabilir ve germ hücreleri aracılığıyla da genetik olarak aktarılır [6]. Bunun yanı sıra kanserin meydana gelmesinde genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı bilinmektedir.

2.2.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Çevresel ve Fiziksel Faktörler

Kansere neden olan başlıca çevresel ve fiziksel faktörler ultraviyole ışınlar, radyasyon, sigara, alkol, kimyasal karsinojenler ve virüs dür.

2.2.1.1.Ultraviyole Işınlarn Etkisi: Bu ışınlar yüksek enerjiye sahip oldukları için makromolekül yapılarında iyon değişikliğine yol açarak DNA’da zincir kırıkları ve bazlarda transformasyona neden olur. Bu nedenle açık tenli insanlar güneş ışığına korunmasız bir şekilde çok fazla maruz kaldığında cilt kanseri daha fazla görülmektedir [7].

2.2.1.2. Radyasyonun Etkisi: Radyasyona maruz kalmak özellikle epitel kökenli kanser ve löseminin oluşmasına sebep olmaktadır [7].

2.2.1.3. Sigaranın Etkisi: Sigara kullanımının akciğer kanseri ile yakından ilişkili olup, mesane, pankreas, yutak kanseri riskini de arttırdığı bilinmektedir [7].

2.2.1.4. Alkolün Etkisi: Alkol kullanımı da kanser oluşumuna neden olan faktörler arasında yer almaktadır. Alkol kullanımı yutak, yemek borusu kanser riskini de artırmaktadır [7].

2.2.1.5. Kimyasal Karsinojenlerin Etkisi: İnsanların çalışma ortamlarında kanser oluşumuna neden olan çevresel faktörler arasında yerini almaktadır. Küfler (aflatoksinler), madeni yağlar, krom, benzen gibi maddelerle temas eden insanlarda kanserin oluşabileceği bildirilmiştir. Özellikle plastik sanayisinde çalışan insanların karaciğer kanseri, boya sanayisinde çalışan insanların mesane kanseri olduğu görülmektedir [7].

2.2.1.6. Virüsün Etkisi: *Helicobacter pylori*, insan papilloma virüsü (HPV), Hepatit B, T hücreli lösemi virüsü de sağlıklı hüceleri etkileyerek kansere neden olurlar [7].

2.2.2. Kanser Oluşumuna Etki Eden Genetik Faktörler

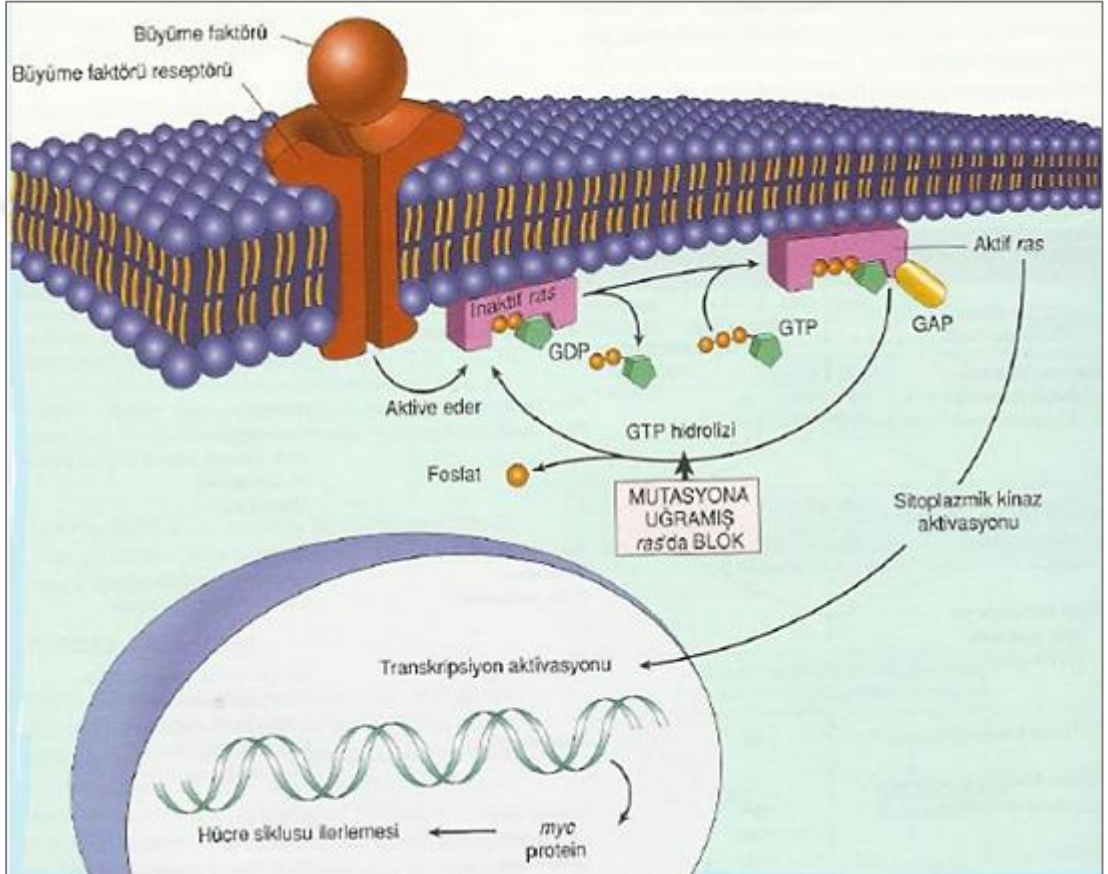
Hücre bölünmesi ve kontrolü, genlerin kontrolü ile gerçekleştirildiğinden kanser genlerle ilişkili kompleks bir hastalıktır. Genlerde meydana gelen bir hasar sonucunda DNA onarım sistemi genin kaybettiği işlevini tekrar kazandırmaya çalışsa da bu her zaman mümkün olmamaktadır [8]. Bunun sonucunda da gen ürünü olan proteinlerin hatalı ya da eksik üretilmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri kanser sürecinde etkilidir. [9].

2.2.2.1. Protoonkogenler ve Onkogenler: Hücrelerdeki büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz olaylarındaki sinyal mekanizmalarında yer alıp, protein sentezinden görevli olan genler protoonkogenlerdir. Protoonkogenler ve onkogenler transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve büyüme faktörlerinin reseptörlerinin sentezini gerçekleştirir [10]. Hücre iletim yollarında *sis*, *ras*, *erb-B1*, *erb-B2*, *hst-1*, *cyclin D* vb. proteinlerin kodlamasını yapan protoonkogenlerin mutasyonu sonucunda; hücre zarı ve çekirdek arasının kontrolsüz bir şekilde uyarılması, hücre bölünmesinin kontrolünü kaybetmesi, büyüme faktörlerinin aşırı üretilmesi gibi olaylar meydana gelir [11].

Protoonkogenlerin onkogen formuna dönüşmesi kanser hücrelerinin bölünme mekanizmalarını bozarak kontrolsüz çoğalıp bölünmelerine neden olmaktadır. Onkogenezin aktivasyonu sonucunda hücrede yer alan büyüme ve farklılaşmayı sağlayan enzimlerde mutasyon oluşur [10]. *Bcl-2 ailesi*, *Ras*, *Rb*, *Raf* ve *p53* bilinen onkogenler arasında yer almaktadır. Kanser molekül yapısının incelenmesinde onkogenler ve tümör baskılayıcı genler önemli bir rol oynamıştır [12].

Myc geni insan tümörlerinde en çok bulunan gen olup sinyali aldığı zaman hücrelerin hızlı bir şekilde bölünmesine neden olur. Hücre döngüsü başlamadan önce normal *myc* geni bazal membrana yakın bir şekilde dururken onkogenik *myc* geni ise aşırı uyarılmasından dolayı devamlı proliferasyon görülür [10].

Ras geni mutasyonu insan tümörlerinde en çok görülen onkogen anomalisidir. Normalde aktif olmayan formda bulunan *ras* proteini GDP'ye bağlanır ve hücre büyüme faktörleri tarafından sinyal iletimi gerçekleştiğinde GDP formu GTP'ye dönüşür [11]. Aktif hale gelen *ras* proteini proliferasyon düzenleyicileri başta olmak üzere, sitoplazmik kinazları da etkileyerek hücrenin çoğalması için uyarı alır. GTPaz aktivitesi sonucunda aktif olan GTP formu hidroliz ile inaktif formuna dönüşür [11].



Şekil 2.2.2.1 *ras* geninin mekanizması [11]

İlk olarak hücre büyüme faktörü reseptörü aracılığıyla uyarılır. İnaktif formda bulunan GDP bağlı *ras* geni GTP molekülünün bağlanması ile aktif forma dönüşür. Bu aktif form *ras* 1 yapısını uyarıp, MAP-kinaz yolunun aktifleştirilmesini gerçekleştirir. Bunun sonucunda mutasyona uğramış olan *ras* proteini GTP formunun devamlı olarak hidroliz olmasına yol açar [11].

2.2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Kanser mekanizmasının aydınlatılmasında onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin önemli bir rolü vardır. Mutasyona uğramış genlerin bulunduğu yerin belirlenmesi ve onkogeneizde tümör baskılayıcı genlerin önemi büyüktür. Esas görevi hücre bölünmesinde baskılayıcı proteinlerin sentezini yapan tümör baskılayıcı genler aynı zamanda hücrede büyüme inhibitör mekanizmasındaki genlerin de sentezinden sorumludur. Bu genlerde mutasyon olması halinde tümör yapıları oluşur [13].

Hücre büyümesinin baskılanmasını engelleyen *pRB*, *p21* veya *p53* proteinleri kodlayan genlerin her iki kopyasında mutasyon oluşması sonucunda tümör yapıları meydana gelir. Kalıtsal kanserlerde ilk defa tümör suppressor genler hakkında bilgi verilmiştir. *Retinoblastoma (Rb)* geni, kanser baskılayıcı gen özelliğinde ilk belirlenen genidir. Heterozigot olan Rb loküsünde hücre normaldir. Bu heterozigot yapısının kaybolması sonucunda kanser meydana gelir ve bu genler kanser genleri olarak adlandırılır. Kişide kötü huylu tümör gelişimin sebep olan şey, mutant *p53* alelinin kalıtım yoluyla geçmesidir. Çekirdekteki DNA hasarında ilk olarak *p53* geni etkili olur [11,14].

2.2.2.3. DNA Onarım ve Apoptoz Genleri

Protoonkogenler, tümör baskılayıcı genleri ve apoptoz genleri DNA'daki hasarları onararak hücre proliferasyonunu etkilemektedir. Kalıtsal olarak DNA onarım genlerinde mutasyon olan bireylerde kanser olma riski daha yüksektir. İki protein gen ailesi hücredeki apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu gen aileleri kaspazlar; kaspaz-8, 9, 3 ve kaspaz aktivasyonunu düzenleyen *Bcl-2* gen ailesidir [14].

Kanserin kalıtsal yol ile meydana gelme olasılığı çevresel ve fiziksel faktörlere kıyasla daha düşüktür [15]. İnsanlarda bazı hastalıkların genler ile ilişkili olup olmaması hala araştırmalar arasında yer almaktadır [16]. Örneğin yumurtalık ve meme kanserinde kanserin kalıtsal yol ile aktarılabileceğine dair *BRCA1* ve *BRCA2* genleri belirlenmiştir [16]. Retinoblastoma ve Wilm tümörleri de genetik olarak aktarılır [15]. Aynı zamanda kalın bağırsakta meydana gelen polip oluşumları da kolon kanseri oluşumunda etkili olup genetik yatkınlıkla yakından ilişkilidir [16].

Sendrom ismi	Gen	Kromozom-Yerleşim	Predominant Kanseri
Otozomal Dominant Sendromlar			
Ailevi meme- over	BRCA1	17q21	Meme, over, kolon
	BRCA2	13q12	Meme, over, prostat
Retinoblastoma	Rb	1q14	Retinoblastom, sarkomlar
Familial polipozis Koli	APC	5q21	Kolorektal, troid
Li-Fraumeni	P53	17q13	Meme, beyin, mide, sarkomlar
Wilms Tümör	WT1	11p13	Böbrek
MEN2	<i>ret</i>	10q11	Troid, feokromasitom
MEN1		11q13	Adrenal, pankreas adacık
HNPCC (Herediter-non polipozis kolorektal kanser)	hMSH2	2p16	En çok kolorektal, endometrium over, hepatobiller, ureteropelvik beyin, deri hMSH2 ve hMLH1 için ilaveten deri ekleri
Cowden Sendromu	PTEN	10q23	Hamartoma+endometrium meme troid
Von Hippel Lindau	VHL	3p25	vasküler, böbrek-RCC
Otozomal Resesif, DNA Tamir Defekti ile İlgili Sendromlar			
Xeroderma Pigmentozum	XP	9q3P,19q,15p	Bazal veya skuamöz deri melanoma
Ataksi telenjektazi	ATM	11q22	Lenfoma, lösemi, karsinom
Bloom sendromu	BLM	15q26	Lenfoma, lösemi, karsinom, çocuk çağı AML, MDS
Fankoni anemisi	FANCAtoM	15 Farklı gen	
Ailevi Kanseri (Ailevi sıklık var ama kalıtsal predispozisyon henüz bilinmiyor)			
Meme			
Over			
Pankreas			

Çizelge 2.2.2.3 Bazı kalıtsal ailevi kanser sendromları [6].

2.3. Meme Kanseri

Meme kanseri, dünyadaki ikinci en yaygın ikinci kanser türü olup; kadınlarda ise en sık görülen kanser türüdür [17]. Meme kanseri çok kompleks bir hastalık olup, nokta mutasyonu, kromozom yapılarındaki değişimler ve genetik bozulmalardan kaynaklanır. Meme kanserlerinin %10'unu germ hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar oluşturur [18]. Özellikle meme kanserinde risk faktörleri arasında bulunan aile öyküsü kanserin %20'lik önemli bir kısmını oluştursa da meme kanseri ile ilgili genlerin yapıları tam olarak bilinmemektedir. Hücre döngüsünün kontrolü, DNA onarımı ve transkripsiyon olaylarında proteinlerin kodlanması *BRCA* genleri tarafından gerçekleştirilir [19]. Meme kanserinde *BRCA-1* ve *BRCA-2* genlerinde mutasyon meydana gelir. Meydana gelen mutasyonlar *BRCA-1* genine göre *BRCA-2* geninde daha fazladır. *BRCA-1* ve *BRCA-2* genlerinde meydana gelen mutasyon sonucunda over, meme ve prostat kanseri görülmektedir. Östrojen reseptörünün sinyal mekanizmasında özellikle *BRCA-1* geni önemli rol almaktadır [20].

Buna bağlı olarak progesteron reseptörü (PR), östrojen reseptörü (ER) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2) eksikliğinde *BRCA-1* geni ile ilgili tümörojenik yapılar meydana gelir. Meme epitel hücrelerinin farklılaşmasında ise *BRCA-2* geni rol alır [21]. Kan damarları, bağışıklık sistemi hücreleri, fibroblastlar ve sinyal molekülleri tümör yapısının çevresinde bulunan hücresel ortamı oluşturmaktadır [22]. Meydana gelen tümör yapıları kan damarları sayesinde beslenip, ekstrasellüler matriks tarafından da çevrelenir. Kromatin değiştirici faktörler, histon değişimleri, DNA metil transferazların etkinliğindeki değişimler tümör yapılarını etkileyerek meme kanseri hücrelerin çoğalmasına neden olur [23].

2.3.1. Meme Kanseri Tipleri

ER ve PR'nin pozitif veya negatif olması, HER-2'nin ekspresyonu meme kanserinin sınıflandırılmasında kullanılır. Meme kanseri moleküler olarak Luminal A, Luminal B, HER-2 ve bazal benzeri olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadır [24].

SINIFLANDIRMA	İMMÜNPROFİL	DİĞER ÖZELLİKLER	HÜCRE HATLARI
Luminal A	ER (+/), PR (+/), HER-2 (-)	Ki67 düşük, endokrin yanıt kemoterapiye yanıt verir.	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER (+/), PR (+/), HER-2 (+)	Ki67 yüksek, genellikle endokrin yanıt kemoterapi için değişken, HER-2 (+) trastuzumab duyarlı.	BT474, ZR-75
HER-2	ER (-), PR (-), HER- 2 (+)	Ki67 yüksek, trastuzumab duyarlı, kemoterapiye duyarlı	MDA-MB-453, SKBR-3
Bazal	ER (-), PR (+/-), HER-2 (-)	Ki67 yüksek, endokrin yanıt vermeyip genellikle kemoterapiye yanıt verir.	MDA-MB-468, SUM190

Çizelge 2.3.1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması [24]

2.3.1.1 Luminal A Meme Kanseri

ER(+), HER-2 resptörü negatif ve düşük oranda da Ki67 belirtecini ifade eden tümörler luminal A meme kanseridir. Luminal A meme kanseri %30-70 oranında en sık görülen meme kanseri tipidir [25]. Hücre proliferasyon hızı diğer alt tiplere oranla Luminal A tümöründe en düşüktür. Luminal A meme kanserlerinin tedavisi çoğunlukla hormon ile yapılmaktadır. ER'nin pozitif olması tedavi için iyi bir alternatiftir. Diğer alt tipleri arasında nüksetme oranı karşılaştırıldığı zaman en düşük oran Luminal A tümörleridir [26].

2.3.1.2 Luminal B Meme Kanseri

ER(+), Ki67 belirtecini yüksek oranda ifade eden ve HER-2 reseptörünün pozitif veya negatif özellikte olması Luminal B tümörlerini tanımlamak için kullanılır [25]. İnsanlarda görülme sıklığı açısından Luminal B tümörleri, Luminal A tümörlerine oranla daha genç yaşlarda erken teşhis edilir. Luminal B meme kanserinin görülme oranı % 10 ila % 20 arasında değişmektedir. Luminal B tümörlerinde hastalığın ilerlemesi Luminal A meme kanserlerine oranla daha hızlı olup, hastanın kurtulma oranı daha düşüktür [26].

2.3.1.3. HER-2 Tip Meme Kanseri

HER-2 molekül yapısı meme kanseri tedavi seçeneğinde kullanılmayıp, HER-2 pozitif reseptör yapısı ile aynı özelliğe sahip değildir. Bu tümörlerin yaklaşık %30'u HER-2 negatif yapıya sahip olup, çoğunluğu pozitifdir ve HER-2 tipi tümör olarak adlandırılır [27]. HER-2 tip tümör yapıları meme kanserlerinin %5-15'ini oluşturur. ER, PR'nin negatif olması ve lenf nodunun pozitif olması HER-2 tümör yapısının özelliğidir [28]. Luminal A ve Luminal B tümörlerine oranla HER-2 tümör yapıları daha erken yaşta teşhis edilir [26].

2.3.1.4. Bazal Benzeri Meme Kanseri

Üçlü negatif bazal benzeri meme kanseri ve üçlü negatif olmayan meme kanseri olarak iki gruba ayrılmaktadır. Bazal benzeri meme kanseri östrojen ve progesteron reseptörleri negatif olan kanserlerde HER-2 reseptörünün mutasyon durumuna ve BRCA genlerindeki mutasyon durumuna göre iki gruba ayrılır. HER-2 reseptörünün genetik materyalindeki çoğalma ve buna bağlı olarak genin ifade edilmesi üçlü negatif bazal benzeri meme kanserinin özelliğidir [29].

ER negatif, PR negatif, HER-2 reseptörünün negatif olması üçlü negatif meme kanserinin özelliğidir. Diğer kanser alt tiplerine oranla genç yaşta ortaya çıkıp daha dirençli bir yapıya sahiptir. Metastatik özellik gösteren dirençli bir yapıya sahip olması hedef odaklı tedaviyi zorlaştırır. Meme kanserlerinin %15-20'sini üçlü negatif meme kanseri oluşturur [29,30].

2.4. Meme Kanseri Hücre Hatları

Farklı meme kanseri türlerinden elde edilmiş hücre hatları deneysel çalışmalarda iyi birer model oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında ise MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ve sağlıklı meme epitel hücre hattı olan SVCT kullanılmıştır.

2.4.1. MCF-7 Hücre Hattı

MCF-7 hücre hattı, 1970 yılında beyaz ırktan olan bir kadının duktal karsinom dokusundan elde edilmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre hattı adını Michigan Kanser Vakfı-7'nin kısaltmasından almaktadır [31]. MCF-7 meme kanseri hücreleri 17 β -östradiol (E2)'e duyarlı hücreler olup, çoğalmak için östrojene bağlı hücrelerdir. Östrojen reseptörü alfa (ER α) ifadesi yüksek olup, östrojen reseptörü beta (ER β) ifadesi ise düşük oranda ifade edilmektedir [32]. MCF-7 meme hücreleri yüksek miktarda E2 reseptörü içermektedir. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde büyüme plazma zarına bağlı olarak bulunan büyüme faktörü reseptörleri tarafından kontrol edilmektedir. MCF-7 hücrelerinde miRNA'ların regülasyonunda insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)'in sinyal mekanizmasında önemli bir rolü vardır. Bu işlemi gerçekleştirirken de IGF-1'i aktive eden otokrin bir sistem olduğunu göstermektedir [32].

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde β -katenin, sitokeratin (CK18), E-kaderin ve Vimentin belirteçleri için pozitif özellik göstermektedir. MCF-7 meme kanseri ve hücrelerinde HER-2 geninin ifadesi normal, WNT7B onkogen yapısının ifadesi mevcuttur [31]. Epitelial bir morfolojik yapıya sahip olup, ER pozitif ve HER-2 geninin ifadesi negatiftir. Ayrıca p53, p21 genlerinin ifade edilmesi normal olup, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Bcl-2, kaspaz-6,-7,-9'un ekspresyonu normaldir [31].

MCF-7 meme kanseri hücre hattı Lüminal A meme kanseri tipidir. MCF-7 meme kanseri hücreleri noninvaziv özellik gösteren, metastatik aktivitesi de düşük olan bir hücre hattıdır [33]. Bunun yanı sıra MCF-7 meme kanseri hücrelerinin birçok farklı alt grubu ve farklı kültür koşullarına bağlı olarak genomik kararsızlık özelliği gösterir. MCF-7 hücrelerinin farklı grupları arasında RNA ekspresyon seviyeleri ve de genomik farklılıklar mevcuttur [33]. MCF-7 meme kanseri hücreleri kolay kültüre edilip, hedef bir tedavi seçeneğinde kullanıldığında ER'nin pozitif fonksiyonunu koruduğu için anti hormon tedavisinde direnç çalışmalarında tercih edilen bir modeldir. Günümüzde meme kanseri çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır [33].

F. Namvar ve ark. yaptığı çalışmada ise MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücre hatları üzerinde *Eucheuma cottonii* alg türünden elde edilen ekstrakt kullanılmıştır. Meme kanseri hücrelerinde morfolojik olarak değişiklikler gözlenmiştir. Zamana ve doza bağlı olarak MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmiştir. Özellikle MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı daha etkili olan karragenan molekülünün kanser hücresinde apoptotik morfolojik değişiklikleri (hücre büzülmesi, mikrovillus yapılarının azalması veya kaybolması) gözlenmiştir [34].

2.4.2. SKBR-3 Hücre Hattı

SKBR-3 hücre hattı; HER-2 gen yapısı aşırı ifade edilmektedir. HER-2 hedefli çalışmalarda tercih edilen hücre hattıdır. Hücre kültüründe epitelyal bir morfolojiye sahiptir. HER-2(+), ER(-) ve PR(-) yapıdadır [35].

G.Salhi ve ark. yaptığı çalışmada HeLa, SKBR-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatları üzerinde *S. coronopifolius* kırmızı alg türünün etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *S. coronopifolius*'un doza ve zamana bağlı olarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe edip, sitotoksik etki göstererek apoptoza yol açtığı ve anti-inflammatuar etki gösterdiği sonucu elde edilmiştir [36].

2.4.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı

MDA-MB-231 hücre hattı; HER-2 (-), ER(-) ve PR(-) olduğu için üçlü negatif meme kanseri sınıfına ait hücre hattıdır. Ayrıca WNT7B onkogen, EGF ifadesi yüksek olurken Ki67 belirtecinin ifadesi düşüktür [37].

M. Jazzara ve ark. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde yaptığı bir çalışmada Trypan Blue testi ile 1.0 mg/ml'lik yüksek konsantrasyonda λ -karragenan uygulanmasına rağmen hücre canlılığının %80'in üzerinde olduğu sonucu elde etmişlerdir [38]. Bu sonuçta λ -karragenan molekülünün tümör hücrelerine düşük sitotoksite gösterdiğini işaret etmektedir. Ayrıca MTT analizlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tümör hücrelerinin karragenan ile inkübasyonundan 24 saat sonra hücre çoğalmasında bir fark görülmemiş olup , 48.saatte λ -karragenan konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı bir miktar azalmıştır. Sonuç olarak λ -karragenanın *in vitro* tümör hücrelerine karşı sitotoksitesinin düşük olduğu sonucu elde edilmiştir [38].

2.4.4.SVCT Hücre Hattı

SVCT sağlıklı meme epitel hücre hattı simian virüsü 40 (SV 40) kullanılarak elde edilmiştir. SVCT hücre hattı için Keratin- 19 ifadesi için negatif olup, Keratin-7, -8 ve 18'in ifadesi için pozitifdir. Hücre kültüründe epitel özellikte olup, kubbe şeklinde görünümü vardır [39].

Katie P. ve ark. yaptığı çalışmada 0.5, 1,2,3,4,10 ve 12 J/cm² belirlenen lazer fototerapi dozlarının 780, 830 ve 904 nm dalga boylarında MCF-7, MDA-MB-435S, SVCT ve Bre80hTERT hücre hatları üzerindeki *in vitro* olarak karşılaştırılmıştır. Çalışmada tercih edilen lazer fototerapi meme kanserinin klinik tedavisinde kullanılmaktadır. Hücre hatları belirlenen dalga boylarında ışına maruz bırakılmıştır. Uygulanan lazer fototerapinin hücre hatları üzerindeki proliferatif etkisi 24 saat sonra değerlendirilmiştir. Uygulanan lazer dozlarının (0.5, 1,2,3,4,10 ve 12 J/cm²) MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu artırdığını, ancak diğer hücreler üzerinde bir etki göstermediği sonucuna ulaşılmıştır [40].

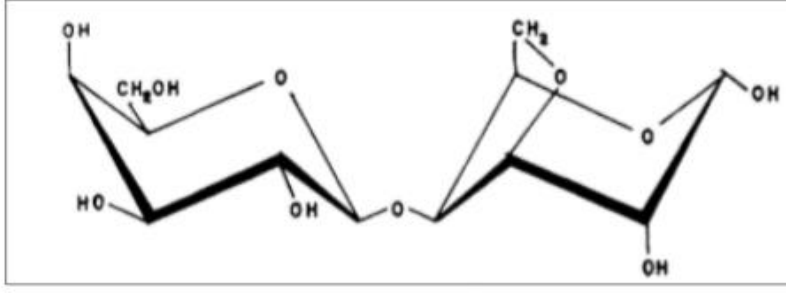
2.5. Karragenan

Karragenan molekülü kırmızı deniz alg türlerinden elde edilip, jel oluşturma özelliğine sahip polisakkarit grubunun ismidir [41]. Algler, uzun bir fosil geçmişe sahip heterojen bir bitki grubudur. Bir hücreden oluşan kolonilerde veya birçok hücreli organizmalarda gruplandırılmış klorofil içeren organizmalardır [42].

Algler 2 ana gruba ayrılmaktadır. Birincisi deniz yosunu veya makro alg olarak adlandırılır, ikincisi ise hem bentik hem de okyanus suları boyunca bulunan mikro alglerdir [42]. Algler bulundukları pigmentasyona bağlı olarak üç sınıfa ayrılmaktadır: Kırmızı algler, kahverengi algler ve yeşil algler. Sınıflar arasındaki farklılığın sebebi ise alglerin hücre duvarlarında bulunan polisakkarit miktarlarının birbirlerinden farklı olmasıdır [42].

Kırmızı deniz alglerinden elde edilen sülfatlanmış polisakkaritler, streokimyasal yapılarına göre agrenanlar ve karragenanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar [42]. Agrenanlar, L-bağlı, karragenanlar ise D-bağlı α -galaktoz redizüleri içeren polisakkarit molekülüdür. Bu polisakkaritler dönüşümlü olarak 3-bağlı- β -D-galaktopiranoz, 4-bağlı- α -D galaktopiranoz veya 3,6-anhidrogalaktoz birimlerini tekrarlayan disakkarit omurgasından oluşur. Bu yapılar; enerji kaynağı, iç matris oluşumu ve seçici katyon emilimini sağlamaktadır [42].

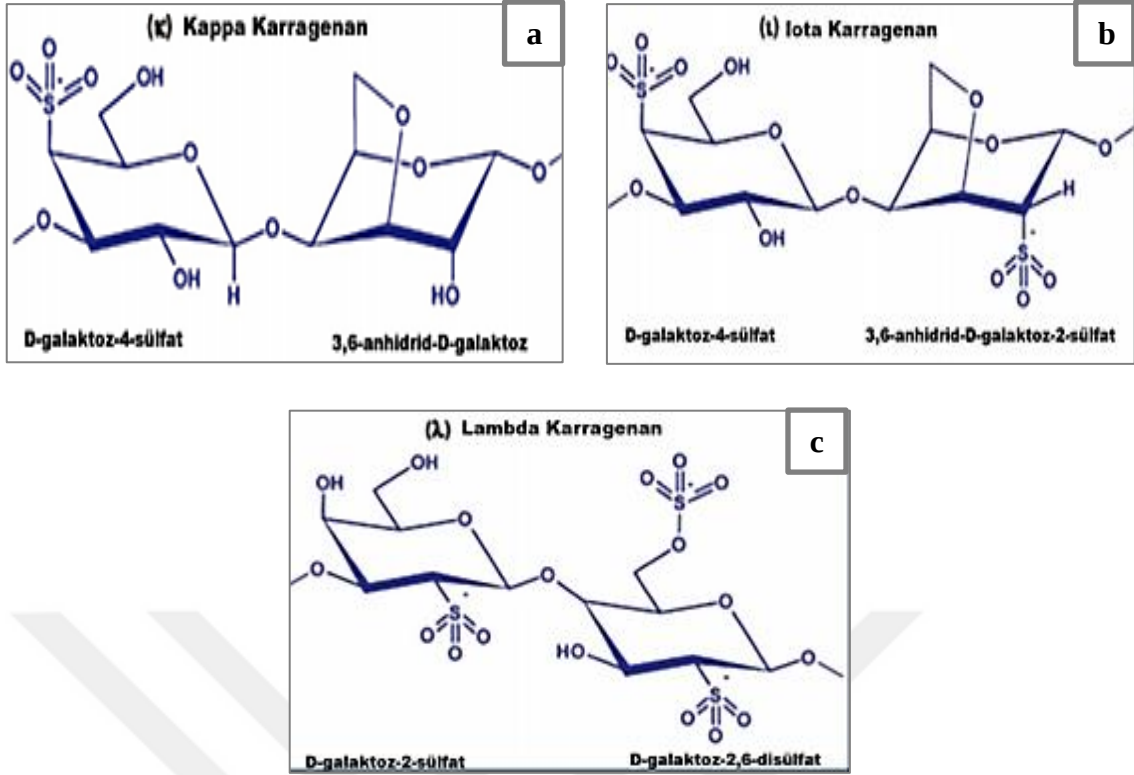
Karragenan özellikle Kuzey Amerika ve Atlantik kıyılarında yoğun olarak bulunmaktadır. Ester sülfat gruplarının sayısı ve pozisyonu karragenan tipinin özelliklerini etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır. Ester sülfat miktarı ne kadar yüksek ise karragenanın çözünürlüğü daha düşük ve buna bağlı olarak da düşük oranda jel üretimi meydana gelmektedir [43]. Karragenan, D-galaktoz ve D-anhidrogalaktozun uzun doğrusal zincir yapıları ve ester sülfat gruplarından oluşmaktadır. Bu nedenle anyonik özelliğe sahiptir. Yapısında sülfat gruplarının bulunması nedeniyle Na^+ , K^+ , Ca^{+2} gibi katyonlar tarafından nötralize edilmektedir [44]. Karragenan türleri hem hidrofilik yapıya sahip olmaları hem de yüksek oranda iyonlaşabilen sodyum, potasyum, kalsiyum iyonları içerdikleri için sudaki çözünürlükleri yüksek olup, organik çözücüler, yağ ve katı yağlarda çözünmez [45]. Karragenan üretimi için kullanılan kırmızı alg türleri: *C. crispus*, *C. ocellatus*, *G. stellata*, *G. radula*, *G. acicularis*, *G. skottbergii*, *E. cottoni*, *E. spinosum*, *F. fastigata* ve *H. musciformis* türleridir [46].



Şekil 2.5. Karragenan molekülünün yapısı [47].

2.5.1. Karragenan Tipleri

En az 15 farklı tipte karragenan molekülü tanımlanabilir ancak, ticari olarak önemli 3 tipi vardır. Bunlar: mono sülfat (ι), di-sülfat (k) ve tri-sülfat (λ) dır [43]. Kappa Karragenan (k-karragenan), *K. alvarezii* kırmızı algden elde edilir. 3-bağlı β -D-galaktoz 4 sülfat ve 4-bağlı-anhidrogalaktoz birimlerinden oluşur. Potasyum iyonlarının varlığında güçlü, sert jeller meydana getirirler. K-karragenan yaklaşık %25-30 oranında ester sülfat grubu ve %28-35 oranında da 3,6 anhidrogalaktoz içeriğine sahiptir. K-karragenan ayrıca sıcak suda çözünmektedirler [42]. Iota Karragenan (ι -karragenan), *E. spinosum* türü kırmızı alglerden elde edilmektedir. Kalsiyum iyonlarının varlığında da yumuşak, berrak ve elastik jeller oluştururlar. I-karragenan yaklaşık %28-30 oranında ester sülfat grubu ve %25-30 oranında da 3,6 anhidrogalaktoz içeriğine sahiptir [42]. Lambda-karragenan (λ -karragenan) ise *Gigartina* ve *Chondrus* kırmızı alg türlerinden elde edilir. λ -karragenan, jel oluşturmaz ve süt ürünlerini kalınlaştırmak için kullanılır. λ -karragenan yaklaşık %32-39 arasında ester sülfat grubu içerir, ancak 3,6 anhidrogalaktoz yapısını içermez. λ -karragenan hem sıcak hem de soğuk suda çözünebilmektedir [42].



Şekil 2.5.1. a.Kappa karragenan b. Iota karragenan c. Lambda-karragenan [48].

2.5.2. Karragenanın Kullanım Alanları

Karragenan molekülünün yapısında bulunan anyonik ester sülfat grupları proteinlerdeki pozitif yüklere bağlanarak gıdaların kıvamlı olmasını sağlarken stabilize edilmesinde de önemli rol oynar. Bu özelliği sebebiyle gıda endüstrisinde ürünleri kalınlaştırma, lezzetlendirme ve jelleşme aşamalarında tercih edilmektedir [49]. Karragenan özellikle peynir sertliğinin oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır. Peynirin sert ve yumuşak özellikte olup, rendelenmesi için kalınlaştırıcı olarak kullanılmaktadır. İşlem görmüş peynirlere karragenanın eklenilmesi sonucunda peynir yapısının bir arada tutulup kalınlaştırdığı sonucuna ulaşılmıştır [49]. Örnek olarak k-karragenan ve i-karragenan konsantrasyonlarının artırılması işlem görmüş Hollanda peynirinin sert bir yapı kazanmasına neden olmuştur. Bu etkisinde karragenan ve kazeinin etkileşimi sonucunda ortaya çıktığı belirtilmiştir. Karragenanın peynir yapımında kullanılmasının bir diğer avantajıda inorganik iyon dengesinin korunmasında rol oynamasıdır [49].

Yapılan alışmalar hidrokolloid ve fosfat tuzlarının yerine kullanılıp, k-karragenan ve ı-karragenanın birlikte kullanılması sonucunda peynir içindeki süt yağı moleküllerinin stabilize edildiği bulunmuştur [49]. Karragenan ikolatalı süt, süzme peynir, dondurma, yoğurt, ekşi kremanın yanı sıra mayonez, bebek maması, işlenmiş etlerde de stabilize etme özelliğinden dolayı kullanılmaktadır. Aynı zamanda puding, sütlü tatlıların viskozitesi, süzme peynirinin yoğunluğu, sosis ve hamburger üretimi için bağlayıcı ve stabilizatör olarak kullanılmaktadır [50].

Karragenanın günlük doz kullanımına ilişkin kesin bir bilgi olmamasına karşın 20-200 mg/gün olarak tahminler mevcuttur. Karragenanlar, endüstriyel gıda uygulamalarının yanı sıra diş macunu, hava spreyi jelleri, yangın söndürme köpüğü, kozmetik kremler, şampuan ve ayakkabı cilasında da kullanılmaktadır [50].

Karragenan: antikoagülan ve antitrombotik, antiviral, immünomodülatör, antioksidan ve antitmorejenik etkileri içeren çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir.

2.5.3. Karragenanın Biyolojik Fonksiyonları

2.5.3.1. Antikoagülan ve Antitrombotik Etki: Bu aktivitelerin temeli tam olarak anlaşılamamıştır, fakat birçok araştırma trombin inhibitörlerinin (rn: Antitrombin ve heparin kofaktör II) aktivasyonu yoluyla doğrudan ve dolaylı olarak trombin inhibisyonunu içeren birden fazla etki mekanizmalarının olduğunu göstermektedir [51,52]. Pıhtının antikoagülasyon aktiviteleri açısından önemli rol oynayan faktörler arasında karragenan molekülünün; şeker bileşimi, molekül ağırlığı, sülfasyon seviyesi ve şeker yapısının üzerinde bulunan sülfat gruplarının pozisyonu etkin rol oynamaktadır. Antikoagülan aktivite için şeker üzerinde bulunan sülfat gruplarının konumları da önemli rol oynamaktadır. Kırmızı alger, yüksek antikoagülan aktiviteye sahip olup, sülfatlanmış polisakkarit yapılar bulundurmaktadır [53].

Kırmızı alg türlerinden birisi olan *B. occidentalis*'te sülfatlanmış bir galaktan üzerinde yapılan çalışmalar bu konu üzerinde açıklayıcıdır. *B. occidentalis*'ten 2,3-di-O-sülfatlanmış-D-galaktan yapısının trombin ve faktör X'un inhibe edilmesine bağlı olarak heparine benzer antikoagülan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. [54].

2.5.3.2. Antiviral Etki: Alglerden elde edilen sülfatlanmış polisakkaritler, herpes simpleks virüsü (HSV), insan immün yetmezliği virüsü (HIV), sitomegalovirüs (CMV), dang virüsü ve solunum sinsityal virüslerinin çoğalmasını engellemektedir. Negatif yüklü moleküller, virüs üzerindeki veya hücre yüzeyindeki pozitif yüklerle etkileşerek ve böylece virüsün konakçı hücrelere nüfuz etmesini önleyerek inhibitör etki gösterirler [55].

Glukoronik asit ve sülfatlanmış fukoz birimlerinden oluşan *Cladosiphon okamuranus* türünün baby hamster böbrek fibroblastları (BHK-1) ile dang virüs tip 2 (DENV2) çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir, ancak dang virüsün diğer tipleri üzerinde etkisi fazla görülmemiştir. DENV2’niin diğer tiplerine oranla etkili olmasının nedeninin ise arginin-323’ün fukan ile etkileşiminin önemli rol oynadığı olarak belirtilmiştir [55].

Talarico ve ark. Kırmızı alglerden üretilmiş sülfatlanmış polisakkarit örneği olan *G. griffithsiae* türü karragenan ve *C. crenulata* galaktan türünün vero hücrelerinde (Maymun hücrelerinde hazırlanan ve viroloji çalışmalarında sık olarak kullanılan hücre hattı) dang virüsü serotipi (DENV2) çoğalmasını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Karragenan ve galaktandan elde edilen polisakkarit örneğinin dang virüs tip 3 (DENV3) ve dang virüs tip 4 (DENV4) ne karşı etkileri daha az görülürken, dang virüs tip 1 (DENV1) ne karşı etkisiz olduğu belirtilmiştir [55].

Genel olarak sülfatlanmış polisakkaritlerin antiviral aktivitesinin moleküler ağırlığı ile arttığı görülmüştür. Kahverengi ve kırmızı alglerin yapısı (galaktanlar, fukanlar ve galaktofukanlar), sülfat ester içeriği ve moleküler ağırlıklarındaki artış miktarı gibi farklılıklar HSV-1 ve HSV-2 enfeksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [55].

2.5.3.3. İmmünomodülatör Etki: Sülfatlanmış polisakkaritler bağışıklık tepkisinin uyarılması veya enflamasyon ile ilişkili negatif etkilerin azaltılması sırasında immünomodülatör etki göstermektedir [56]. Sülfatlanmış polisakkaritler, tümör ve metastaz dahil olmak üzere hastalık sonucu etkili olabilecek immün ve inflamatuvar sistemlerde çoklu hedefleri etkileyebilir. Karragenanların NK hücreleri, lenfosit ve makrofajların tümörlere karşı sitotoksitesini artırdığı yönde kanıtlar vardır [56].

Alg kökenli polisakkaritlerin immünomodülatör etkileri çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Örneğin farede menenjit modelinde kırmızı alg bileşenlerinden oluşan fukoidanların intravenöz invazyonu, ayrıca sıçanlarda yapılan çalışmada periton bölgesindeki enflamasyonu önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. Fukoidanların inhibe edici özelliğini selektin L ve P'ye bağlanarak gerçekleştirdiği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca sülfatlanmış polisakkaritlerin bazal membran bütünlüğünün bozulmasında rol alan heperanaz ve elastaz enzimlerini de inhibe ettikleri gösterilmiştir [55].

Nükleer manyetik rezonans (NMR) çalışmaları dallanma yapısı gösteren fukoidanların, düz yapı gösterenlere oranla inhibe edici özelliğinin daha yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir. Alglerin uyarıcı etkilerini indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve pro-inflamatuvar sitokin/kemokin yoluyla gerçekleştirdiğini ifade etmişlerdir. Örneğin *F. vesiculosus* türünden elde edilen fukoidanların RAW264.7 makrofaj hücrelerinde iNOS'u indükleyerek nitrik oksit üretiminin artmasına neden olmuştur [55].

2.5.3.4. Antioksidan Etki: Karragenanın, süperoksit radikali ve hidroksil radikallerinin ortadan kaldırılmasında rol oynadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, λ -karragenan'ın k-karragenan ve ι -karragenan ile karşılaştırıldığında daha güçlü bir inhibitör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, daha düşük molekül ağırlığına sahip olan karragenanların daha iyi antioksidan aktiviteye sahip oldukları da gösterilmiştir [55].

2.5.3.5. Anti-tümörejenik Etki ve *in vitro* Çalışmalar: Karragenan ile yapılan çalışmalar hücrelerin kontrolsüz bölünmesini önleme özelliğine sahip olduğunu göstermektedir. Karragenanın terapötik ajanlarla birlikte hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda kullanılmasının sonucunda umut vadedecek bir madde olduğu düşünülmektedir [55]. Karragenanların, *in vitro* olarak kanser hücre hatlarında anti-proliferatif aktiviteye ve *in vivo* olarak tümör büyümesinin inhibe edici aktivitesine sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Kanser hücreleri ve bazal membran arasındaki etkileşimleri bloke ederek çeşitli substratlara tümör hücresi proliferasyonunu ve tümör hücresi yapışmasını inhibe ederek antimetastatik aktiviteye sahiptir [57]. Karragenanın, antitümör aktivitesi moleküler ağırlığı ile yakından ilişkilidir. Karragenan oligosakkaritlerinin kimyasal modifikasyonunun antitümör etkilerinde artışına neden olup, antitümör bağışıklığını da artırdığı gösterilmiştir [58].

F. Namvar ve ark. yaptığı çalışmada MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücre hatları üzerinde *Eucheuma cottonii* alg türünden elde edilen ekstrakt kullanılmıştır. Sonuçta meme kanseri hücrelerinde morfolojik olarak değişiklikler gözlenmiştir. Karragenanın zamana ve doza bağlı olarak MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Özellikle MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı daha etkili olan karragenan molekülünün kanser hücresinde apoptotik morfolojik değişiklikler (hücre büzülmesi, mikrovillus yapılarının azalması veya kaybolması) oluşturduğu da gözlenmiştir [34].

M. Jazzara ve ark. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde yaptığı bir çalışmada trypan blue testi ile 1.0 mg/ml'lik yüksek konsantrasyonda λ -karragenan uygulanmasına rağmen hücre canlılığının %80'in üzerinde olduğu sonucu elde edilmiştir [38]. Bu sonuç λ -karragenan molekülünün tümör hücrelerine düşük sitotoksosite gösterdiğine işaret etmektedir. Bu çalışmada MTT analizlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tümör hücrelerinin karragenan ile inkübasyonundan 24 saat sonra hücre çoğalmasında bir fark görülmemiş olup , 48.saatte λ -karragenan konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı bir miktar azalmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda λ -karragenanın *in vitro* tümör hücrelerine karşı sitotoksitesinin düşük olduğu sonucuna varılmıştır [38].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Hücrelerin Kültürü

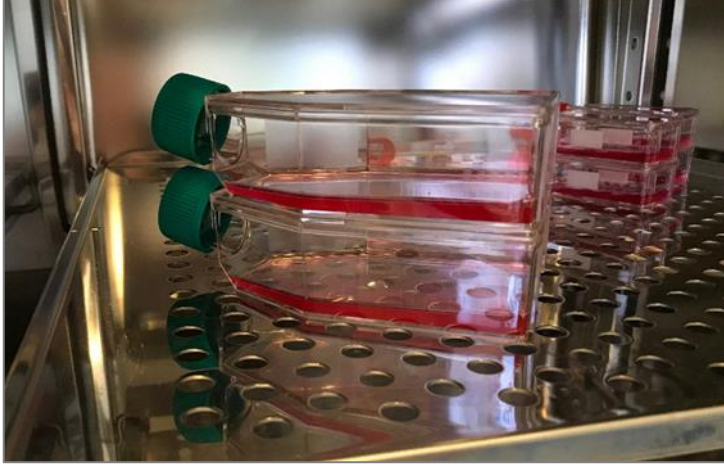
Bu tez çalışmasında MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ve sağlıklı meme epitel hücre hattı olan SVCT kullanılmıştır. Bu hücre hatları laboratuvarımızın stoklarında bulunan hücre hatlarıdır ve çeşitli amaçlarla önceki çalışmalarımızda kullanılmıştır. Tez çalışması sırasında hücrelerin her biri kendileri için uygun besi yerleri içinde kültüre edilmiş, yeterli sayıda çoğaltılmış, bir bölümü de dondurularak stoklara dahil edilmiştir.

Hücre hatları için kullanılan besi yerlerinin bileşimi şu şekildedir:

<i>Hücre Hattı</i>	<i>Besiyeri</i>	<i>Serum</i>	<i>Penisilin-Streptomisin</i>	<i>Katkı Maddeleri</i>
MCF-7	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 (DMEM/F-12, Biochrom AG, Germany)	%10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom AG, Germany)	1000 µg/ml Penisilin-Streptomisin (Biochrom AG, Germany)	-
SKBR-3	Mc Coy (Biochrom AG, Germany)	%10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom AG, Germany)	1000 µg/ml Penisilin-Streptomisin (Biochrom AG, Germany)	-
MDA-MB-231	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 (DMEM/F-12, Biochrom AG, Germany)	%10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom AG, Germany)	1000 µg/ml Penisilin-Streptomisin (Biochrom AG, Germany)	-
SVCT	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 (DMEM/F-12, Biochrom AG, Germany)	%10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom AG, Germany)	1000 µg/ml Penisilin-Streptomisin (Biochrom AG, Germany)	5 µg/ml Hidrokortizon, 10 µg/ml İnsülin

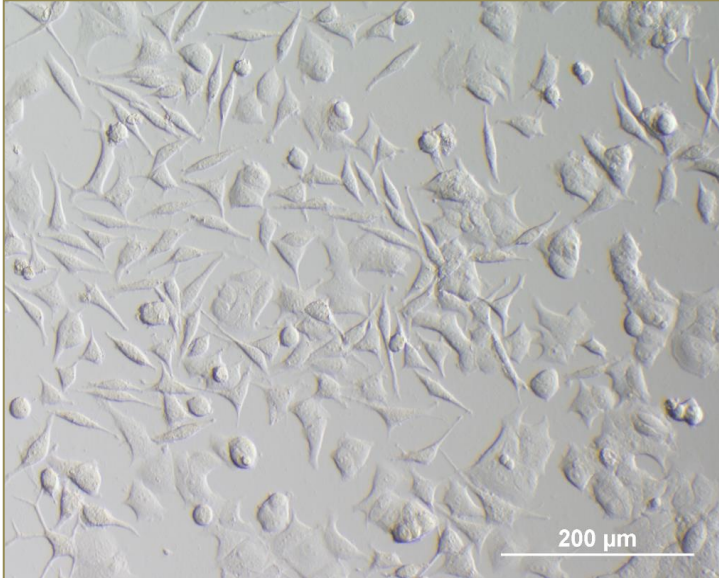
Çizelge 3.1. Hücre hatları için kullanılan besi yerleri

Hücreler uygun besiyerleri içinde ve 75 cm²'lik kültür kaplarında ve 37 °C'de %5 CO₂ %95 hava koşullarında inkübe edilmiştir.

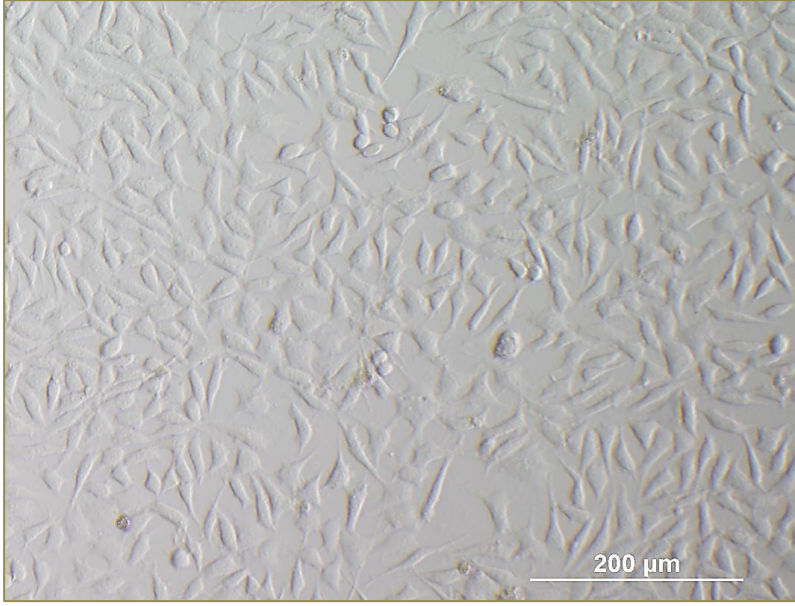


Şekil 3.1 Hücre hatlarının 75 cm²'lik flasklara ekimi

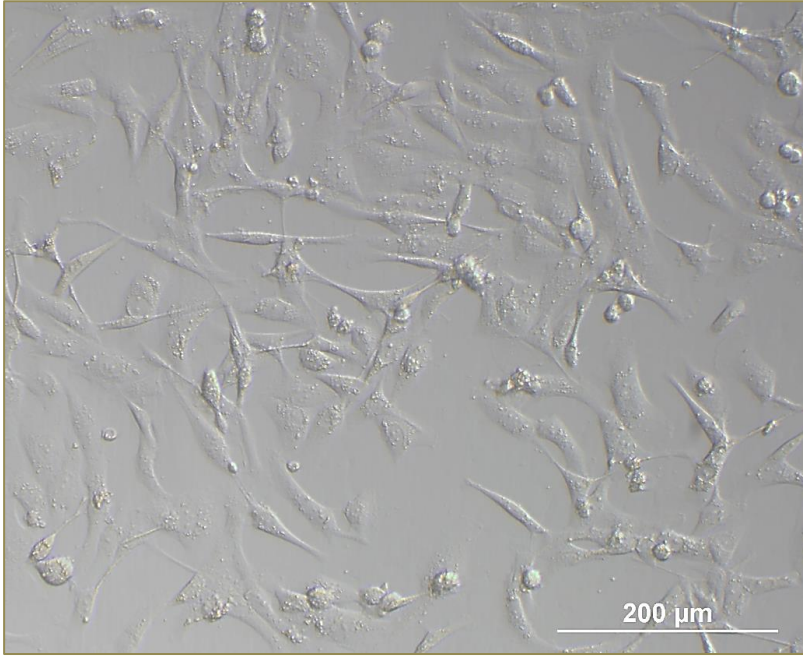
Kültüre edilen hücreler istenilen morfoloji ve sayı için uygun hale geldikten sonra hücrelerin bir kısmı stoklar için dondurulup yeterli sayıda hücre ile deneylere geçilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanmış olduğumuz hücrelerin inkübasyonun başlangıcında sağlıklı morfolojileri aşağıdaki gibidir (Şekil 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5).



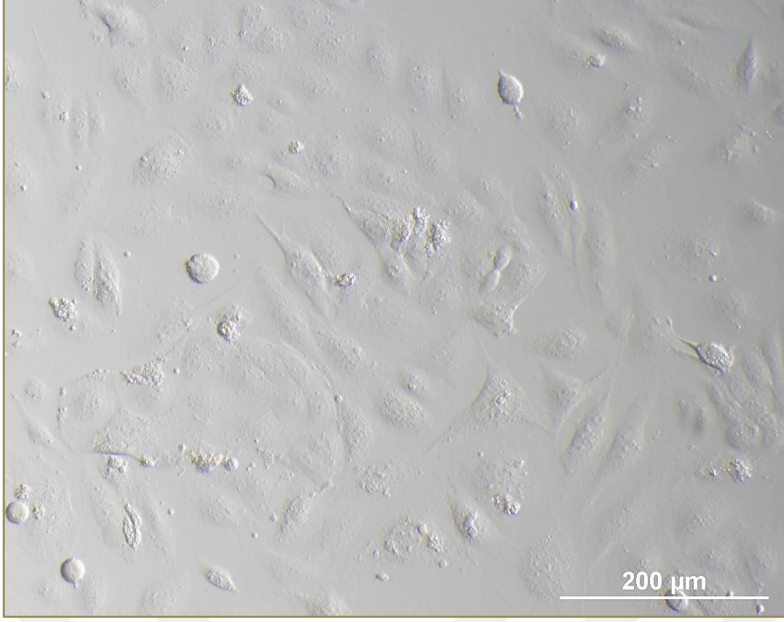
Şekil 3.2 MCF-7 meme kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü (x20)



Şekil 3.3 SKBR-3 meme kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü (x20)



Şekil 3.4 MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü (x20)



Şekil 3.5 SVCT sağlıklı meme epitel hücre hattının morfolojik görüntüsü (x20)

3.2. Karragenan Konsantrasyonlarının Hazırlanması ve Hücreler ile Muamele

Karragenan, suda çözünen bir moleküldür ve hücre kültürü ortamı içinde hazırlanmıştır. Ancak, yoğun karragenan içeren stok çözeltisi hazırlanırken, serumlu besiyeri kullanıldığında bir miktar çökelme olduğu görülmüştür. Bunu önlemek için stok çözeltisi serum içermeyen besi yeri içinde hazırlanmış, vorteks ile karıştırılarak iyi bir homojenizasyon sağlanmış ve dilüsyonlar serumlu besiyeri içinde hazırlanarak çalışmalara devam edilmiş, bundan sonra da herhangi bir çökelme problemi yaşanmamıştır.

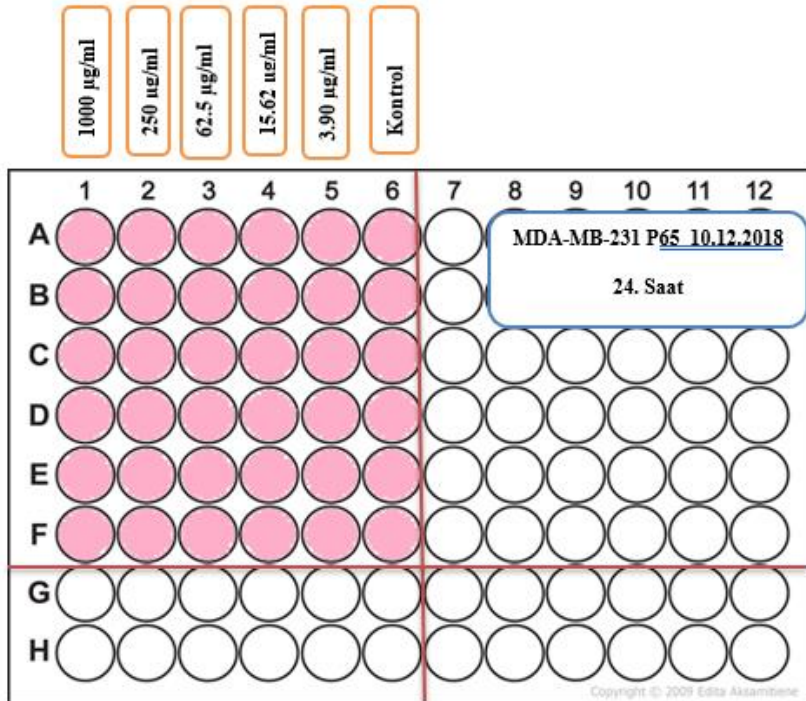
Oda ısısındaki karragenan, 20.000 µg/20 ml olacak şekilde stok çözelti olarak serumsuz besiyeri içinde hazırlanmış ve 0.22 µm filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Karragenan dilüsyonu literatürdeki farklı çalışmalar dikkate alınarak çalışmamızda başlangıç dozu olarak 1000 µg/ml alınmış ve dilüsyon ile beş farklı karragenan solüsyonu hazırlanmıştır. Karragenan içermeyen sadece besiyeri ile muamele edilen hücreler, kontrol grubu olarak alınmıştır.

KONSANTRASYON

STOK	
I. KONSANTRASYON	20 mg/ml
II. KONSANTRASYON	1000 µg/ml
III. KONSANTRASYON	250 µg/ml
IV. KONSANTRASYON	62.5 µg/ml
V. KONSANTRASYON	15.62 µg/ml
	3.90 µg/ml

Çizelge 3.2. Karragenan konsantrasyonları

Her bir grup için başlangıç hücre sayısı 20.000 hücre/200 µl besi yeri olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarında standart besi yerlerinde 24 saat boyunca inkübe edilmiş, bu sürenin sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak, belirlenen karragenan konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. İnkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde analizler yapılmıştır.



Şekil 3.6 Karragenanın hücre hatlarına uygulanması

3.3. Hücre Canlılığının İncelenmesi

3.3.1. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Testi

MTT testi hücrede tetrazolyum tuzu kullanarak canlı hücrelerin metabolik aktivitesinin ölçülmesini sağlar. Elektron alarak indirgenip, formazen yapılarına dönüşümünü gerçekleştiren tetrazolyum tuzlarında buna bağlı olarak renk değişimi meydana gelir. Bu renk değişimi, sadece canlı hücrelerin tetrazolyum halka yapısının aktif mitokondri tarafından kırılmasıyla olur ve buna bağlı olarak *süksinat dehidrogenaz* enzim aktivitesi görülürken, ölü hücrelerde ise herhangi bir enzim aktivitesi ve renk değişimi gözlenmez. *Süksinat dehidrogenaz* enzimi canlı hücrelerin mitokondrisinde bulunduğu için MTT boyasındaki tetrazolyum halkasını parçalayarak sarı renkte olan MTT solüsyonunu mor renkteki formazen kristallerine dönüştürür. Canlı hücre miktarına bağlı olarak oluşan renk değişimi de absorbans (OD) değeri olarak 560 nm dalga da ölçülür. Çalışmamızda karragenan uygulanmayan grup kontrol grubu olarak belirlenmiş ve karragenanın beş farklı konsantrasyonu olmak üzere toplamda altı grup yer almaktadır. Deney düzeneği üç tekrarlı şekilde tasarlanmıştır. Bu prensiple çalışan MTT testi için aşağıdaki adımlar gerçekleştirilmiştir:

- 1- Hücrelerin 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta 20.000 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır
- 2- İnkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde hücrelerin üzerindeki besiyeri alınmıştır.
- 3- Üzerlerine 100 µl MTT solüsyonu (0.36 ml MTT solüsyonu, 3.24 ml serumsuz besiyeri) eklenmiştir
- 4- Kültür kapları alüminyum folyo ile sarılarak dört saat 37 °C’de inkübe edilmiştir
- 5- İnkübasyonun sonunda MTT solüsyonu alınmış, 100 µl izopropil alkol eklenmiştir.
- 6- Absorbans değeri 560 nm’de ölçülmüştür.

3.3.2. Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi

Canlı ve ölü hücre oranlarının belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden bir tanesi Acridine Orange (AO)/ Propidium Iodide (PI) yöntemidir. AO / PI boyaları DNA'ya spesifik olarak bağlanan boyalar oldukları için hücredeki ölü ve canlı hücrelerin belirlenmesi için kullanılmıştır. AO yağda çözünen ve iyonik yapıya sahip olduğu için hücre membranından geçme özelliği gösteren bir boyadır. Bu özelliğinden dolayı hem canlı hem de ölü hücrelere etki etmektedir. Canlı hücreler yeşil renkte görünür, hücrelerdeki erken apoptoz dönemleri de koyu parlak yeşil renkte görünmektedir. PI ise hücre membranından geçemediği için canlı olmayan hücrelerin DNA'sına bağlanarak geç apoptotik ve ölü hücrelere etki etmektedir. PI ile boyanan hücreler turuncu/kırmızı renkte görünmektedir. İnkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde farklı dilüsyonlardaki hücre morfolojileri belirtilen zamanlarda (AO/PI) floresan boyama ile incelenmiştir. AO/PI boyama yöntemi aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

- 1- Hücrelerin 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta 20.000 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır.
- 2- İnkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde hücrelerin üzerindeki besiyeri alınmış ve hücreler iki kez 100 µl PBS ile yıkanmıştır.
- 3- 1/1 (600 mg/ml AO, 600 mg/ml PI) oranındaki AO/PI 20 sn muamele edilmiştir.
- 4- 20 sn sonunda hücrelerin üzerindeki boya çözeltisi alınmış ve iki kez PBS ile yıkanmıştır.
- 5- Hücreler floresan mikroskopta fluorescein (FITC) filter (520-560 nm)'de yeşil renkte ve PI ile boyanmış hücreler, rhodamine filter (510-560 nm)'de kırmızı renkte boyanarak incelenmiştir.

3.4. İstatiksel Analiz

Tez kapsamında yapılan deneyler üç tekrarlı şekilde yapılmıştır. İstatiksel analizler IBM SPSS statistics 23 programı kullanılarak yapılmıştır. Karragenanın belirlenen dozlarda MCF-7, MDA-MB231, SKBR-3 meme kanseri hücre hatları ve sağlıklı meme epitel hücre hattı olan SVCT hücrelerinde zamana (24., 48. ve 72. saat) ve doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerinde gösterdiği farklılık parametrik olmayan bir test olan *Kruskal Wallis* testi ile incelenmiş, gruplar arasındaki fark için ise post-doc testi olan Bonferroni testi kullanılmıştır. Bulunan sonuçlar $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Hücre Canlılığının İncelenmesi

4.1.1. MTT Testi

Tüm hücre hatları için 24., 48., 72. saatlerde yapılan MTT analizi sonuçları ve p değerleri Çizelge 4.1.1., 4.1.2. ve 4.1.3'te verilmiştir. Sonuçlarımız karragenan konsantrasyonunun artmasıyla birlikte hücreler üzerinde toksik bir etkinin oluştuğunu; ancak bu etkinin hücre tipine ve zamana bağlı olarak bazı farklılıklar içerdiğini göstermiştir. Bu nedenle sonuçlar, tüm hücreler için her bir zaman diliminde ayrı ayrı verilmiştir.

Zaman	Dilüsyonlar	MCF-7			SKBR-3		
		Ortalama	Standart Sapma	P	Ortalama	Standart Sapma	P
24	1	0.185	0.023	0.065	0.350	0.046	0.278
	2	0.192	0.051	0.065	0.418	0.062	0.278
	3	0.154	0.031	0.065	0.338	0.097	0.278
	4	0.156	0.026	0.065	0.360	0.081	0.278
	5	0.159	0.030	0.065	0.348	0.113	0.278
	K	0.160	0.018	-	0.331	0.054	-
		MDA-MB-231			SVCT		
		Ortalama	Standart Sapma	P	Ortalama	Standart Sapma	P
	1	0.724	0.089	0.000*	0.409	0.050	0.500
	2	0.595	0.128	0.016*	0.433	0.047	0.500
	3	0.515	0.098	0.133	0.404	0.075	0.500
	4	0.410	0.056	1.000	0.380	0.057	0.500
	5	0.370	0.052	1.000	0.379	0.051	0.500
	K	0.337	0.027	-	0.376	0.043	-

Çizelge 4.1.1 24. saatte karragenanın hücre hatları üzerinde hücre canlılığına etkisinin zamana ve doza bağlı değişimi (* p<0,05).

		MCF-7			SKBR-3		
Zaman	Dilüsyonlar	Ortalama	Standart Sapma	P	Ortalama	Standart Sapma	P
48	1	0.269	0.016	1.000	0.723	0.238	0.482
	2	0.306	0.032	0.995	0.679	0.208	0.482
	3	0.340	0.025	0.010 *	0.803	0.255	0.482
	4	0.341	0.034	0.009 *	0.622	0.221	0.482
	5	0.320	0.029	0.123	0.582	0.152	0.482
	K	0.304	0.027	-	0.657	0.267	-
		MDA-MB-231			SVCT		
		Ortalama	Standart Sapma	P	Ortalama	Standart Sapma	P
	1	0.844	0.185	0.014 *	0.534	0.022	0.748
	2	0.535	0.031	1.000	0.514	0.027	0.748
	3	0.803	0.255	1.000	0.509	0.072	0.748
	4	0.529	0.105	1.000	0.508	0.085	0.748
	5	0.557	0.108	1.000	0.494	0.054	0.748
	K	0.460	0.114	-	0.502	0.032	-

Çizelge 4.1.2 48. saatte karragenanın hücre hatları üzerinde hücre canlılığına etkisinin zamana ve doza bağlı değişimi (* p<0,05).

		MCF-7			SKBR-3		
Zaman	Dilüsyonlar	Ortalama	Standart Sapma	P	Ortalama	Standart Sapma	P
72	1	0.338	0.025	0.655	1.197	0.528	0.163
	2	0.374	0.036	0.655	0.885	0.270	0.163
	3	0.372	0.031	0.655	0.982	0.477	0.163
	4	0.376	0.067	0.655	0.837	0.377	0.163
	5	0.370	0.058	0.655	0.721	0.307	0.163
	K	0.358	0.054	-	0.703	0.406	-
	MDA-MB-231			SVCT			
		Ortalama	Standart Sapma	P	Ortalama	Standart Sapma	P
	1	0.819	0.094	0.000*	0.318	0.019	0.002*
	2	0.493	0.065	0.257	0.350	0.048	1.000
	3	0.478	0.080	0.344	0.413	0.054	0.221
	4	0.529	0.159	0.221	0.447	0.056	0.018 *
	5	0.414	0.058	1.000	0.465	0.091	0.021 *
	K	0.350	0.037	-	0.483	0.069	-

Çizelge 4.1.3 72. Saatte karragenanın hücre hatları üzerinde hücre canlılığına etkisinin zamana ve doza bağlı değişimi (* p<0,05).

MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatları ve SVCT (sağlıklı meme epitel hücre hattı) hücre hatlarında hücre canlılığı bakımından 24. Saatte tüm konsantrasyonlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamış olup; hücre canlılığı kontrol grubuna benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının I. ve II. konsantrasyonunun kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunduğu ve ortalama değerlerine bakıldığı zaman MDA-MB-231'de hücre canlılığının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

48. saatte MCF-7 meme kanseri hücre hattının III. ve IV. konsantrasyonun kontrol grubu ile arasında anlamlı fark bulunup, bu konsantrasyonlarda hücre canlılığı kontrol grubundan daha fazladır. Diğer konsantrasyonlarında ise kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunmayıp, hücre canlılığı kontrol grubuna benzerlik göstermektedir. SKBR-3 ve SVCT hücrelerinde ise tüm karragenan konsantrasyonlarının kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının I. konsantrasyonunun kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunup, hücre canlılığı kontrol grubundan daha fazladır. Diğer gruplar ile kontrol grubu arasında bu farklılık bulunmamaktadır.

72. saatte MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerinin tüm konsantrasyonlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamış olup, hücre canlılığı kontrol grubuna benzerlik göstermektedir. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının I. konsantrasyonun kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark olup, hücre canlılığı kontrol grubuna göre daha yüksektir. SVCT hücrelerinin I., IV. ve V. konsantrasyonlarının kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlı olup, hücre canlılığı kontrol grubundan daha düşüktür.

Zaman	Dilüsyonlar	1	2	3	4	5
24		P	P	P	P	P
	MCF-7 / SKBR-3	0.883	0.148	0.247	0.100	0.756
	MCF-7 / SVCT	0.053	0.086	0.033*	0.037*	0.004*
	MCF-7 / MDA-MB-231	0.000*	0.000*	0.000*	0.007*	0.010*
	SKBR-3 / SVCT	1.000	1.000	1.000	1.000	0.355
	SKBR-3 / MDA-MB-231	0.053	0.362	0.300	1.000	0.772
	SVCT/ MDA-MB-231	0.883	0.565	1.000	1.000	1.000
Zaman	Dilüsyonlar	1	2	3	4	5
48		P	P	P	P	P
	MCF-7 / SKBR-3	0.009*	0.003*	0.000*	0.059	0.035*
	MCF-7 / SVCT	0.434	0.103	0.165	0.130	0.236
	MCF-7 / MDA-MB-231	0.001*	0.031*	0.068	0.050*	0.001*
	SKBR-3 / SVCT	0.990	1.000	0.362	1.000	1.000
	SKBR-3 / MDA-MB-231	1.000	1.000	0.725	1.000	1.000
	SVCT/ MDA-MB-231	0.247	1.000	1.000	1.000	0.648
Zaman	Dilüsyonlar	1	2	3	4	5
72		P	P	P	P	P
	MCF-7 / SKBR-3	0.041*	0.004*	0.001*	0.003*	0.004*
	MCF-7 / SVCT	1.000	1.000	1.000	1.000	0.403
	MCF-7 / MDA-MB-231	0.247	0.222	0.435	0.186	0.689
	SKBR-3 / SVCT	0.004*	0.005*	0.015*	0.204	0.987
	SKBR-3 / MDA-MB-231	1.000	1.000	0.330	0.875	0.600
	SVCT/ MDA-MB-231	0.039*	0.220	1.000	1.000	1.000

Çizelge 4.1.4. Karragenan konsantrasyonlarının zamana ve doza bağlı olarak hücre hatları üzerinde hücre canlılığına etkisinin değişimi (* p<0,05).

Karragenanın belirlenen dozlarda MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3 meme kanseri hücre hatları ve sağlıklı meme epitel hücre hattı olan SVCT hücrelerinde zamana (24., 48. ve 72. saat) ve doza bağlı olarak gruplar arasındaki fark incelenmiştir. 24. Saatte tüm konsantrasyonların hücre hatları ile karşılaştırıldığı zaman I. ve II. konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunduğu, diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. III., IV. ve V. konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF-7 ve SVCT hücreleri arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır. Diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

48. Saatte I., II. ve V. konsantrasyonlarda MCF-7 / SKBR-3 meme kanseri hücreleri ve MCF-7 / MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır, diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. III. konsantrasyonda MCF-7 / SKBR-3 meme kanseri hücre hatları, IV. konsantrasyonda ise MCF-7 / MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunup, diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

72. saatte I. konsantrasyonda MCF-7 / SKBR-3, SKBR-3 / SVCT ve SVCT / MDA-MB-231 hücreleri arasında anlamlı bir fark bulunup, diğer hücreler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. II. ve III. konsantrasyonlarda MCF-7 / SKBR-3 ve SKBR-3 / SVCT hücreleri arasında anlamlı fark bulunmaktadır. IV. ve V. konsantrasyonlarda MCF-7 / SKBR-3 hücreleri arasında anlamlı bir fark bulunup, diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

4.1.2 Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi

4.1.2.1 MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattının Morfolojik Olarak İncelenmesi

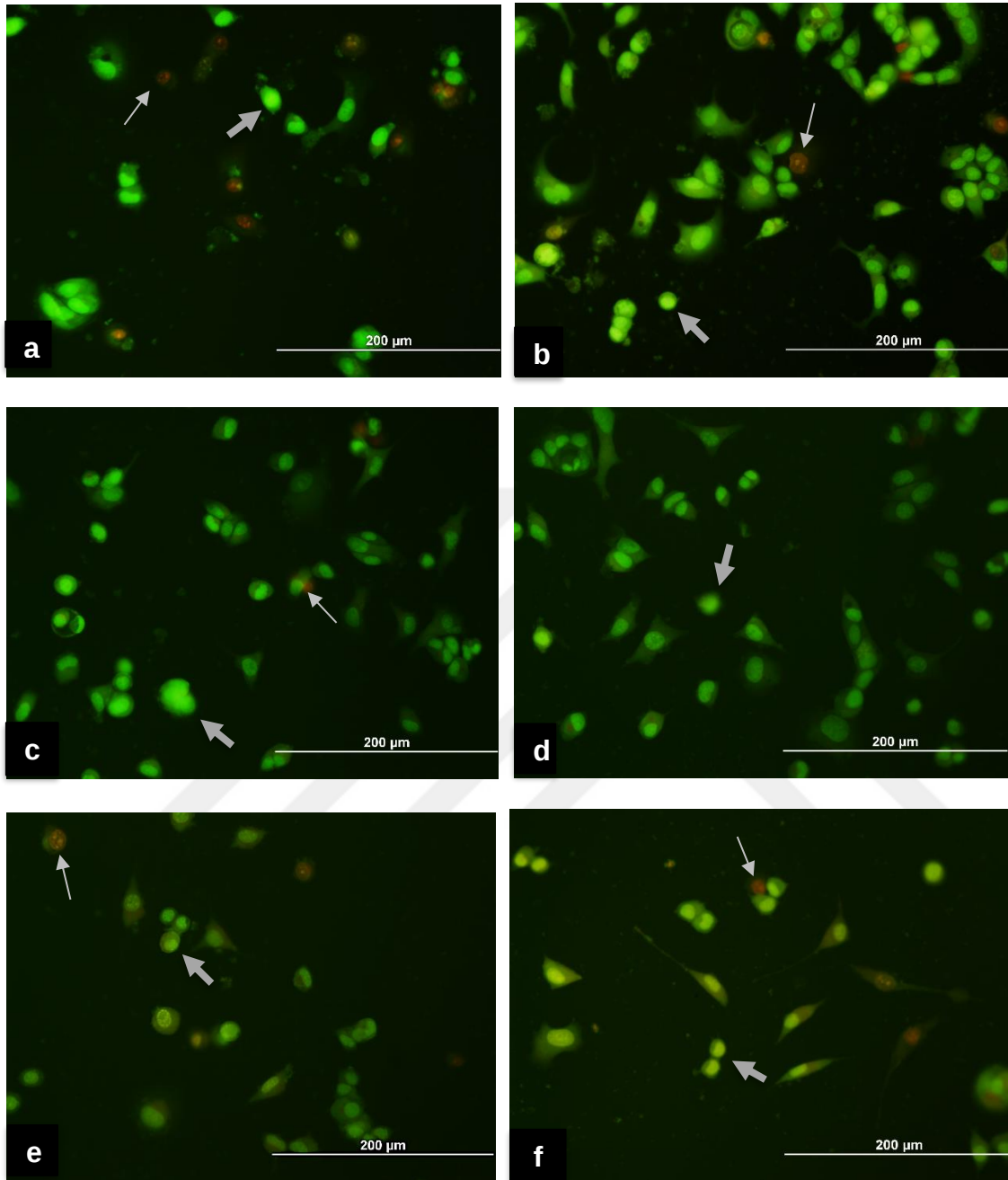
İnkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde yapılan AO/PI boyaması ile canlı ve ölü hücreler görüntülenmiştir. Hücreler x40'lık büyütmede hücre yoğunluğunun fazla olduğu alan belirlenerek, alandan 100 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Belirlenen alanda ölü ve canlı hücreler sayılarak Çizelge 4.1.5.'te gösterildiği gibi ölü ve canlı hücrelerin yüzdeleri verilmiştir.

İnkübasyonun 24. saatinde MCF-7 karragenanın artan doz miktarına bağlı olarak hücre yoğunluğunun kontrole göre az ve kırmızı renkte boyanmış ölü hücrelerin çoğunlukta olduğu, ancak karragenan konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak hücrelerin sağlıklı epiteliyal yapılarını kazanmaya başladıkları görülmüştür. İnkübasyonun 48. ve 72. saatlerinde de benzer görüntüler elde edilmiştir.

MCF-7	24. Saat		48. Saat		72. Saat	
	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %
1.Konsantrasyon	63.8	36.1	78.9	21.05	87.5	12.5
2.Konsantrasyon	89.1	10.8	71.69	28.3	86.7	13.2
3.Konsantrasyon	94.2	5.7	78.29	21.7	75.9	24.07
4.Konsantrasyon	94	5.5	95.1	4.8	96.29	3.70
5.Konsantrasyon	80.7	19.2	91.4	8.5	97.8	2.15
Kontrol	76	24	89.01	10.98	97.6	2.30

Çizelge 4.1.5. MCF-7 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre yüzdesi

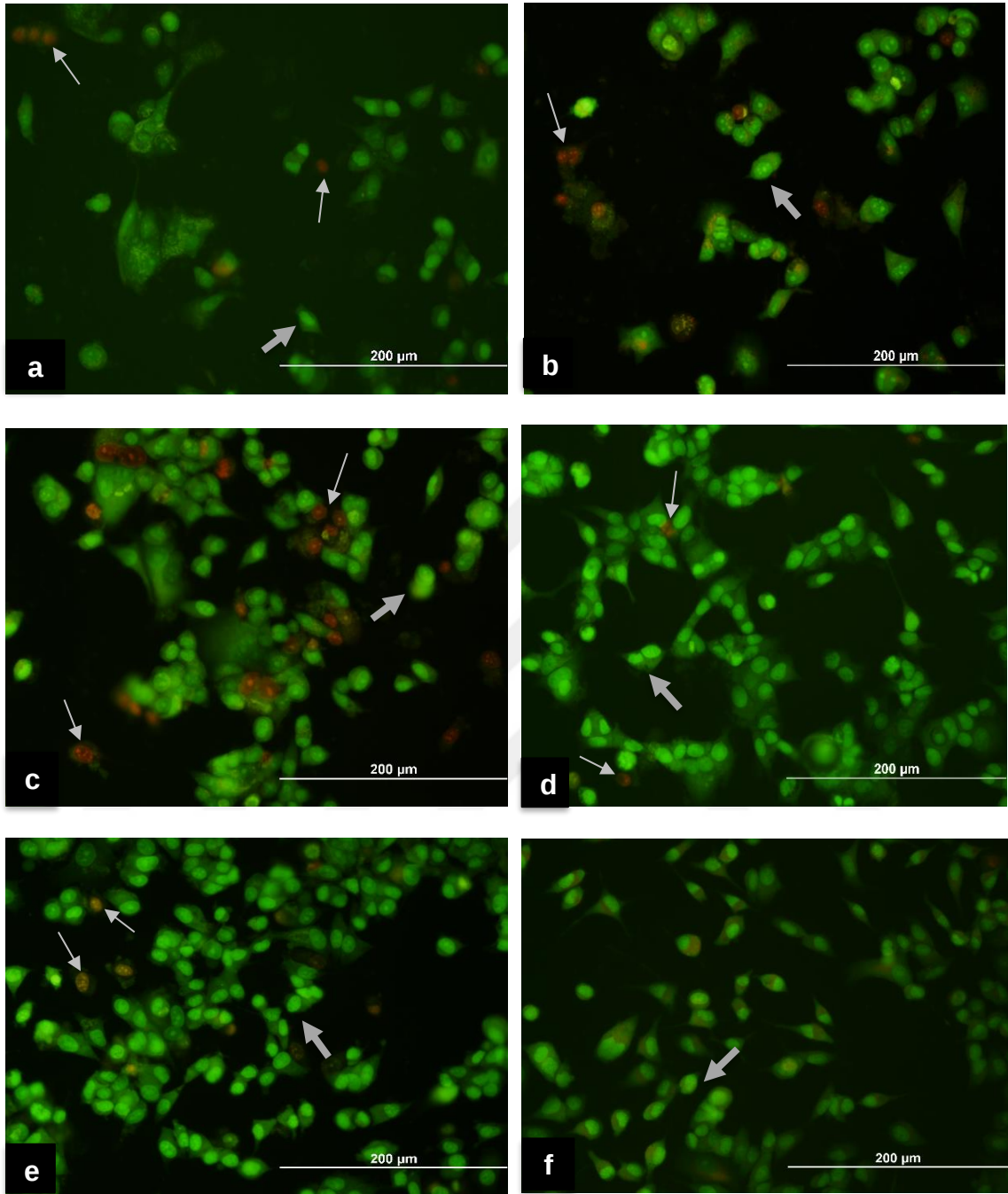
24. Saat



Şekil 4.1.2.1 24. saatte MCF-7 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

(1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

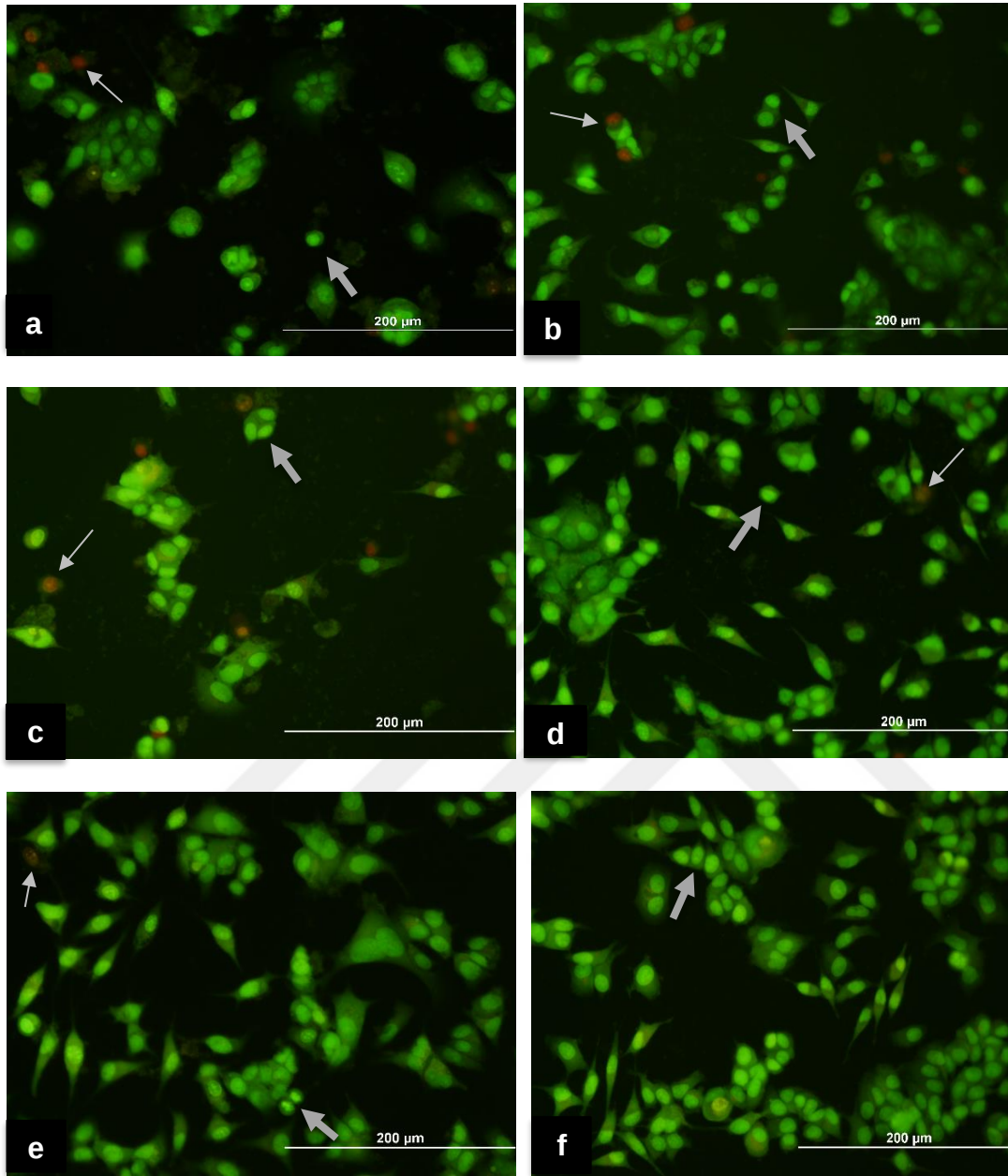
48. Saat



Şekil 4.1.2.2 48. saatte MCF-7 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

72. Saat



Şekil 4.1.2.3 72. saatte MCF-7 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

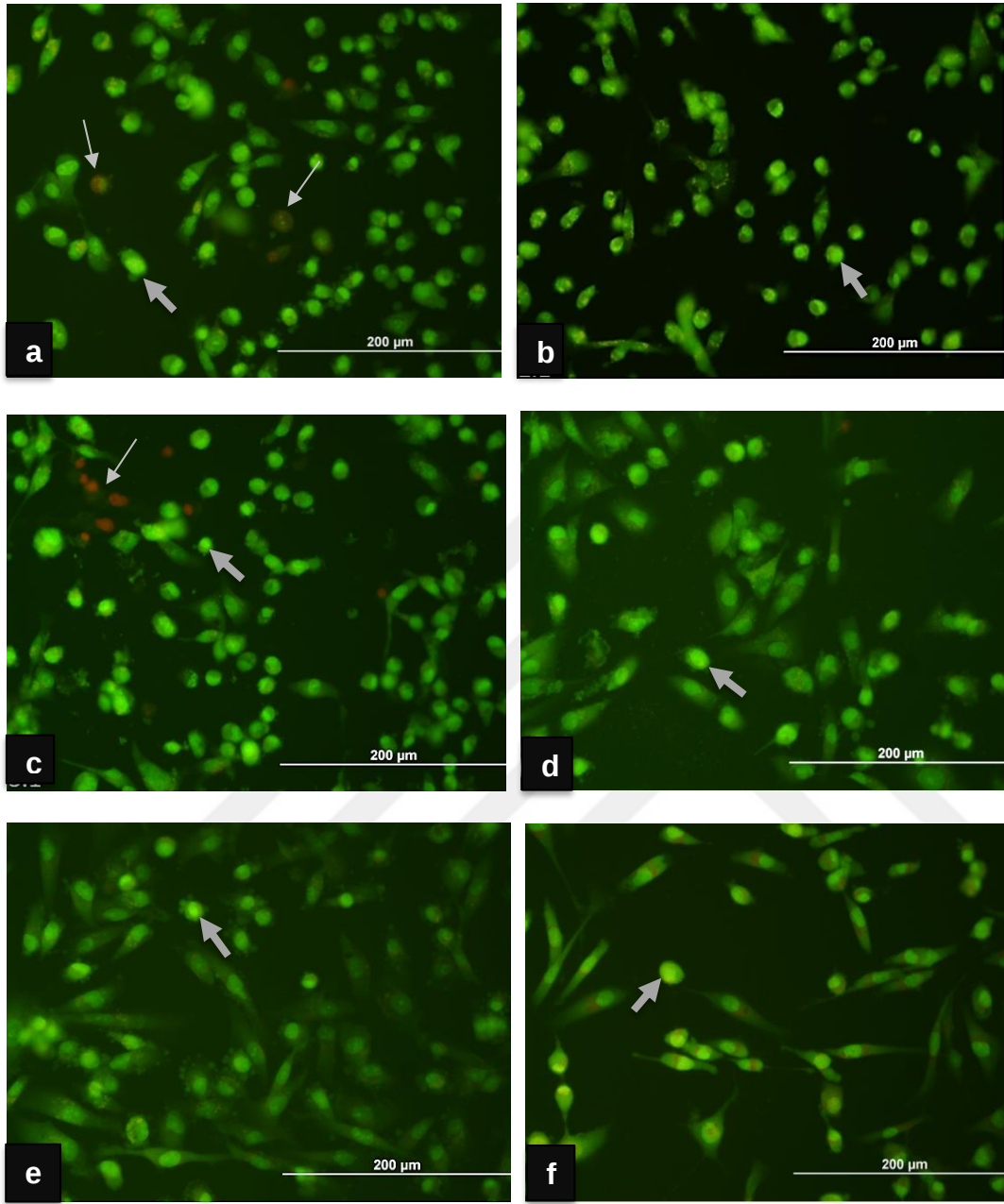
4.1.2.2 MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattının Morfolojik Olarak İncelenmesi

İnkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde yapılan MTT analizi sonuçları ile uyumlu olarak kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir. Hücreler x40'lık büyütmede hücre yoğunluğunun fazla olduğu alan belirlenerek, alandan 100 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Belirlenen alanda ölü ve canlı hücreler sayılarak Çizelge 4.1.6.'te gösterildiği gibi ölü ve canlı hücrelerin yüzdeleri verilmiştir. Sağlıklı epitelial hücre morfolojisü tüm dilüsyonlarda baskın olarak görülmektedir.

MDA-MB-231	24. Saat		48. Saat		72. Saat	
	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %
1.Konsantrasyon	86.8	13.1	70.96	29.03	86.2	13.79
2.Konsantrasyon	87.7	12.2	89.28	10.71	51.51	48.48
3.Konsantrasyon	85.05	14.94	87.5	12.5	83.3	16.6
4.Konsantrasyon	95.8	4.16	80	20	72.09	27.90
5.Konsantrasyon	89.18	10.81	80	20	90.32	9.67
Kontrol	84.61	15.38	93.3	6.6	86.20	13.79

Çizelge 4.1.6. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre yüzdeleri

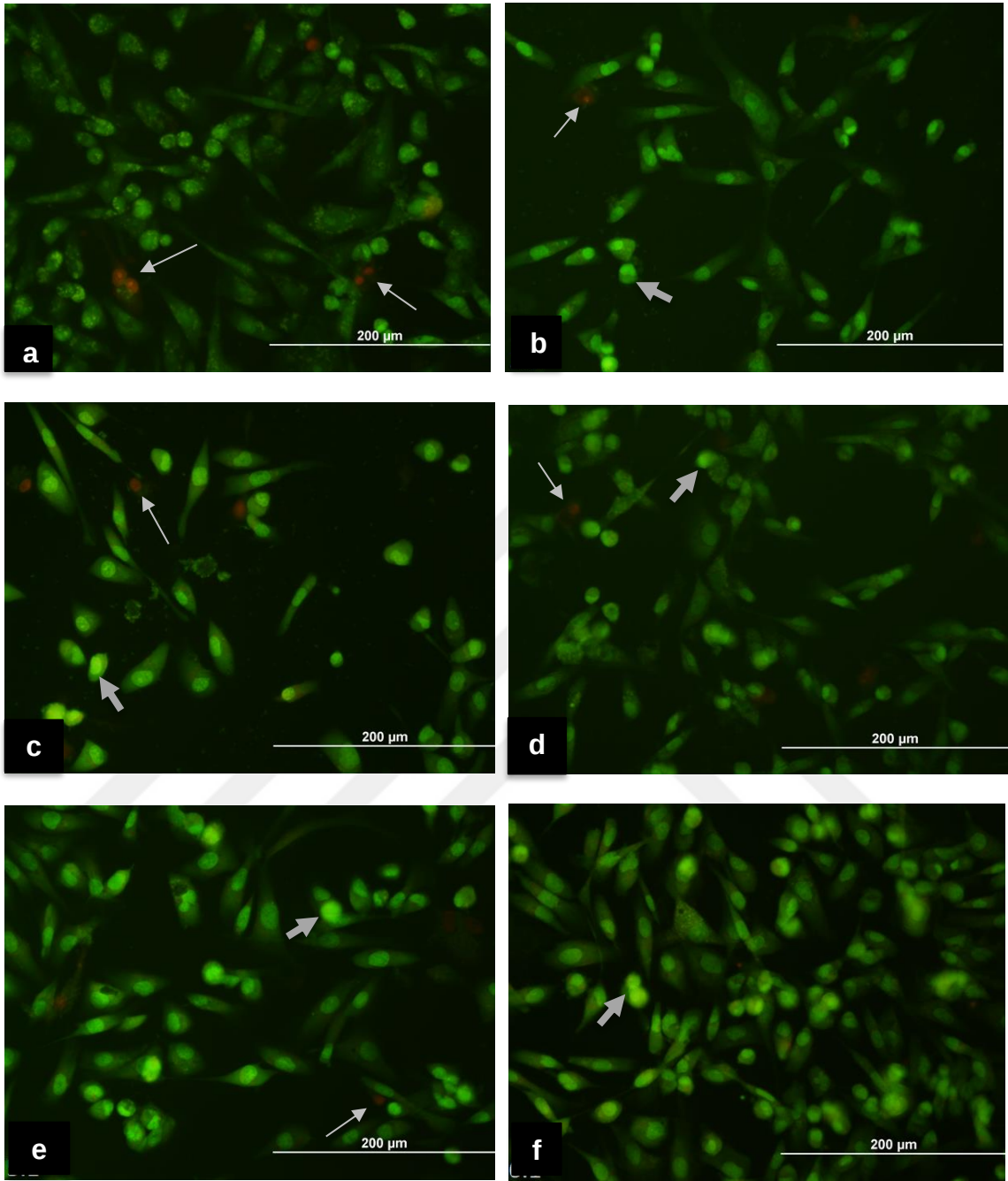
24. Saat



Şekil 4.1.2.4 24. saatte MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

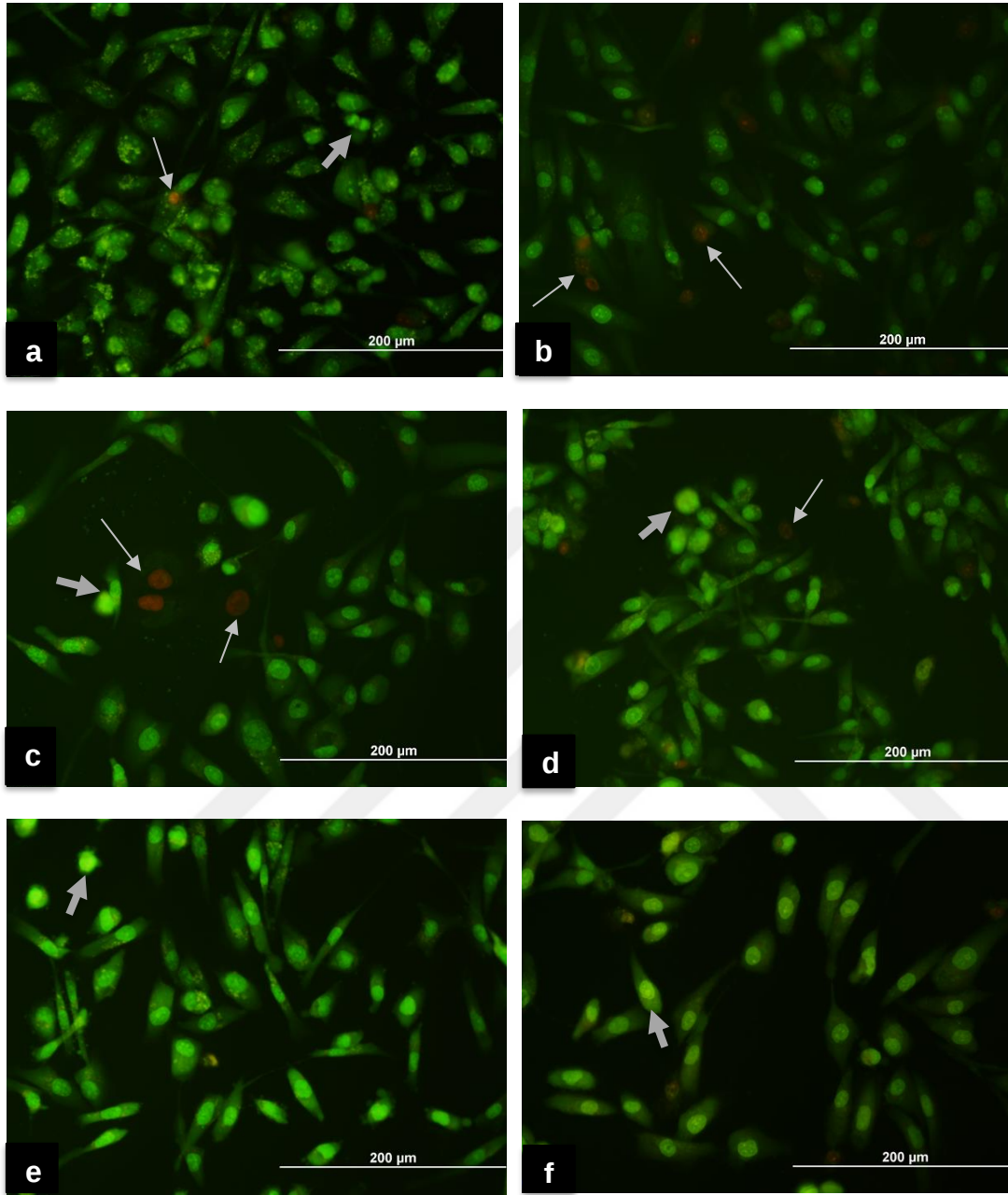
48. Saat



Şekil 4.1.2.5 48. saatte MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

72. Saat



Şekil 4.1.2.6 72. saatte MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

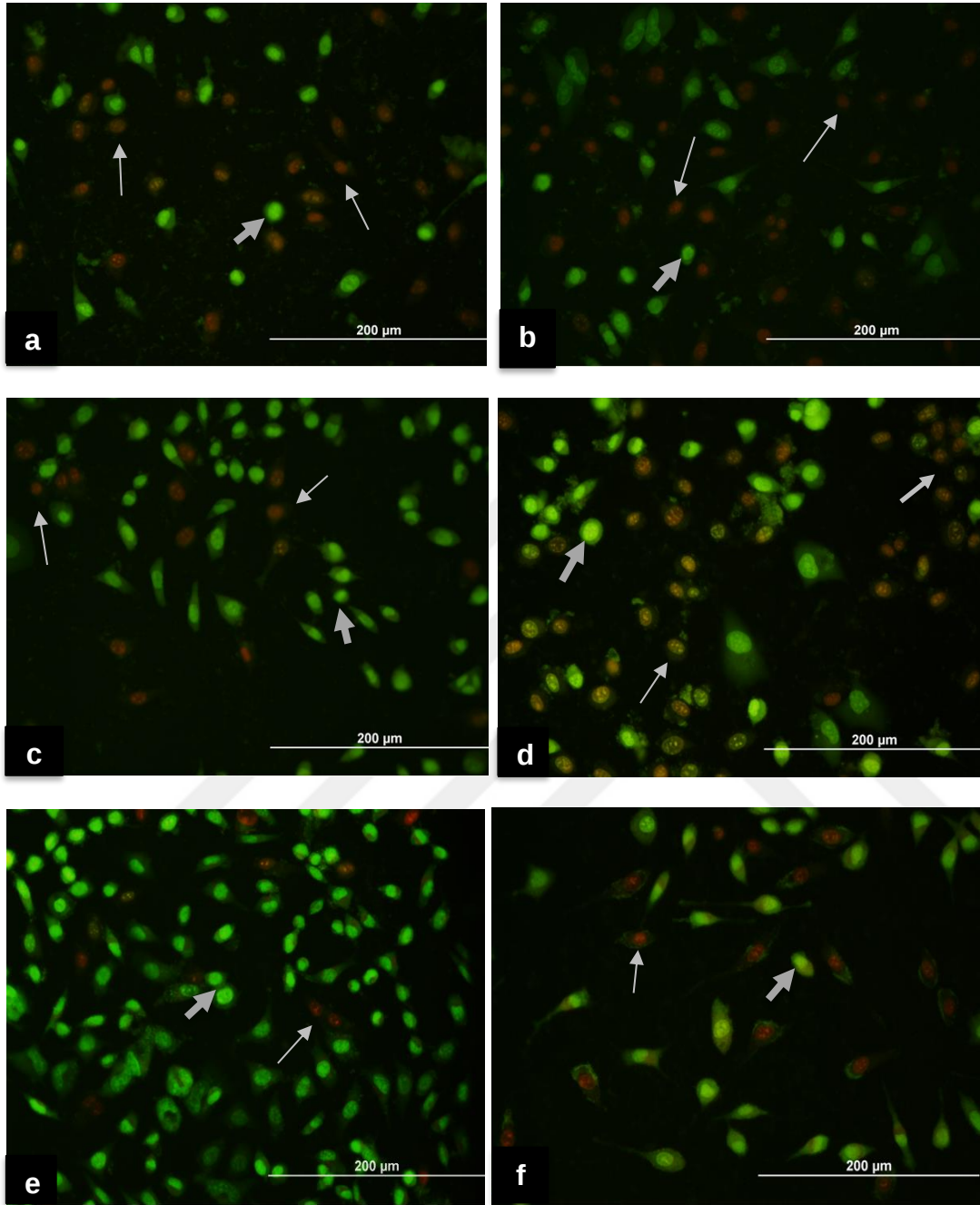
4.1.2.3 SKBR-3 Meme Kanseri Hücre Hattının Morfolojik Olarak İncelenmesi

Hücreler x40'lık büyütmede hücre yoğunluğunun fazla olduğu alan belirlenerek, alandan 100 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Belirlenen alanda ölü ve canlı hücreler sayılarak Çizelge 4.1.7.'te gösterildiği gibi ölü ve canlı hücrelerin yüzdeleri verilmiştir. İnkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde SKBR hücrelerinin morfolojileri hücre canlılığı sonuçları ile benzerlik göstermekte, farklı konsantrasyonlar ile kontrol grubu arasında belirgin bir farklılık görülmemektedir.

SKBR-3	24. Saat		48. Saat		72. Saat	
	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %
1.Konsantrasyon	44.68	55.31	65.1	34.8	93.24	6.75
2.Konsantrasyon	32.69	67.30	69.04	30.95	62.37	37.62
3.Konsantrasyon	77.46	22.53	69.84	30.15	60	40
4.Konsantrasyon	44.1	55.8	50.58	49.41	78.26	21.73
5.Konsantrasyon	81.3	18.7	85	15	81.1	18.89
Kontrol	64.28	35.71	81.13	18.86	75.14	24.85

Çizelge 4.1.7. SKBR-3 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre yüzdeleri

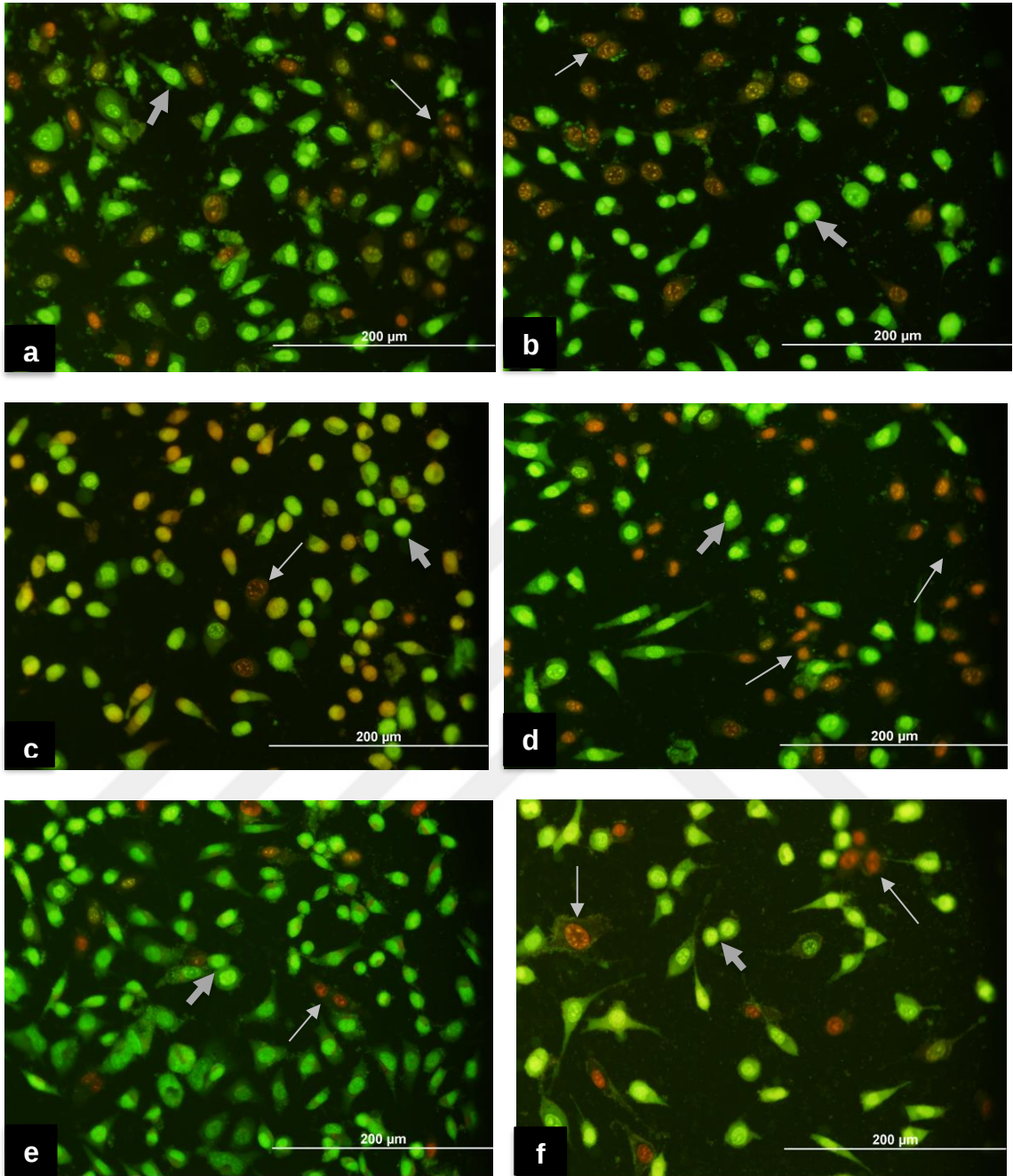
24. Saat



Şekil 4.1.2.7 24. saatte SKBR-3 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

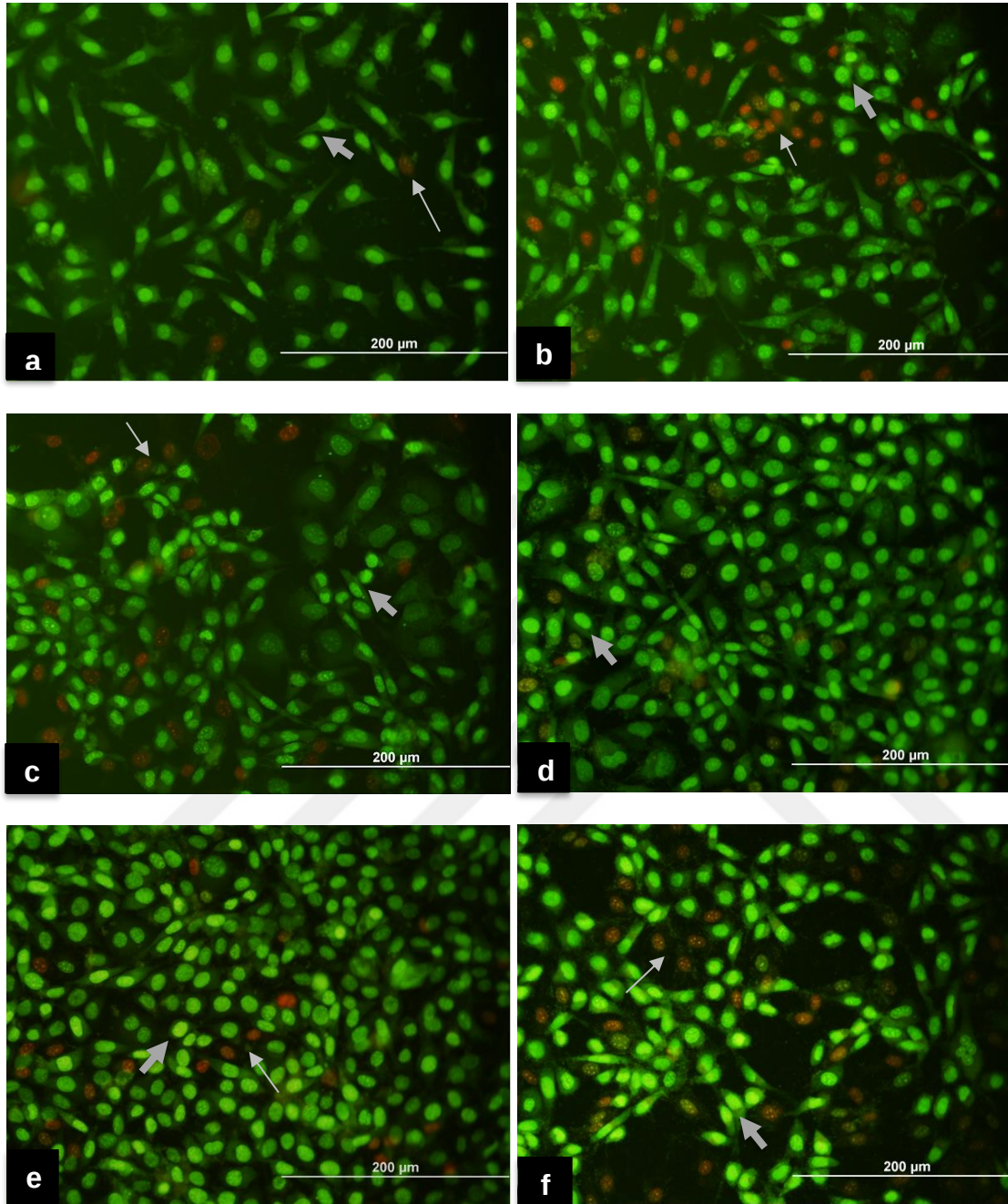
48. Saat



Şekil 4.1.2.8 48. saatte SKBR-3 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler → Ölü hücreler → ile gösterilmiştir.

72. Saat



Şekil 4.1.2.9 72. saatte SKBR-3 meme kanseri hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

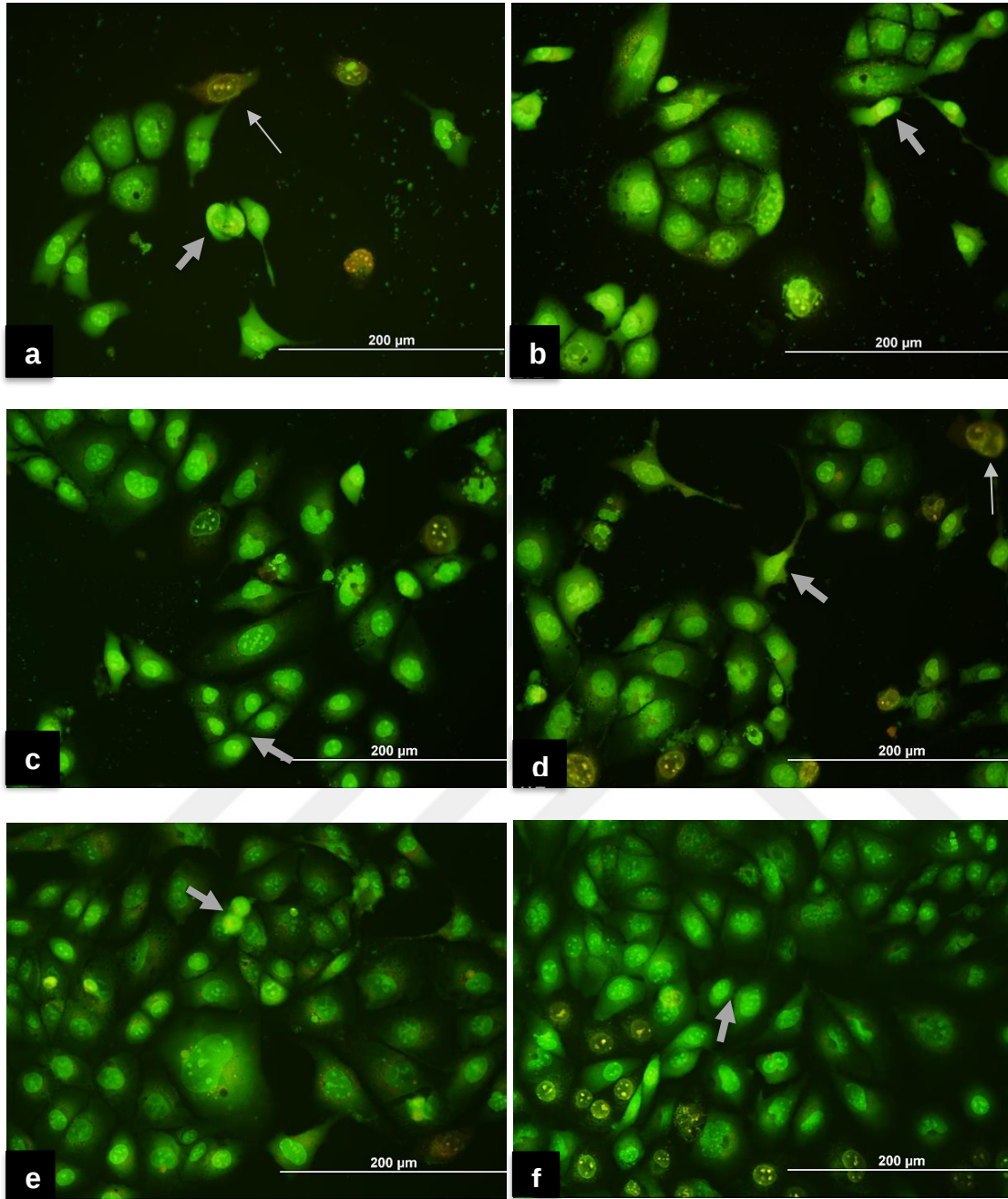
84.1.2.4. SVCT Meme Epitel Hücre Hattının Morfolojik Olarak İncelenmesi

Hücreler x40'lık büyütmede hücre yoğunluğunun fazla olduğu alan belirlenerek, alandan 100 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Belirlenen alanda ölü ve canlı hücreler sayılarak Çizelge 4.1.8.'te gösterildiği gibi ölü ve canlı hücrelerin yüzdeleri verilmiştir. İnkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde hücre morfolojileri benzer olup, sağlıklı epitel hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre morfolojilerinde belirgin bir farklılık görülmemektedir.

SVCT	24. Saat		48. Saat		72. Saat	
	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %	Canlı Hücre %	Ölü Hücre %
1.Konsantrasyon	77.7	22.2	80.95	19.04	84.61	15.38
2.Konsantrasyon	92	8	70.37	29.62	69.23	30.76
3.Konsantrasyon	88.63	11.36	89.18	10.81	81.08	18.91
4.Konsantrasyon	82.5	17.5	100	0	70.45	29.54
5.Konsantrasyon	80.64	19.35	97.72	2.27	95.34	4.65
Kontrol	69.23	30.76	92.3	7.69	80.48	19.51

Çizelge 4.1.8. SVCT sağlıklı meme epitel hücrelerine ait AO/PI boyama sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre yüzdeleri

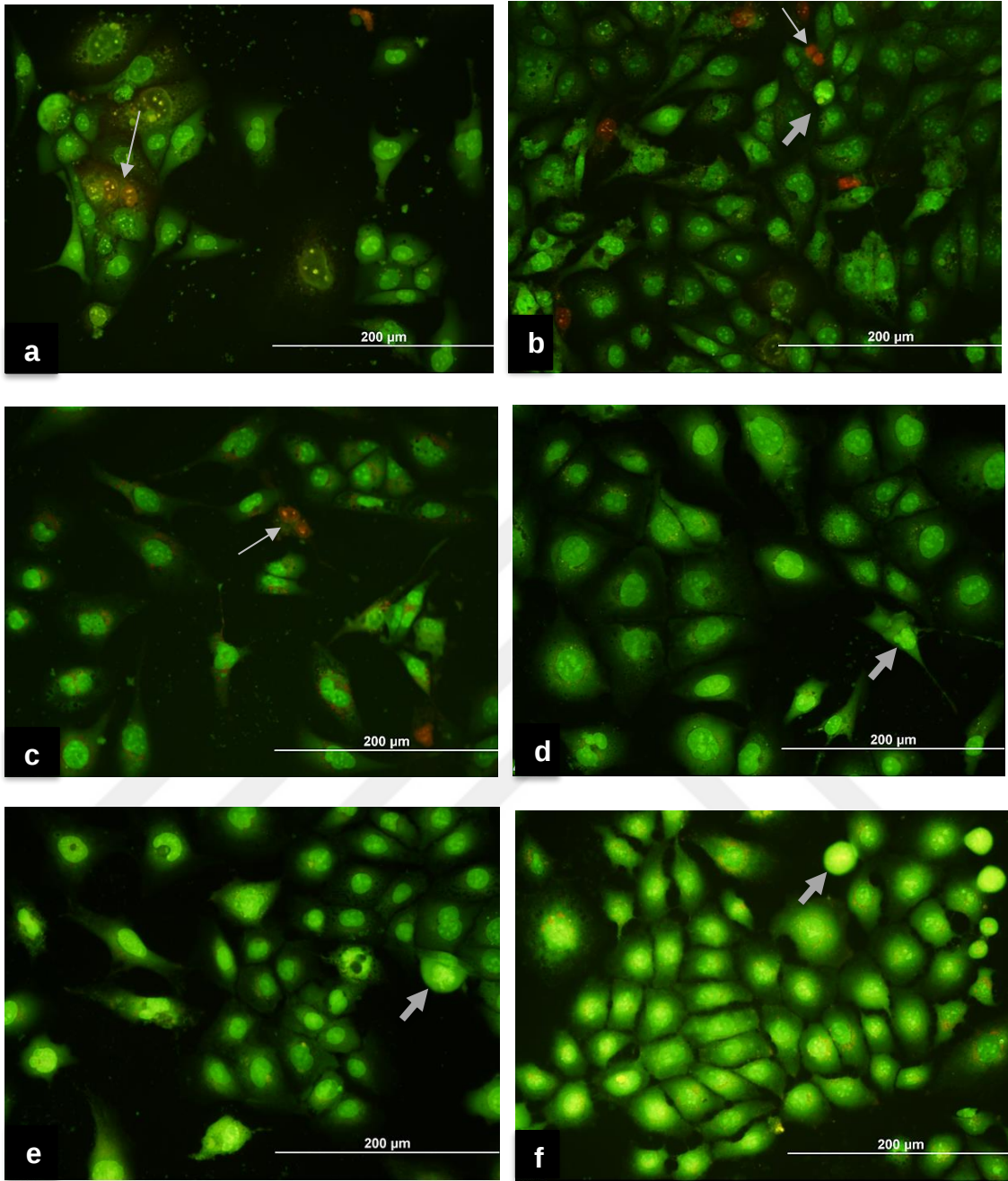
24. Saat



Şekil 4.1.2.10 24. saatte SVCT sağlıklı meme epitel hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

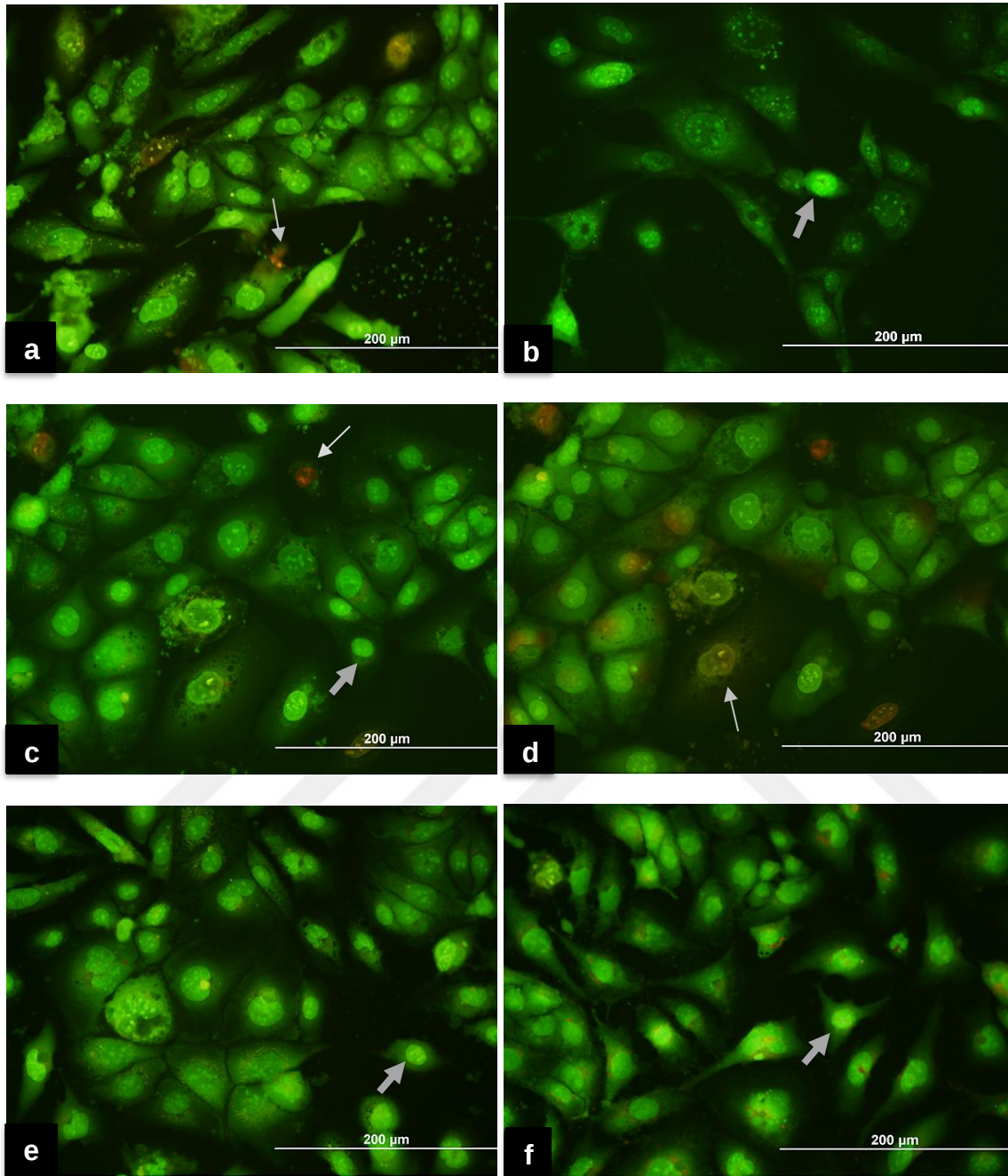
48. Saat



Şekil 4.1.2.11 48. saatte SVCT sağlıklı meme epitel hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler → Ölü hücreler → ile gösterilmiştir.

72. Saat



Şekil 4.1.2.12 72. saatte SVCT sağlıklı meme epitel hücrelerine ait AO/PI boyama görüntüleri (x40)

a. (1000 µg/ml), b. (250 µg/ml), c. (62.5 µg/ml), d. (15.62 µg/ml), e. (3.90 µg/ml), f. (Kontrol) Canlı hücreler  Ölü hücreler  ile gösterilmiştir.

Karragenan gıda endüstrisindeki yaygın kullanımının yanı sıra; birçok özelliğinden dolayı son on yılda ilaç teknolojilerinde de dikkat çekmiş olup, farmasötik ve medikal amaçlı kullanımı giderek yaygınlaşmakta [59], güçlü negatif yük özelliği sayesinde jel oluşturma ve viskozite özelliği kontrollü ilaç salınımı sistemlerinde tercih edilmesine imkan tanımaktadır [59]. Tüm dünyada ve ülkemizde artan kanser vakaları ve bunların tedavisinde yeni çözüm arayışları, karragenanın kanser tedavisinde de bir alternatif olabileceğini düşündürmekte, bu konuda çalışmalar yapılmaktadır.

Karragenanın kolay elde edilebilen, daha az toksik bir madde olması kanser çalışmalarında son zamanlarda tercih edilmesine sebep olmuştur [60]. Karragenan gıda endüstrisinde çikolatalı süt, süzme peynir, dondurma, yoğurt, ekşi krema gibi birçok süt ürünüde stabilize etme özelliğinden dolayı kullanılmaktadır [50]. Ticari ismi E407 dir. Karragenanın vizkosite özelliği yoğurt ürünlerinde kıvam artırıcı ve yoğurdun su tutulumunda önemli rol oynamaktadır [71]. Yoğurt üretiminde kullanılan karragenan miktarı %0.05- 0.6 aralığındadır [72]. Karragenanın günlük doz kullanımına ilişkin kesin bir bilgi olmamasına karşın 20-200 mg/gün olarak tahminler mevcuttur. Gıda ürünleri ile aldığımız karragenan miktarlarının moleküler ağırlıklarının düşük olması sebebiyle vücudumuzda emilim göstermeyip, gastrointestinal sistem ile vücudumuzdan dışarı atılmaktadır. Tez çalışmamızda kullandığımız en yüksek doz miktarı (1000µg/ml) günlük alınması gereken karragenan miktarı aralığından çok düşüktür.

Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen meme kanseri ve diğer bazı kanser tiplerinde karragenanın etkisinin incelendiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda artış görülmektedir. Kırmızı alg türü olan *Laurencia papillosa* ekstratının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksitesi XTT testi ile incelenmiş ve *Laurencia papillosa* ekstratının hücrelerin proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe edip, hücre canlılığında azalma meydana getirdiği ve apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır [60].

F. Namvar ve ark. yaptıkları bir çalışmada ise MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücre hatları üzerinde başka bir kırmızı alg türü olan *Eucheuma cottonii*'den elde edilen ekstraktın hücreler üzerindeki morfolojik ve sitotoksik etkilerini incelemiş, sonuçta karragenanın zamana ve doza bağlı olarak, hücre morfolojisinde değişikliğe yol açıp apoptotik hücre görünümünün belirginleştiğini (hücre büzülmesi, mikrovillus yapıların azalması veya kaybolması), hücre çoğalmasının baskılandığını göstermişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bu etkilerin daha belirgin olduğunu ve ekstraktın bu hücre tipinde daha sitotoksik etkiye neden olabileceği ifade etmişlerdir [34].

Literatürde karragenanın çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerinin incelendiği farklı çalışmalar da bulunmaktadır. E.S Prasedya ve ark. serviks kanser hücre hattı (HeLa) ve insan umbilikal ven endotel hücre hattı (HUVEC) hücre hatları üzerinde λ -karragenan ve k-karragenan etkileri ile ilgili yapmış oldukları çalışmada karragenanın hücre döngüsünün kontrolü üzerindeki etkisini incelemişler ve döngünün G1 ve G2/M evrelerinde baskılayıcı etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Bunun güçlü bir anti-proliferatif etkiye yol açarak anti-tümör etkisinin olabileceğini vurgulamışlardır [61].

G. Zhou ve ark. ise yaptıkları çalışmada hepatoselüler kanser hücresi- karaciğer tümörü (H22) hücre hattı kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki λ -karragenan örneklerinin H22 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir [63]. Aynı zamanda karragenanın molekül ağırlığının antitümör aktivitesi ile ilişkili olabileceği, molekül ağırlığının artmasına bağlı olarak sitotoksik etkisinin de arttığı sonucuna varmışlardır [63].

M. Luo ve ark. λ -karragenanın *in vitro* ve *in vivo* etkilerini aynı anda incelemişler ve karragenanın tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ve *in vivo* da bağışıklık sistemini düzenleyici etkisi olduğunu göstermişlerdir [62]. Bu çalışmada fare melanoma hücre hattı (B16-F10) ve fare meme tümör hücre hattı (4T1) tümör hücre hatlarında farklı dozlarda uygulanan karragenanın Trypan Blue ve MTT testi ile yaptıkları analizlerde hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Diğer yandan fare timik lenfoma (E.67-OVA) modelinde intratümöral karragenanın enjeksiyonunun tümör büyümesini inhibe edip, T yardımcı hücrelerinin bir grubu olan Th17 hücreleri tarafından salgılanan proinflammatuar IL17A ve TNF- α 'nın ekspresyonunu arttırdığı sonucuna varmışlardır [62].

Ayrıca λ -karragenanın oral veya intraperitoneal olarak uygulanması sonucunda da antitümör ve immünomodulator etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Karragenanın zamana ve doza bağlı etkisi incelendiğinde de 24. saatte yüksek dozda (1000 μ g/ml) düşük bir sitotoksik etkinin görüldüğü, 48 saat sonucunda bu etkinin bir miktar daha artış gösterdiği sonucuna varılmıştır [62].

Karragenanın farklı konsantrasyonlarının meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkilerinin incelendiği bu tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlarda konsantrasyonunun artmasıyla birlikte hücreler üzerinde toksik bir etkinin oluştuğunu; ancak bu etkinin hücre tipine ve zamana bağlı olarak bazı farklılıklar içerdiğini göstermiştir. Çalışmamızda inkübasyonun 24. saatinde MCF-7, SKBR-3 ve SVCT hücre hattının tüm konsantrasyonlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır, ancak MDA-MB-231 hücre hattında I. ve II. konsantrasyon ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunduğu, bu iki yüksek konsantrasyonda dahi hücre proliferasyonunun kontrol grubundan daha yüksek olduğu görülmüştür. İnkübasyonun 48. ve 72. saatlerine bakıldığında MDA-MB-231 için bu durumun devam ettiği ve yüksek konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunda bir azalma olmadığı görülmüştür. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulanan karragenan doz miktarları değerlendirildiğinde ise; en yüksek doz miktarının (1000 μ g/ml) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde herhangi bir baskılayıcı, hücresel canlılığında azalma ve morfolojik olarak bir değişiklik gözlenmemiştir. MCF-7 ve SKBR hücrelerinde inkübasyonun 48. se 72. saatlerinde kontrol grubu ile aralarında anlamlı farkın bulunduğu gruplarda hücre canlılığı kontrol grubundan daha yüksektir. MCF-7 hücre hattının III. ve IV. konsantrasyonları için bu durum geçerli olup; karragenanın düşük dozlarda kanser hücreleri üzerinde proliferasyonu arttırdığı ve zamana bağlı olarak ortamdaki çözünen karragenan miktarının artmasıyla birlikte bu etkinin artabileceği sonucuna varmak mümkündür. İnkübasyonun 72. saatinde SVCT hücrelerinin I., IV. ve V. konsantrasyonlarının kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlı olup, hücre canlılığı kontrol grubundan daha düşüktür.

Karragenanın belirlenen dozlarda MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3 meme kanseri hücre hatları ve sağlıklı meme epitel hücre hattı olan SVCT hücrelerinde zamana (24., 48. ve 72. saat) ve doza bağlı olarak gruplar arasındaki fark incelenmiştir.

24. Saatte tüm konsantrasyonların hücre hatları ile karşılaştırıldığı zaman I. ve II. konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunduğu, diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. III., IV. ve V. konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF-7 ve SVCT hücreleri arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır. Diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

48. Saatte I., II. ve V. konsantrasyonlarda MCF-7 / SKBR-3 meme kanseri hücreleri ve MCF-7 / MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır, diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. III. konsantrasyonda MCF-7 / SKBR-3 meme kanseri hücre hatları, IV. konsantrasyonda ise MCF-7 / MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunup, diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

72. saatte I. konsantrasyonda MCF-7 / SKBR-3, SKBR-3 / SVCT ve SVCT / MDA-MB-231 hücreleri arasında anlamlı bir fark bulunup, diğer hücreler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. II. ve III. konsantrasyonlarda MCF-7 / SKBR-3 ve SKBR-3 / SVCT hücreleri arasında anlamlı fark bulunmaktadır. IV. ve V. konsantrasyonlarda MCF-7 / SKBR-3 hücreleri arasında anlamlı bir fark bulunup, diğer hücre hatları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Bunun nedeni olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının ER (-), PR (-) ve HER (-) negatif olması sebebiyle en dirençli tipteki kanser hücre hattı olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm bu sonuçlar, karragenanın inkübasyonun devam eden günlerinde hem düşük hem de yüksek dozlarda sağlıklı epitel hücreleri üzerinde daha toksik bir etkiye yol açtığını söylemek mümkündür.

Çalışmamızda kullandığımız λ -karragenanın jel oluşturmamasına rağmen içermiş olduğu %32-39 ester sülfat grupları nedeniyle çözünürlüğü düşüktür. Bu nedenle besi ortamı içinde inkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte çözünen miktarının artmış olması ve buna bağlı olarak toksik etkisinin artmış olduğunu söylemek mümkündür. Literatürde λ -karragenan ile yapılan çalışmalar da karragenanın yüksek konsantrasyon ve devam eden inkübasyon sürelerinde sitotoksik etkisinin arttığını göstermektedir. M. Luo ve ark. her ne kadar farklı bir hücre kullanmış olsalarda kanser hücre hattında 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda λ -karragenanın 48. saatte sistotoksitesinin arttığını göstermişlerdir.

Karragenanın biyolojik etkileri, molekül ağırlığı, sülfat derecesi, glikozidik bağ yapısı, şeker türü ve yükü ile ilişkilidir [69]. Bu özellikleri sayesinde karragenan molekülünün yapısında bulunan 3,6-anhidroglaktoz birimlerinin tekrarı, şeker omurgasında bulunduğu konumu ve sülfatlaşma derecesi karragenanın etkililiği açısından önemli rol oynamaktadır. Düşük molekül ağırlığına sahip olan karragenanlarda özellikle λ -karragenanın sülfatlaşma seviyesi daha yüksektir. Bu nedenle karragenanın tümörlere karşı kullanılmasında tercih edilmektedir [70].

Sonuçlarımız hücre morfolojileri açısından değerlendirildiğinde ise, proliferasyon sonuçlarıyla uyumlu olarak karragenanın yüksek dozlarda ölü hücre ve apoptotik nükleus görüntüleri vermeye başladığı görülmüştür. AO/PI boyamalarda görülen ölü ve canlı hücre nükleusları sürecin bu yönde işlediğini göstermektedir. Apoptotik hücre ölümü, doğal bir hücre ölümü olup, ölen hücreler makrofajlar tarafından fagosite edilerek yok edildiği için çevre dokulara zarar vermeyen ve bu nedenle kanser ilaçlarının hazırlanmasında istenilen bir etkidir. Bu da karragenanın apoptotik sinyal yollarını indüklediği formülasyonlarının hazırlanmasıyla anti-tümör etkisinin farklı kanser türlerinde kullanılabilmesini mümkün kılacaktır.

Karragenanın farklı biyolojik formları ve bunların farklı konsantrasyonları farklı kanser hücre tipleri ve sağlıklı hücre tipi üzerinde farklılık göstermektedir. Ancak burada önemli olan bir başka konu karragenanın anti-tümör etkilerinde hangi sinyal yollarını kullandığını bilinmesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar karragenan molekülünün anti-tümör etkilerinin sinyal yolu düzeyinde mekanizmasını araştırmaya yöneliktir. Tüm meme kanseri hücrelerinde Notch reseptörleri ve reseptör tirozin kinaz miktarlarının aşırı ifadesinin olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür.

İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 1 (HER1) ve insan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2) yapılarının aşırı miktarda sentezlenmesi sonucunda hücre içi ikinci haberci mekanizmaları aktive edilmekte, bu da meme kanserinin meydana gelmesi ve apoptozun engellenmesinde rol oynamaktadırlar [36].

Fosfotidilinozitol kinaz (PI3K) / Protein kinaz B (Akt) /Mtor sinyal yolu meme kanseri de dahil tüm kanser türlerinde metastaz, proliferasyon, apoptozun engellenmesi gibi olaylar sonucunda kanserin oluşmasını ve kanser ilaçlarına karşı bir direnç mekanizmasının meydana gelmesine sebep olur [64]. Özellikle bu sinyal yolunun aktive edilmesindeki önemli faktörler; reseptör tirozin kinazların aşırı uyarılması, fosfataz & tensin homolog (PTEN) yapısının kaybı, Mtor ve Akt miktarlarındaki artış olarak söylenebilir [65,66].

mTORC1 ve mTORC2 olarak iki farklı protein türünü içerisinde bulunduran mTOR PI3K/Akt /Mtor sinyal yolu için önemli bir molekül olup, Bcl-xl, c-myc, Bcl-2 genlerin aşırı miktarda uyarılarak kanserin meydana gelmesinde önemli rol oynar [67]. Kanser meydana gelmesinde, gelişmesinde etkili bir rol alan PI3K / Akt /Mtor, Notch sinyal yollarının günümüzdeki kanser tedavisi açısından önemli bir yere sahiptir. Sinyal yolları üzerinde etkili olabilecek inhibitörlerin daha düşük toksik etkiye sahip, kolay elde edilebilen ve doğal özellik gösteren maddelerle birlikte kanser tedavisinde kullanılmasının daha etkili sonuçlar verebileceği öngörülmektedir [68].

Bu anlamda karragenanın özellikle hücre proliferasyonu ve döngüsüyle ilgili etkilerinin incelendiği çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin; E.S Prasedya ve ark. serviks kanser hücre hattı (HeLa) ve insan umbilikal ven endotel hücre hattı (HUVEC) hücre hatları üzerinde λ -karragenan ve k-karragenan etkileri ile ilgili yapmış oldukları çalışmada karragenanın hücre döngüsünün kontrolü üzerindeki kontrolünü incelemişler, döngünün G1 ve G2/M evrelerinde baskılayıcı etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Bu şekilde güçlü anti-proliferatif etkisinin olabileceğini düşünmüşlerdir.

Bu şekilde yapılacak olan çalışmalar ile meme kanserinin aktif olarak kullandığı sinyal yolları bloke edilerek hücre bölünmesinin engellenmesi, hastalığın metastaz yaparak diğer dokulara yayılması baskılanabilir. Karragenanın farklı formlarının bu şekilde farklı yollar üzerinde etkili olabileceğinin öngörülmesi, doğal bir ürün olan karragenanın kanserde ilaç ile tedavi yaklaşımları için umut vaad edici olabilir.

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar da karragenanın farklı dozlarda ve hücreler ile muamele süresine bağlı olarak hücre morfolojisi ve proliferasyonu üzerinde etkisinin olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda farklı kanser hücre tipleri ve sağlıklı epitel hücreleri ile yaptığımız analizlerde hücre canlılığının zamana bağlı olarak, farklı hücre grupları için oldukça değişken olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak tüm sonuçlarımız incelendiğinde aşağıdaki değerlendirmeleri yapmak mümkündür:

- Karragenanın MDA-MB-231 hücreleri hariç, MCF-7, SKBR ve SVCT hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkisi vardır. Ancak bu sitotoksik etki yüksek dozda ve inkübasyonun 48. ve 72. saatlerinde daha belirgindir.
- Karragenanın MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yüksek dozda bile sitotoksik bir etkisinin görülmemesi, bu hücre tipinin en dirençli kanser türünden elde edilmiş bir hücre hattı olması şeklinde yorumlanabilir.
- İnkübasyonun ilerleyen zamanlarında sitotoksik etkinin artmasına rağmen, MCF-7 ve SKBR hücre hatlarında düşük karragenan konsantrasyonları hücre canlılığını olumlu yönde arttırmıştır. Bu da karragenan derişiminin kritik olduğu ve düşük dozlarda ve hafif seyreden kanser tiplerinde aksine hücre büyümesini teşvik edebileceği şeklinde yorumlanabilir.
- Çalışmamızda kullandığımız λ -karragenan, suda çözünbilmesine rağmen, içerdiği ester sülfat grupları nedeniyle çözünürlüğü diğer gruplara göre nispeten düşüktür. Bu da kültür ortamında kaldığı sürece ortamdaki çözünür miktarın artmasına ve buna bağlı olarak etkisinin (olumlu/olumsuz) artmasına yol açmaktadır.
- İnkübasyonun 72. saatine gelindiğinde ise sağlıklı meme epitel hücrelerinde düşük dozlarda bile bir sitotoksik etkinin ortaya çıktığı görülmüştür ki bu da karragenan konsantrasyonunun son derece önemli olduğunu ve tedavilerde hiç istenmeyen sağlıklı hücre ölümlerinin de ortaya çıkabileceği sonucunu düşündürmektedir.

Bütün bu değerlendirmeler ışığında, çok fazla tipinin olması ve kolay elde edilebilir bir ürün olmasına rağmen karragenanın, hem sağlıklı hem de kanser hücreleri üzerinde farklı etkiler göstermesi nedeniyle dikkatle incelenmesi gereken bir madde olduğu söylenebilir. Bu nedenle, gıda endüstrisinde olduğu gibi, sağlık alanında da yaygın olarak kullanılabilmesi ya da kanser tedavilerinde yeni bir yaklaşım olarak düşünülebilmesi için çok daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışma ile sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1]. Anonim, What is cancer? National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov> - (Erişim Tarihi: **10 Eylül 2019**)
- [2]. A. Goldhirsch, J.H. Glick, R.D. Gelber, .S. Coates, B. Thürlimann, H.J. Senn, K.S. Albain, J.Bergh, M.Castiglione-Gertsch, A.Costa, J.Cuzick, N.Davidson, J.F. Forbes, P.Goss, J.Harris, A.Howell, J.N. Ingle, R.Jakesz, J.Jassem, M.Kaufmann, M.Martin, L.Mauriac, M.Morrow,H.T. Mouridsen, M.Namer, M.J.Piccart-Gebhart, K.Possinger, K.Pritchard, E.J.T. Rutgers, G.Viale, A. Wallgren and W.C. Wood, Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005, Ann.Oncol., 16 (**2005**)1569-1583.
- [3]. F.H. Demirelli, Hedefe Yönelik Kanser Tedavisi ve Monoklonal Fuat H. Demirelli, 19 (**2005**) 123-125.
- [4]. T. Meyer and I.R. Hart, Mechanisms of tumour metastasis. Eur J Cancer, **1998**; 34: 214-221.
- [5]. A. Gheldof and G. Berx, Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. Prog Mol Biol Transl Sci., **2013**; 116: 317-36.
- [6]. L. Khalique, A. Ayhan, M.E. Weale, I.J. Jacobs, S.J. Ramus and S.A. Gayther, Genetic intra-tumour heterogeneity in epithelial ovarian cancer and its implications for molecular diagnosis of tumours, J. Pathol, 211 (**2007**) 286–295.
- [7]. Anonim, Kutluk T, Kars A. Kanser konusunda genel bilgiler. <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/kanser.pdf> (Erişim Tarihi: **11 Temmuz 2013**).
- [8]. A. Hemminki and K. Hemminki, The Genetic Basis of Cancer, in: Cancer Gene Ther., Humana Press, (**2007**) 9–18.
- [9]. D. Hanahan and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, Cell, 100 (**2000**) 57–70.
- [10]. T. Onat, K. Emerk and EY. Sözmén, İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme yayıncılık (**2002**) 569-75.
- [11]. G.Y. Wiederschain, The metabolic and molecular bases of inherited disease, Biochem, 67 (**2002**) 611.

- [12]. M. Labazi and A.C. Phillips, Oncogenes as regulators of apoptosis, *Essays Biochem*, 39 (2003) 89–104.
- [13]. P.G. Corn and W.S. El-Deiry, Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis, *BioEssays*, 24 (2002) 83–90.
- [14]. B. Kopnin, Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors, key for mechanism of carciogenesis, *Biochemistry*, 65 (2000) 2–27.
- [15]. E. Atmaca and A. Aksoy, Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg*, 20 (2014) 79–83.
- [16]. B. Yokuş and D. Ülker Çakır, *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1 (2012) 7–18.
- [17]. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre and A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Cancer J. Clin*, 68 (2018) 394–424.
- [18]. V.E. Velculescu, Defining the blueprint of the cancer genome, *Carcinogenesis*, 29 (2008) 1087–1091.
- [19]. C. Turnbull, N. Rahman, Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*, 9 (2008) 321–345.
- [20]. L. Tryggvadottir, E.J. Olafsdottir, S. Gudlaugsdottir, S. Thorlacius, J.G. Jonasson, H. Tulinius and J.E. Eyfjord, BRCA2 mutation carriers, reproductive factors and breast cancer risk., *Breast Cancer Res*, 5 (2003).
- [21]. H. Vidarsson, E.K. Mikaelisdottir, T. Rafnar, D. Bertwistle, A. Ashworth, J.E. Eyfjord and S. Valgeirsdottir, BRCA1 and BRCA2 bind Stat5a and suppress its transcriptional activity, *FEBS Lett*, 532 (2002) 247–252.
- [22]. A. Bahrami, S.M. Hassanian, M. Khazaei, M. Hasanzadeh, S. Shahidsales, M. Maftouh, G.A. Ferns and A. Avan, The Therapeutic Potential of Targeting Tumor Microenvironment in Breast Cancer: Rational Strategies and Recent Progress, *J. Cell. Biochem*, 119 (2018) 111–122.
- [23]. L. Vannucci, Stroma as an Active Player in the Development of the Tumor Microenvironment, *Cancer Microenviron*, 8 (2015) 159–166.

- [24]. D.L. Holliday and V. Speirs, Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast Cancer Res*, 13 **(2011)**.
- [25]. K. David Voduc, M.C.U. Cheang, S. Tyldesley, K. Gelmon, T.O. Nielsen and H. Kennecke, Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse, *J Clin Oncol*. 28 **(2010)** 1684–1691.
- [26]. Anonim, O. Metzger-Filho, Z. Sun, G. Viale, K.P.-J. of C., undefined 2013, Patterns of recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node–negative disease: results from International Breast Cancer Study, *Ncbi.Nlm.Nih.Gov*.(n.d.).
- [27]. Anonim, T. Foukakis, J.B.- UpToDate, undefined 2013, Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer, *Uptodate.Com*. (n.d.). <https://www.uptodate.com> (Erişim Tarihi: **10 Eylül 2019**).
- [28]. E.T. Warner, K.V. Ballman, C. Strand, J.C. Boughey, A.U. Buzdar, L.A. Carey, W.M. Sikov and A.H. Partridge, Impact of race, ethnicity, and BMI on achievement of pathologic complete response following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a pooled analysis of four prospective Alliance clinical trials (A151426), 159 **(2016)** 109-118.
- [29]. C. Fan, D.S. Oh, L. Wessels, B. Weigelt, D.S.A. Nuyten, A.B. Nobel, L.J. Van't Veer and C.M. Perou, Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer, *N. Engl. J. Med*, 355 **(2006)** 560–569.
- [30]. Anonim, Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon, *Ncbi.Nlm.Nih.Gov*. (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Erişim Tarihi: **10 Eylül 2019**).
- [31]. H.D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert and M. Brennan, A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the national cancer institute*, 51(5), **(1973)**, 1409-1416.
- [32]. C. Mcneil In search of the perfect SERM: beyond tamoxifen and raloxifene. *J Natl Cancer Inst*, **1998**; 90: 956-7.
- [33]. A.S. Levenson and V. Craig, MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer, *Cell Line*, **1997**.

- [34]. F. Namvar, S. Mohamed, S.G. Fard, J. Behravan, N.M. Mustapha, N.B.M. Alitheen and F. Othman, Polyphenol-rich seaweed (*Eucheuma cottonii*) extract suppresses breast tumour via hormone modulation and apoptosis induction, *Food Chem.* 130 (2012) 376–382.
- [35]. D.J. Adelstein, ed., *Squamous Cell Head and Neck Cancer*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005.
- [36]. G. Salhia, H. Zbakha, H. Moussaa, , M. Hassouna, V. Bochkovb, C.J. Ciudadc, V. Noéc and H. Riadia, Antitumoral and anti-inflammatory activities of the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*, *European Journal of Integrative Medicine* 18 (2018) 66-74.
- [37]. F. Guan, Y. Ding, Y. Zhang, Y. Zhou, M. Li, C. Wang, Curcumin suppresses proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through autophagy-dependent Akt degradation, *PLoS One.* 11 (2016).
- [38]. M. Jazzara, A. Ghannam, C. Soukkarieh and H. Murad, Anti-proliferative activity of λ -carrageenan through the induction of apoptosis in human breast cancer cells. *Iranian journal of cancer prevention*, 9(4) (2016).
- [39]. Anonim, <https://www.sigmaaldrich.com> (n.d.). (Erişim Tarihi: 10 Eylül 2019).
- [40]. K. Powell, P. Low, P.A. McDonnell, E.L. Laakso and S.J. Ralph, The effect of laser irradiation on proliferation of human breast carcinoma, melanoma, and immortalized mammary epithelial cells. *Photomedicine and laser surgery*, 28(1) (2010) 115-123.
- [41]. S. Knutsen, D. Myslabodski, B. Larsen and A.I. Usov. Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans, *Botanica Marina*, 37, (1994) 163-169.
- [42]. R. Pangestuti, S.K.-A. in food and nutrition research, undefined 2014, *Biological activities of carrageenan*, Elsevier. (n.d.).
- [43]. M. Lahaye, Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry, *J. Appl. Phycol*, 13 (2001) 173–184.

- [44]. H.J. Bixler, The Carrageenan Connection IV, Br. Food J, 96 **(1994)** 12–17.
- [45]. Anonim, P.P.B. técnico C.P.Q. S/A, undefined **1985**, Aplicação de extratos de algas marinhas na indústria de alimentos, <https://core.ac.uk/reader> (n.d.).
- [46]. Anonim, AlgaeBase, World-wide electronic publication, National university of Ireland, Galway, <https://www.algaebase.org> **(2010)** (n.d.)
- [47]. Carrageenans Norman F. Stanley Marine Colloids Division, FMC Corporation, Bio Products Department, Rockland, Maine 04841, USA **(1990)** (79-80)
- [48]. L. Li, R. Ni, Y. Shao and S. Mao, Carrageenan and its applications in drug delivery. Carbohydrate polymers, 103 **(2014)** 1-11.
- [49]. Anonim, D.M.F. and A.O. of the United, undefined **2003**, A guide to the seaweed industry FAO Fisheries Technical Paper 441, Sidalc.Net. (n.d.). <http://www.sidalc.net>.
- [50]. J. Necas and L. Bartosikova, Carrageenan: a review, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic, Veterinarni Medicina, 58, **(2013)** (4): 187–205.
- [51]. M.S. Pereira, B. Mulloy, P.A.S. Mourã, Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans Comparison between the regular, repetitive and linear fucans from echinoderms with the more heterogenous and branched polymers from brown algae, **1999**.
- [52]. V. Grauffel, B. Kloareg, S. Mabeau, P.D.- Biomaterials, undefined **1989**, New natural polysaccharides with potent antithrombic activity: fucans from brown algae, Elsevier. (n.d.).
- [53]. T. Nishino, G. Yokoyama, K. Dobashi, M.F.C., undefined **1989**, Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant, Elsevier. (n.d.).

- [54]. W.R.L. Farias, A.-P. Valente, M.S. Pereira, P.A.S. Mourã, Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates, *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), **(2000)** 29299 -29307.
- [55]. G. Jiao, G. Yu, J. Zhang and H.S. Ewart, Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae, *Marine Drugs*, **2011**, 9(2), **(2011)** 196-223;
- [56]. D. Chen, X. Wu, Z.W.-P. medica, undefined **2008**, Sulfated polysaccharides and immune response: promoter or inhibitor?, *Europepmc.Org.* (n.d.).
- [57]. M. Haijin, J. Xiaolu and G. Huashi, A κ -carrageenan derived oligosaccharide prepared by enzymatic degradation containing anti-tumor activity, *J. Appl. Phycol.* 15 **(2003)** 297–303.
- [58]. G. Zhou, W. Sheng, W. Yao, C.W.-P. research, undefined **2006**, Effect of low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu, Elsevier.
- [59]. S.K. Kim, M.Z. Karagozlu, Marine algae. Natural product source for gastrointestinal cancer treatment, in: *Adv. Food Nutr. Res.*, Academic Press Inc., **(2011)** 225–233.
- [60]. A. Ghannam, H. Murad, M. Jazzara, A.Odeh, A. W. Allaf, Isolation, Structural characterization, and antiproliferative activity of phycocolloids from the red seaweed *Laurencia papillosa* on MCF-7 human breast cancer cells **(2017)**.

- [61]. E.S. Prasedya, M. Miyake, D. Kobayashi, A. Hazama, Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by FUCCI imaging, BMC Complement. Altern. Med, 16 **(2016)**.
- [62]. M. Luo, B. Shao, W. Nie, X. Wei, Y. Li, B.W.S., Antitumor and adjuvant activity of λ -carrageenan by stimulating immune response in cancer immunotherapy, Nature.Com. **(2015)** .
- [63]. G. Zhou, Y. Sun, H. Xin, Y. Zhang, Z. Li, Z.X.-P. research, In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambdacarrageenans from Chondrus ocellatus, Elsevier **(2004)**.
- [64]. K.K. Wong, J.A. Engelman and L.C. Cantley Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. Current Opinion in Genetics & Development, 20(1), **(2010)**. 87-90.
- [65]. P. Liu, H. Cheng, T.M. Roberts and J.J. Zhao Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nature Reviews Drug Discovery, 8(8), **(2009)**. 627-44
- [66]. J. Luo, B.D. Manning and L.C. Cantley Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. Cancer Cell, 4(4), **(2003)**. 257-62.
- [67]. D.A. Guertin and D.M. Sabatini Defining the role of mTOR in cancer. Cancer Cell, 12(1), **(2007)**. 9-22.
- [68]. F.Meric-Bernstam and A.M. Gonzalez-Angulo Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. Journal of Clinical Oncology : Official Journal of The American Society of Clinical Oncology, 27(13) **(2009)**, 2278-87.
- [69]. W. Liang, X. Mao, X. Peng and S. Tang, Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity, Carbohydr. Polym. 101 **(2014)** 776-785.

- [70]. M.Khotimchenkoa, V. Tiaso, A. Kalitnik, M. Begun, R. Khotimchenko, E. Leonteva, I. Bryukhovetskiy and Y. Khotimchenko, Antitumor potential of carrageenans from marine red algae, Carbohydrate Polymers, **(2020)**, 116568.
- [71]. M. Demirci and O. Şimşek, Süt İşleme Teknolojisi. Hasad Yayıncılık LTD., İstanbul **(1997)**.
- [72]. A.Y. Tamime and R.K. Robinson, Yoghurt: science and technology. 2nd Edition, Woodhead, Cambridge **(1999)**.

