

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜLFATLANMIŞ POLİSAKKARİT FUCOİDAN'IN MEME KANSERİ HÜCRE
HATTI MCF-7'DE KAVEOLİN-1 DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Dilara ÇAKMAK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SÜLFATLANMIŞ POLİSAKKARİT FUCOİDAN'IN MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MCF-7'DE KAVEOLİN-1 DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Dilara ÇAKMAK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser türlerinden biri olup, erken teşhis hayatta kalma şansını önemli ölçüde artırmaktadır. Geleneksel sitotoksik tedavi yöntemlerinin ciddi yan etkileri, hedefe yönelik ve doğal bileşiklerle kombinlenen tedavi yaklaşımlarının önemini artırmaktadır. Bu çalışmada, sülfatlanmış bir polisakkarit olan fucoidanın, MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki antikanser özellikleri ve kaveolin-1 proteininin ekspresyon düzeylerine olan etkileri araştırılmıştır. Fucoidan ve pozitif kontrol grubu olarak kullanılan kemoterapötik ajan tamoxifenin sitotoksik etkileri, MTT analizi ile değerlendirilmiş ve her iki maddenin doza bağlı sitotoksik etkiler gösterdiği, yüksek dozlarda ise hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. 72 saat sonunda IC50 değerleri fucoidan için 1.174 µg/mL, tamoxifen için ise 9.76 µg/mL olarak belirlenmiştir. LDH analizi, her iki maddenin de hücre membran bütünlüğünü bozarak hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir. Kaveolin-1 proteininin ekspresyon seviyeleri ELISA yöntemiyle incelenmiş ve fucoidan ile tamoxifenin bu proteinin ekspresyonunu anlamlı şekilde azalttığı bulunmuştur. Apoptotik aktivite, caspase 3/7 aktivite analizi ile değerlendirilmiş, tamoxifenin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir aktivite gösterdiği, ancak fucoidanın anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, fucoidanın caspase 3/7 enzimlerinden bağımsız, alternatif sinyal yolları kullanabileceğine işaret etmektedir. Hücrelerin hayatta kalma ve proliferasyon kapasitelerini incelemek için yapılan koloni oluşum testi, fucoidanın koloni sayısını %61,92, tamoxifenin ise %33,97 oranında azalttığını ortaya koymuştur. Metastaz potansiyelini inceleyen hücre migrasyon analizi ise fucoidanın hücre göçünü %43,9, tamoxifenin ise %50,36 oranında inhibe ettiğini göstermiştir. Sonuç olarak, bu çalışma, fucoidanın kaveolin-1 ekspresyonunu baskılayarak tümör progresyonu üzerinde etkili olabileceğini ve doğal bir bileşik olarak terapötik bir potansiyel taşıyabileceğini göstermektedir.

Aralık 2024, 79 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, Kaveolin-1, Fucoidan, Apoptoz, MCF-7 hücre hattı

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECT OF FUCOIDAN, A SULFATED POLYSACCHARIDE, ON CAVEOLIN-1 LEVELS IN BREAST CANCER CELL LINE MCF-7

Dilara ÇAKMAK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Breast cancer is one of the most common cancer types among women, and early diagnosis significantly improves survival rates. The severe side effects of traditional cytotoxic treatment methods have highlighted the importance of targeted therapies combined with natural compounds. In this study, the anticancer properties of fucoidan, a sulfated polysaccharide, and its effects on the expression levels of caveolin-1 protein were investigated in the MCF-7 breast cancer cell line. The cytotoxic effects of fucoidan and the chemotherapeutic agent tamoxifen, used as a positive control, were evaluated using an MTT assay. Both compounds demonstrated dose-dependent cytotoxic effects, significantly reducing cell viability at higher concentrations. The IC₅₀ values after 72 hours were determined to be 1.174 µg/mL for fucoidan and 9.76 µg/mL for tamoxifen. LDH analysis revealed that both substances disrupted cell membrane integrity, leading to cell death. Caveolin-1 protein expression levels were examined using an ELISA method, and both fucoidan and tamoxifen were found to significantly reduce its expression. Apoptotic activity was assessed through caspase 3/7 activity analysis, which showed that tamoxifen exhibited significant activity compared to the control group, while fucoidan had no significant effect. This suggests that fucoidan may utilize alternative signaling pathways independent of caspase 3/7 enzymes. A colony formation assay conducted to evaluate cell survival and proliferation capacities revealed that fucoidan reduced colony numbers by 61.92%, while tamoxifen reduced them by 33.97%. Furthermore, a cell migration assay examining metastasis potential demonstrated that fucoidan inhibited cell migration by 43.9%, while tamoxifen achieved an inhibition rate of 50.36%. In conclusion, this study suggests that fucoidan may exert an effect on tumor progression by suppressing caveolin-1 expression and holds therapeutic potential as a natural compound.

December 2024, 79 pages

Key words: Cancer, Caveolin-1, Fucoidan, Apoptosis, MCF-7 cell line

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bilimsel araştırmalar, bilgiye olan derin bağlılığı ve nesnelliğiyle insanlık tarihinin en değerli katkılarını sunar; bu süreçte destek veren her birey, bu bilgiyi ileriye taşıyan birer mimar olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda öncelikle,

Yüksek lisans sürecim boyunca, bana sadece akademik anlamda değil, aynı zamanda kişisel gelişim olarak da büyük destek sağlayan, yol gösterici tavsiyeleri, ilgisi, moral, motivasyonu ve teşvikleriyle bana her anlamda destek olan ve rehberlik eden değerli danışmanım Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ'a,

Bu öğretici süreçte deneylerim için laboratuvarını bana açan, sağladığı bilgi ve yönlendirmeleri için minnettar olduğum ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan Prof. Dr. Fadime KIRAN'a,

Başta Buse SAFRANCI olmak üzere deney sürecimi çok daha verimli ve keyifli hale getirip yardımlarını esirgemeyen Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarı'nın tüm öğrencilerine,

Bu uzun yolculuk boyunca bana verdikleri destek, motivasyon ve sevgi ile çalışmamı başarılı bir şekilde tamamlamama yardımcı olan Sevgili Ailem; Mustafa ÇAKMAK, Naime ÇAKMAK ve canım kardeşim Sümeyra ÇAKMAK'a,

Son olarak hayallerine ve hedeflerine ulaşmak için yılmadan ve kararlılıkla ilerleyen kendime sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından sağlanan FYL-2023-3109 no'lu proje desteği ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, TÜBİTAK 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı sayesinde araştırma sürecinde finansal destek alınmıştır. Her iki destek de bu çalışmanın başarıyla tamamlanmasında önemli katkılarda bulunmuştur. Destek veren kurumlara teşekkürlerimi sunarım.

Dilara ÇAKMAK
Ankara, Aralık 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Kanser	3
2.2 Meme Kanseri.....	6
2.2.1 Genel özellikleri.....	6
2.2.2 Meme kanserinin nedenleri.....	7
2.2.3 Meme kanseri çeşitleri	7
2.2.4 Meme kanseri evreleri	9
2.2.5 Meme kanserinin moleküler biyolojisi	11
2.2.6 Meme kanseri tedavi yöntemleri	12
2.2.6.1 Cerrahi tedavi.....	12
2.2.6.2 Radyoterapi	13
2.2.6.3 Kemoterapi	13
2.2.6.4 Hormonal terapi.....	13
2.2.6.5 Hedefe yönelik tedavi.....	14
2.2.6.6 İmmünoterapi.....	15
2.3 Sülfatlanmış Polisakkaritler.....	16
2.4 Fucoidan Tanımı ve Tarihçesi	19
2.4.1 Fucoidan yapısı ve özellikleri	20
2.4.2 Fucoidanın kullanım alanları ve kanserle ilişkisi.....	22
2.5 Kaveolin-1 Proteini Yapısı ve Özellikleri.....	24
2.5.1 Tümör baskılayıcı rolü ve kanserle ilişkisi	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26

3.1 Materyal	26
3.1.1 MCF-7 hücre hattı ve özellikleri	27
3.1.2 Kullanılan cihazlar Cihaz olarak: CO ₂ 'li inkübatör (Nüve, Türkiye), Santrifüj (Nüve,	28
3.1.3 Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	28
3.2 Yöntem	28
3.2.1 Hücre kültürü	28
3.2.1.1 Hücre sayımı	29
3.2.2 Fucoidan ve Tamoxifen muamelesi	30
3.2.3 Hücre canlılık testi	30
3.2.4 Sitotoksosite analizi	32
3.2.4.1 Örnek hazırlığı	32
3.2.4.2 Reaktif hazırlığı	33
3.2.5 Apoptoz analizi	34
3.2.5.1 Örnek hazırlığı	35
3.2.5.2 Reaktif hazırlığı	35
3.2.5.3 Caspase 3/7 enzim aktivite analizi	36
3.2.6 Kaveolin-1 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi	36
3.2.6.1 Örnek hazırlığı	37
3.2.6.2 Reaktif hazırlığı	37
3.2.6.3 Kaveolin-1 ekspresyon analizi deney prosedürü	38
3.2.7 Koloni oluşum testi	38
3.2.8 Hücre göçü analizi	39
3.2.9 İstatistiksel analizler	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.1 Fucoidanın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	40
4.1.2 IC ₅₀ değerinin belirlenmesi	47
4.2 Sitotoksosite Analizi Sonuçları	48
4.3 Fucoidanın Kaveolin-1 Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	50
4.4 Apoptotik Etkinin Belirlenmesi	54
4.5 Fucoidanın MCF-7 Hücre Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi	56
4.6 Fucoidanın MCF-7 Hücre Göçü Üzerine Etkisi	59
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	79

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	G kuvveti
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
Mw	Moleküler ağırlık
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Santigrat (Celcius) derece
U	Ünite

Kısaltmalar

AC-DEVD-pNA	Asetil-Aspartik asit-Glutamik asit-Valin-Aspartik asit-p-Nitroanilin
AKT	Protein Kinaz B
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CO ₂	Karbon dioksit
DCIS	Duktal İn Situ Karsinom
dH ₂ O	Distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit;
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmunosorbent Test
Enos	Endotelyal nitrik oksit sentaz
ERK	Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinazlar

ER	Östrojen Reseptör
FBS	Fetal Bovine Serum
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horseradish Peroxidase
IC50	Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
JAK/STAT	Janus kinaz sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
LCIS	Lobüler İn Situ Karsinom
LDH	Laktat dehidrogenaz
MapK	Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazlar
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
miRNA	MikroRNA
mTOR,	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
ncRNA	Non-kodlayıcı RNA
OD	Optik Yoğunluk, Absorbans
PARP	Poli ADP-Riboz Polimeraz
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PD-1	Programlı ölüm reseptörü 1
PE	Plating Efficiency
PI3K	Fosfoinozid 3-kinazlar
pNA	Peptit Nükleik Asit
PR	Progesteron Reseptör
PTEN	Protein tirozin fosfotaz ve tensin homologu
RAS	Retiküler aktivasyon sistemi
SARS-CoV-2	Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsü 2
SERM	Selektif östrojen reseptör modülatörleri
SP	Sülfatlanmış Polisakkarit
Src kinaz	Sarkoma ile ilişkili kinaz
TMB	TetraMetilBenzidin
TNBC	Triple-negatif Meme Kanseri
TNM	Tümör, Nod, Metastaz
TP53	Tümör proteini 53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 2022 yılında kanser türlerine göre tahmini kanser insidansı	3
Şekil 2.2 2022 yılında kıtalara göre tahmini kanser ölüm sayısı	4
Şekil 2.3 Kanser özellikleri	5
Şekil 3.1 MCF-7 meme kanseri hücrelerinin inverted mikroskop altında 10x büyütme ile elde edilen görüntüsü	26
Şekil 3.2 MCF-7 hücrelerine uygulanan MTT testinde (a) 24 saat, (b) 48 saat, (c) 72 saat inkübasyon sonrası 96 kuyulu plaka görüntüleri ve formazan oluşumu	32
Şekil 4.1 24 saatte Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler	41
Şekil 4.2 48 saatte Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler	42
Şekil 4.3 72 saatte Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler	43
Şekil 4.4 Yeni dozlar ile deney tekrarı yapıldıktan sonra 72 saatte Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler	45
Şekil 4.5 GraphPad Prism 10.0.1 programı ile fucoïdan ve tamoxifenin IC50 değerlerinin hesaplanması	48
Şekil 4.6 MCF-7 hücre hattında LDH enzim aktivite deney sonucu	49
Şekil 4.7 MCF-7 hücre hattında Kaveolin-1 ekspresyon düzeyleri belirleme deney sonucu	51
Şekil 4.8 MCF-7 hücre hattında Caspase 3/7 enzim aktivite deney sonucu	55
Şekil 4.9 Kristal viyole ile boyanmış koloni görüntüleri	57
Şekil 4.10 Fucoïdan ve tamoxifenin MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi	57
Şekil 4.11 Fucoïdan ve tamoxifenin MCF-7 hücrelerinde koloni oluşturma yeteneği ...	58
Şekil 4.12 MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 1.174 µg/mL fucoïdan ve 9.76 µg/mL tamoxifen uygulamalarının hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin mikroskop altında görüntülenmesi	60
Şekil 4.13 MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı olarak kontrol, fucoïdan ve tamoxifenin hücre migrasyonuna etkisi	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 MCF-7 hücre hattında, farklı konsantrasyonlarda Fucoïdan ve Tamoxifen'in 24, 48 ve 72 saatte ölçülen absorbands değeri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 3)	44
Çizelge 4.2 MCF-7 hücre hattında, farklı konsantrasyonlarda Fucoïdan ve Tamoxifen'in 72 saatte ölçülen absorbands değeri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 3)	46
Çizelge 4.3 LDH Enzim aktivite deneyi standart grafiği	49
Çizelge 4.4 Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında LDH enzim aktivitesi üzerindeki etkileri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 3)	50
Çizelge 4.5 Kaveolin-1 Ekspresyon ELISA deneyi standart grafiği	51
Çizelge 4.6 Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında Kaveolin-1 proteini ekspresyon düzeylerine olan etkileri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 2)	52
Çizelge 4.7 Caspase 3/7 Enzim aktivite deneyi standart grafiği	54
Çizelge 4.8 Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında Caspase 3/7 enzim aktivitesi üzerindeki etkileri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 2)	55
Çizelge 4.9 Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında koloni oluşumu üzerindeki etkileri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 2)	58
Çizelge 4.10 Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkileri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 2)	59

1. GİRİŞ

Kanser, ekonomik olarak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde hala önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan ve anaplastik hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize çeşitli hastalık gruplarını temsil eden patolojik bir durumdur (Doglioni vd. 2019). Kanser, insan sağlığı ve yaşamı için gerçek bir tehdit oluşturan en ciddi patolojilerden biri olması nedeniyle araştırmacıların oldukça ilgisini çeken en önemli alanlardan biridir. Ne yazık ki, günümüzde antikanser tedaviler için kullanılan neredeyse tüm ilaçlar genellikle toksiktir ve sadece tümör hücrelerini değil, normal sağlıklı hücreleri de olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, doğal kaynaklarda yeni, etkili ve toksik olmayan bileşiklerin araştırılması, modern farmakoloji ve biyoteknolojinin önemli bir görevidir (Khotimchenko vd. 2020).

Dünya çapında, 2024 yılında tahmini 20 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 9.7 milyon kanser ölümü meydana gelmektedir. Özellikle kadınlarda meme kanseri, en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini aşmış, tahmini 2, 3 milyon yeni vaka (%11,7), bunu akciğer (%11,4), kolorektal (%10), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri izlemiştir. Akciğer kanseri, tahmini 1,8 milyon ölümle (%18) kanser ölümünün önde gelen nedeni olmaya devam ederken, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanseri izlemiştir ("Cancer Statistics - NCI", 2024).

İnsan vücudunda kanser hücrelerinin oluşumu, serbest radikaller ve doğal antikanser ilaçları tarafından doğrudan indüklenebilmektedir. Bu nedenle, sülfatlanmış polisakkaritler gibi radikal süpürücü bileşikler, insan vücudundaki kanser oluşumunu azaltmak için dolaylı olarak kullanılabilir. Sülfatlanmış Polisakkaritler, sülfat grupları içeren bir polisakkaritler sınıfıdır ve hücre döngüsü, apoptoz, glikoliz, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi pek çok hücresel süreci kontrol eden çeşitli sinyal mekanizmalarını hedefleyerek antitümör etkiye aracılık etmektedirler (Li vd. 2008). Sülfatlanmış polisakkaritlerden fucoidan, esas olarak bir glikosidik bağ ile doğrusal veya dallı bir zincire bağlanan sülfatlanmış α -Fuc kalıntıları tarafından oluşturulmaktadır (Li vd. 2008).

Fucooidanlar; çeşitli kimyasal konformasyonları ve güçlü antioksidan aktiviteleri sayesinde anti-inflamatuar, anti-koagülan, anti-anjiyojenik, immünomodülatör, anti-adezyon, anti-kanser, anti-diyabetik, anti-viral ve anti-nörodejeneratif özellikleriyle tümör baskılayıcı olarak bilinmektedirler (Pradhan vd. 2020).

Kaveola; İlk kez 1953'te gözlemlenen ve hücre zarının 60-80 nm çapında küçük "kese şeklindeki" invaginasyonlardır (Palade, 1953). Bu yapılar, bazı hücre yüzey reseptörleri de dahil olmak üzere çeşitli sinyal molekülleri ile zenginleştirilmiştir. Kaveollerin ana membran bileşenleri, kaveolinler olarak bilinen bir integral membran proteinleri ailesidir. Kaveolinler endositoz, transitoz, lipid homeostazı, sinyal iletimi ve tümörigenez gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynarlar (Lai vd. 2021; Yang vd. 2021; Reshkin vd. 2022). Kaveolin ailesi üç üyeden oluşur: kaveolin-1, kaveolin-2 ve kaveolin-3. Kaveolin-1 çeşitli büyüme faktörlerinin yanı sıra mekanik veya oksidatif stresin, kaveola aracılı endositozu başlattığı ve böylece hücre içi yolaklar aracılığıyla hücre dışı sinyalleri ileterek çok sayıda hücresel süreci düzenlediği gösterilmiştir (Sun vd. 2009; Ortiz vd. 2016). Kaveolin-1 'e bağlı sinyal iletiminin hücre döngüsü, hücre yaşlanma, hücre proliferasyonu, invazyonu, hücre ölümü ve ayrıca membran bileşimini, lipid homeostazını ve metabolizmasını düzenlediği gösterilmiştir (Baudrand vd. 2016; Hart vd. 2016; Ketteler ve Klein, 2018.)

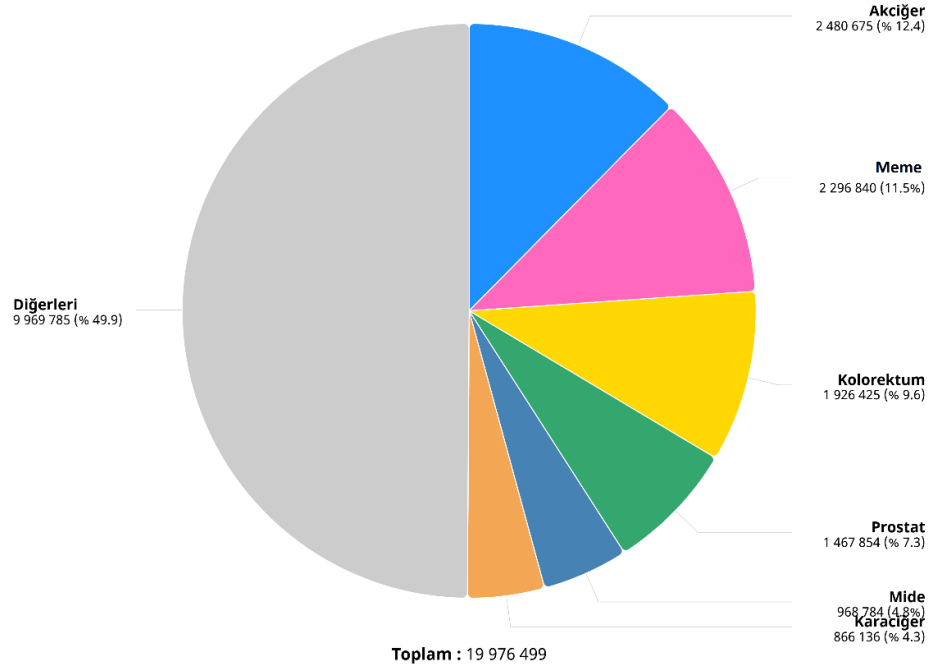
Yapılan çalışmalar, tümör progresyonu sürecinde kaveolin-1'in önemini ortaya koymuş ve farklı tümör tiplerinde farklı ekspresyon seviyeleri ile tespit edilmiştir (Williams vd. 2005; Diaz-Valdivia vd. 2022). Birçok raporda, kaveolin-1 ekspresyonunun tümör derecesi, büyüklüğü ve evresi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Raja vd. 2019; Teruel vd. 2024; Wang vd. 2024). Bununla birlikte, kaveolin-1'in aynı zamanda bir tümör baskılayıcı olarak da işlev gördüğü çalışmalar bulunmaktadır (Sunaga vd. 2004; Diaz vd. 2020; Gokani vd. 2022; Pang vd. 2022; Chai vd. 2024). Kaveolin-1'in bu ikili rolünün tümör tiplerindeki ekspresyon düzeylerine bağlı olduğu ifade edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında; sülfatlanmış polisakkaritlerden fucoidan ile muamele edilen MCF-7 kanser hücrelerinde, kaveolin-1 ekspresyonunun hangi yönde etkilendiği ve bu etkilerin tümör progresyonu ile olan bağlantısı değerlendirilmiştir. Bu sayede meme kanseri prognozuna yeni bir bakış açısının geliştirilmesi hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kanser

Kanser, Hücrelerin DNA hasarları sonucu kontrolsüz çoğalması ile karakterize çeşitli hastalık gruplarını temsil eden patolojik bir durumdur. Kanser, fiziksel ve zihinsel insan sağlığı için ciddi bir tehdittir ve dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Global Cancer Observatory (GLOBOCAN)' a göre, 2024 yılında dünya genelinde yaklaşık 20 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 9.7 milyon kanser kaynaklı ölüm gerçekleşeceği tahmin edilmektedir. Akciğer kanseri, dünya genelinde en sık görülen kanser türü olmayı sürdürmekte ve en fazla ölüme neden olan kanser türü olarak öne çıkmaktadır. Akciğer kanserini, insidans açısından meme kanseri ve kolorektal kanser izlemektedir. Mortalite açısından ise kolorektal ve karaciğer kanserleri önemli bir yer tutmaktadır. Bu kanser türlerinin yaygınlığı, özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde erken teşhis ve tedavi olanaklarının yetersizliği nedeniyle daha da artmaktadır.

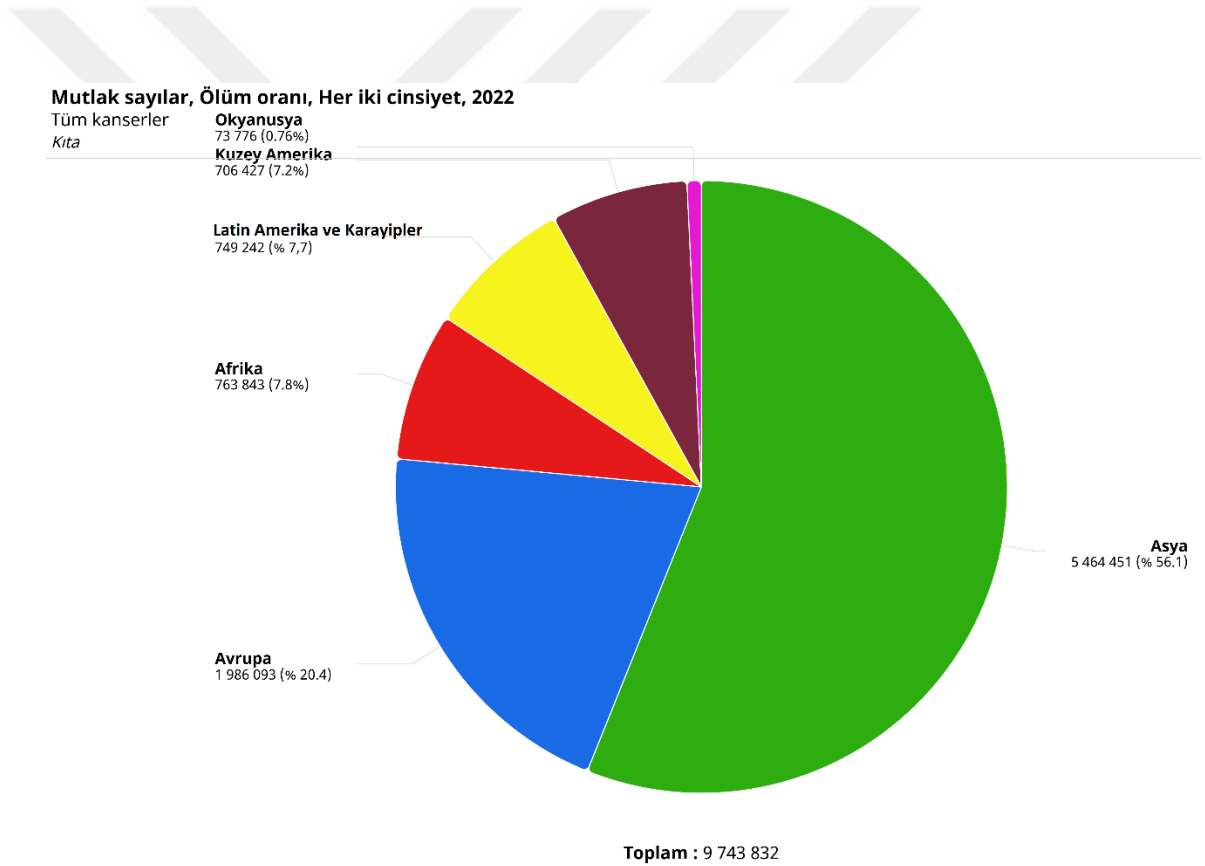
Mutlak sayılar, İnsidans, Her iki cinsiyet, 2022
Kıtalar



Şekil 2.1 2022 yılında kanser türlerine göre tahmini kanser insidansı (GLOBOCAN 2024)

Kanser insidansındaki artışın ardında yatan en önemli faktörler arasında yaşlanan nüfus, sağlıksız yaşam tarzı alışkanlıkları ve çevresel risk faktörleri bulunmaktadır. Tütün kullanımı, sağlıksız beslenme, fiziksel hareketsizlik ve alkol tüketimi gibi yaşam tarzı faktörleri, kanser riskini artıran başlıca etkenlerdir. Bu nedenle, kanserle mücadelede en etkili ve sürdürülebilir strateji, önleme ve erken teşhis çabalarının artırılmasıdır.

Özellikle düşük gelirli ülkelerde, kanser ölümlerinin yüksek olmasının nedenlerinden biri, yeterli erken teşhis ve tedavi hizmetlerinin bulunmamasıdır. Bu durum, kanserle ilgili sağlık hizmetlerinin geliştirilmesi ve herkesin eşit erişim sağlayabileceği bir sağlık sistemi oluşturulması gerekliliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 2.2 2022 yılında kıtalara göre tahmini kanser ölüm sayısı (GLOBOCAN 2024)

Kanser ölümlerinin sayısının 2030 yılına kadar yaklaşık 13,1 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir. Son birkaç on yılda, cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, molekül hedefli tedaviler ve hücre bazlı tedaviler gibi kanser tedavilerinin geliştirilmesi de dahil olmak üzere onkolojide önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

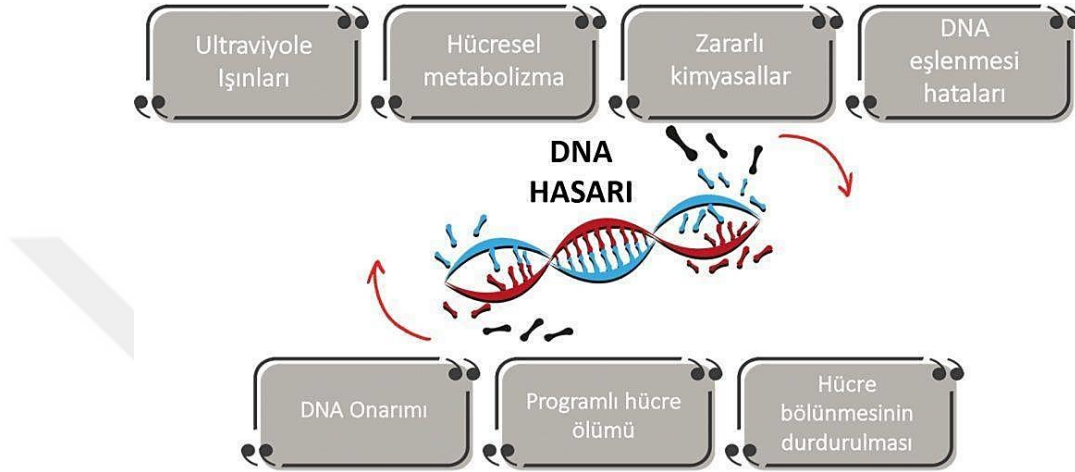


Şekil 2.3 Kanserin özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2015)

Kanserlerin gelişim sürecinde kazandığı işlevsel yetenekler, pek çok kanser türüne yol açan çok aşamalı karsinogenez sürecinde kazanılır. Bu belirleyici özelliklerin hangi sırayla kazanıldığı ve hastalığın prognozuna olan katkılarının önemi, insan kanserlerinin türlerine göre değişiklik gösterebilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2015).

Kanser, genlerde bir dizi ardışık mutasyonla ortaya çıkar, böylece bu mutasyonlar hücre fonksiyonlarını değiştirmektedir. Kimyasal bileşikler, gen mutasyonları ve kanser hücrelerini oluşturmada belirgin bir role sahiptir. Ek olarak, sigara içmek akciğer kanserine yol açan birkaç kanserojen kimyasal bileşiği içermektedir. İlginç bir şekilde, kanserojen özelliklere sahip çevresel kimyasal maddeler, hücrelerin sitoplazmasını ve çekirdeğini doğrudan veya dolaylı olarak etkiler ve genetik bozukluklara ve gen mutasyonlarına yol açmaktadır. Virüsler, bakteriler ve radyasyon ışınları, tüm kanserlerin yaklaşık %7'sini oluşturan diğer karsinogenez faktörleridir (Hassanpour ve Dehghani, 2017). Genel olarak, kanser hücreli ilişkileri bozar ve hayati genlerin işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Bu patolojik durum hücre döngüsünde etkilidir ve anormal proliferasyona yol açmaktadır. Proto-onkogenler, normal koşullar altında hücre bölünmesinden ve büyümesinden sorumludur; ancak genetik mutasyonlar sonucunda

hücre varlığı için en tehlikeli olan onkogenlere dönüşebilmektedir. Ek olarak, tümör baskılayıcı genlerin eksikliği, kontrolsüz hücrelerin bölünmesini tetiklemektedir. Normalde, onarım genleri, onarım özelliklerine ve 30'dan fazla tespit edilen onarım proteini türüne sahip protein ve enzimlere dönüşmektedir (Hassanpour ve Dehghani, 2017).



Şekil 2.4 Kanseri oluşturan DNA hasarına sebep olan etmenler ve onarım şeması

2.2 Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve tüm kanserler arasında ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Dünya çapında yılda yaklaşık 2 milyon yeni vaka teşhis edilmekte ve 0,5 milyon kişi yaşamını yitirmektedir. (Siegel vd. 2019).

2.2.1 Genel özellikleri

Meme kanseri insidansı, bölgelere göre çeşitli farklılıklar göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde daha yüksek oranlar görülürken, daha az gelişmiş ülkelerde oranlar daha düşüktür. Bu farklılıkların, tarama programlarının yaygınlığı, yaşam tarzı faktörleri ve genetik predispozisyon gibi birçok faktöre bağlı olduğu bilinmektedir (Bray vd. 2024). Meme kanseri riski yaşla birlikte artmaktadır ve en yaygın olarak 50 yaş üstü kadınlarda teşhis edilse de her yaşta ortaya çıkabilmektedir.

2.2.2 Meme kanserinin nedenleri

Meme kanseri, çeşitli etmenlerin etkileşimi sonucunda gelişen bir hastalıktır ve genellikle çok sayıda faktörün bir araya gelmesiyle ortaya çıkmaktadır. Genetik yatkınlık, meme kanseri riskini artıran önemli bir faktörlerden biridir. Özellikle BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar, bu hastalığa yakalanma olasılığını önemli ölçüde artırabilmektedir. Ailede meme kanseri öyküsü bulunan bireylerin, genetik eğilimler nedeniyle daha yüksek risk altında olduğu düşünülmektedir (Michailidou vd. 2015). Ayrıca, daha önce meme kanseri geçirmiş bireylerde, hastalığın tekrar etme riski bulunmaktadır. Yaş, meme kanseri riski üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Kanser sıklığı, genellikle 50 yaş ve üzerindeki bireylerde artış göstermektedir. Bu durum, yaşa bağlı biyolojik değişimlerle ilişkilendirilmektedir (DeSantis vd. 2019).

Meme kanseri, kadınlarda erkeklerden daha yaygın olarak görülmektedir. Ancak nadir de olsa erkeklerde de meme kanseri riski söz konusu olabilmektedir. Bu bilgilere ek olarak, uzun süreli hormonal tedavi kullanımı, erken yaşta regl ve geç menopoz gibi durumlar, meme kanseri riskini artırabilmektedir. Hormonal dengesizlikler, sigara kullanımı, aşırı alkol tüketimi, fiziksel aktivite eksikliği ve dengesiz beslenme gibi yaşam tarzı faktörleri de meme kanseri riskine neden olabilmektedir. Çevresel etmenler ve kişisel alışkanlıklar, hastalık riskinin artmasına katkıda bulunabilmektedir (Satpathi vd. 2023). Bu risk faktörlerinin bir araya gelmesi, meme kanseri gelişimi için belirleyici olabilmektedir. Her bireyin risk faktörleri farklıdır ve kişisel sağlık geçmişinin yanı sıra genetik ve çevresel etmenler de dikkate alınarak kapsamlı bir değerlendirme yapılmalıdır.

2.2.3 Meme kanseri çeşitleri

Meme kanseri, birçok farklı türde ortaya çıkabilen kompleks bir hastalıktır. Temelde, kanser hücrelerinin ortaya çıktığı dokulara göre sınıflandırılmaktadır.

Duktal Karsinom: Meme kanserlerinin en yaygın türüdür ve genellikle süt kanallarında başlamaktadır. İki ana alt türü vardır;

Duktal İnvaziv Karsinom (IDC): Süt kanallarının dışına çıkarak çevre dokulara yayılabilmektedir.

Duktal İn Situ Karsinom (DCIS): Süt kanallarının içinde sınırlı kalır ve çevre dokulara yayılmaz.

Lobüler Karsinom: Meme lobüllerinde gelişir ve genellikle lobüler hücrelerde başlar. İki ana türü bulunmaktadır;

Lobüler İnvaziv Karsinom: Lobüllerden çevre dokuya yayılabilmektedir.

Lobüler İn Situ Karsinom (LCIS): Genellikle bir tümör oluşturmaz ama kanser riskini artırmaktadır (National Cancer Institute, 2022).

İnflamatuvar Meme Kanseri: Meme derisinin kızarıklığı ve şişmesi ile karakterize edilmektedir ve hızla ilerleyebilmektedir. Bu tür, meme kanserinin nadir ama agresif bir formudur (National Cancer Institute, 2022).

Bazı meme kanserleri hormon reseptörlerine veya genetik mutasyonlara bağlı olarak farklı şekillerde sınıflandırılabilir:

ER-pozitif (Östrojen Reseptör Pozitif) Kanserler: Bu tür kanserler, hücrelerinde östrojen hormonunu tanıyan reseptörlere sahiptir. Östrojen, bu kanser hücrelerinin büyümesine ve çoğalmasına katkıda bulunabilmektedir. Tedavi genellikle hormon tedavileri içermektedir. Aromataz inhibitörleri ve selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM'ler) gibi ilaçlar kullanılarak östrojenin etkisi azaltılmaktadır (Allison vd. 2020).

PR-pozitif (Progesteron Reseptör Pozitif) Kanserler: Progesteron hormonunu tanıyan reseptörlere sahip olan bu türde, progesteronun da kanser hücrelerinin büyümesini teşvik edebileceği düşünülmektedir. Tedavi genellikle hormon baskılayıcı tedaviler içerir. ER-pozitif ve PR-pozitif kanserler genellikle daha iyi prognoz göstermektedir ve hormon tedavilerine olumlu yanıt verebilmektedir (Allison vd. 2020).

HER2-pozitif Kanserler: HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), meme kanseri hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir proteindir. HER2 pozitif kanserlerde bu proteinin aşırı üretimi gözlemlenmektedir, bu da hücrelerin hızla büyümesine ve bölünmesine neden olabilmektedir. HER2 pozitif kanserler genellikle daha agresif olabilmektedir. Tedavi genellikle HER2'yi hedefleyen monoklonal antikorlar

(trastuzumab gibi) ve HER2 inhibitörleri içermektedir. Bu tedaviler HER2'nin etkisini bloke ederek kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatmakta veya durdurmaktadır (Fernandes vd. 2023).

Triple-negatif Kanserler: Triple-negatif Meme Kanseri (TNBC), östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 proteini açısından negatif test edilen meme kanseridir. Bu tür kanserler, diğer alt türlerin aksine hormon tedavilerine veya HER2 hedefli tedavilere yanıt vermemektedir (Collignon vd. 2016). Genellikle daha agresif bir davranış sergilediğinden tedavi seçenekleri daha sınırlı olabilmektedir. Tedavi genellikle kemoterapi, radyoterapi ve bazı durumlarda immünoterapiler içermektedir. Son yıllarda immünoterapinin etkinliği üzerine araştırmalar yapılmaktadır.

2.2.4 Meme kanseri evreleri

Meme kanseri evrelemesi, kanserin vücutta ne kadar yayıldığını belirlemeye yardımcı olan önemli bir tanı aracıdır. Evreleme, tedavi planlaması ve prognozun belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Meme kanseri evreleri, kanserin boyutunu, lenf düğümlerine yayılma derecesini ve diğer organlara yayılıp yayılmadığını belirlemek için kullanılmaktadır. Bu evreleme genellikle TNM (Tümör, Nod, Metastaz) sistemi kullanılarak yapılır. TNM sistemi üç ana bileşenden oluşmaktadır ("Cancer Staging - NCI", 2024).

T (Tümör): Primer tümörün boyutu ve lokal invazyon derecesini belirtmektedir;

TX: Primer tümör değerlendirilemez.

T0: Primer tümör belirlenemez.

Tis: Karsinoma in situ (kanser henüz yayılmamış).

T1-T4: Primer tümörün boyutu ve/veya lokal invazyon derecesi arttıkça numara artmaktadır. (T1 küçük, T4 büyük ve çevre dokulara yayılmış).

N (Nod): Bölgesel lenf düğümlerine yayılımı belirtmektedir.

NX: Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez.

N0: Lenf düğümlerine yayılım yok.

N1-N3: Lenf düğümlerine yayılım derecesine göre numaralandırılır. (N1 az yayılım, N3 çok yayılım).

M (Metastaz): Uzak organlara yayılımı belirtmektedir.

MX: Uzak metastaz değerlendirilemez.

M0: Uzak metastaz yok.

M1: Uzak metastaz var.

Evre 0: Karsinoma in Situ: Evre 0, kanserin süt kanalları veya lobüller içinde sınırlı olduğu ve çevre dokulara yayılmadığı erken bir evredir.

Ductal Karsinoma in Situ (DCIS): Bu evrede kanser hücreleri sadece süt kanallarında bulunur. Çevre dokulara yayılmamıştır ve genellikle mamografi ile tespit edilmektedir (Timbres vd. 2023).

Lobular Karsinoma in Situ (LCIS): Kanser hücreleri süt üreten lobüllerde bulunur, ancak çevre dokulara yayılmamıştır. LCIS, genellikle invaziv meme kanseri riskini artırır, ancak kendi başına kanser olarak kabul edilmez (Timbres vd. 2023).

Evre I: Erken Evre Meme Kanseri: Evre I, kanserin küçük olduğu ve lenf düğümlerine yayılmadığı veya çok az yayıldığı erken bir evredir.

Evre IA: Tümör 2 cm veya daha küçüktür ve lenf düğümlerine yayılmamıştır.

Evre IB: Memede ya da lenf düğümlerinde çok küçük (0.2 mm'den büyük ancak 2 mm'den küçük) kanser hücreleri bulunmaktadır (Partin, 2022).

Evre II: Lokal İleri Meme Kanseri: Evre II, kanserin daha büyük olduğu veya yakındaki lenf düğümlerine yayıldığı, ancak uzak organlara yayılmadığı evredir.

Evre IIA: Tümör 2-5 cm arasında olabilir, lenf düğümlerine yayılmamış veya 2 cm veya daha küçük olabilir ve en fazla üç lenf düğümüne yayılmış olabilmektedir.

Evre IIB: Tümör 2-5 cm arasında ve en fazla üç lenf düğümüne yayılmış veya 5 cm'den büyük ve lenf düğümlerine yayılmamış olabilmektedir ("Chemotherapy for breast cancer - Mayo Clinic", 2024).

Evre III: İleri Evre Meme Kanseri: Evre III, kanserin büyük olduğu ve meme dışında çevre dokulara ve lenf düğümlerine yayıldığı evredir.

Evre IIIA: Tümör 5 cm'den büyük olabilir ve koltuk altı lenf düğümlerine yayılmış olabilir veya meme dışına yayılmış ancak uzak organlara yayılmamış olabilmektedir.

Evre IIIB: Tümör herhangi bir boyutta olabilir, ancak meme cildine veya göğüs duvarına yayılmış olabilir. Ayrıca yakındaki lenf düğümlerine de yayılmış olabilmektedir.

Evre IIIC: Tümör meme cildine, göğüs duvarına veya yakın lenf düğümlerine yayılmış olabilir. Ayrıca köprücük kemiği altı veya üstü lenf düğümlerine de yayılabilmektedir (“Treatment of Breast Cancer Stages I-III | American Cancer Society”, 2024).

Evre IV: Metastatik Meme Kanseri: Tümör, meme ve çevre dokuların ötesine yayılmış, uzak organlara (kemikler, karaciğer, akciğerler, beyin gibi) metastaz yapmıştır.

2.2.5 Meme kanserinin moleküler biyolojisi

Meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesi, hücre sinyal yollarındaki bozukluklar, genetik mutasyonlar ve epigenetik değişikliklerle yakından ilişkilendirilmektedir.

1. Hücre Sinyal Yolları ve Onkogenler: Meme kanseri, hücre sinyal yollarında bozulmalara neden olmaktadır. En yaygın olarak etkilenen sinyal yolları arasında PI3K/AKT/mTOR, MapK/ERK ve JAK/STAT yolları bulunmaktadır. Bu sinyal yollarındaki aktivasyon, hücre büyümesini, çoğalmasını ve hayatta kalmasını teşvik etmektedir (Peng vd. 2022).
2. Tümör Supresör Genler: Meme kanserinde, tümör supresör genlerin (TP53, PTEN, BRCA1/2) mutasyonları yaygındır. Bu genler normalde hücre döngüsünü düzenler DNA onarımını sağlar ve apoptozu teşvik etmektedir (Mylavarapu vd. 2018).
3. Epigenetik Değişiklikler: DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik değişiklikler, meme kanserinde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Bu değişiklikler, genlerin susturulmasına veya aktivasyonuna yol açarak kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır (Pathak vd. 2023).
4. Hormon Reseptörleri: Meme kanseri hücrelerinde östrojen ve progesteron reseptörlerinin (ER ve PR) varlığı, tümörün davranışını ve tedaviye yanıtını belirlemektedir. Hormon pozitif meme kanserleri, hormon terapileri ile tedavi edilebilmektedir (Allison vd. 2020).

5. HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2): HER2 pozitif meme kanseri, HER2 geninin aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu ile karakterizedir. Bu tip meme kanseri, hedeflenmiş tedavi yöntemleri ile tedavi edilebilmektedir (Swain vd. 2023).
6. MikroRNA'lar (miRNA'lar) ve Diğer Non-Kodlayıcı RNA'lar: miRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda küçük, non-kodlayıcı RNA molekülleridir. miRNA'lar, gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Meme kanserinde, miRNA'ların anormal ekspresyonu, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına veya onkogenlerin aktivasyonuna yol açarak kanser progresyonuna katkıda bulunabilmektedir. Non-kodlayıcı RNA'lar (ncRNA'lar), protein kodlamayan RNA molekülleridir ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Wang vd. 2021).

2.2.6 Meme kanseri tedavi yöntemleri

2.2.6.1 Cerrahi tedavi

Cerrahi Tedavi, meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan ve temel bir yaklaşım olan bir yöntemdir. Bu tedavi, genellikle iki ana tür cerrahi işlemi içermektedir. İlk olarak, lumpektomi olarak bilinen yöntem, tümör ve çevresindeki küçük bir sağlıklı doku parçasının çıkarılmasını kapsamaktadır. Erken evre meme kanseri olan hastalar için uygun bir seçenektir; bu yöntem, tümörün meme dokusuna göre küçük olduğu durumlarda tercih edilmektedir ve genellikle radyoterapi ile tamamlanmaktadır (Admoun ve Mayrovitz, 2021). Diğer yandan, mastektomi, tüm memenin cerrahi olarak çıkarılmasını içermektedir. Bu yöntem, tümörün büyük olduğu, meme dokusunun geniş bir kısmını etkilediği veya çoklu tümörlerin varlığında uygulanabilmektedir. Mastektomi türleri arasında basit mastektomi, tüm meme dokusunun çıkarılmasını fakat lenf nodlarının alınmamasını içerirken, modifiye radikal mastektomi, meme dokusunun yanı sıra aksiller lenf nodlarının da çıkarılmasını kapsamaktadır. Radikal mastektomi ise, meme dokusu, aksiller lenf nodları ve göğüs duvarı kaslarının çıkarılmasını içerir ve günümüzde nadiren uygulanmaktadır (Admoun ve Mayrovitz, 2021).

2.2.6.2 Radyoterapi

Radyoterapi, kanser hücrelerini hedef almak ve yok etmek amacıyla yüksek enerjili ışınlar kullanmaktadır. Bu tedavi yöntemi, özellikle cerrahi işlemler sonrası kalan kanser hücrelerinin etkisiz hale getirilmesinde sıkça tercih edilmektedir. Radyoterapi, iki ana formda uygulanmaktadır. Eksternal radyoterapide, radyasyon, bir cihaz aracılığıyla dışarıdan doğrudan meme bölgesine yönlendirilir ve tedavi genellikle haftada beş gün, birkaç hafta süresince gerçekleştirilmektedir. Diğer bir tür olan internal radyoterapi veya diğer adı ile brakiterapi ise, radyasyon kaynaklarını doğrudan tümörün bulunduğu bölgeye veya meme dokusunun içine yerleştirmektedir. Bu yöntem, genellikle daha kısa bir süre içinde uygulanır ve hedefe yönelik olması sayesinde daha az yan etki riski taşımaktadır (Shah vd. 2021).

2.2.6.3 Kemoterapi

Kemoterapi, kanser hücrelerini hedef alarak yok etmek için çeşitli anti-kanser ilaçlarının kullanıldığı bir tedavi yöntemidir. Bu yöntem hem cerrahi öncesi hem de cerrahi sonrası dönemlerde uygulanabilmektedir. Neoadjuvan kemoterapi, tümörün boyutunu küçültmek ve cerrahiyi daha etkili hale getirmek amacıyla cerrahiden önce uygulamaktadır. Adjuvan kemoterapi ise, cerrahiden sonra kalan mikroskobik kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için kullanılmaktadır (Lim vd. 2014). Ayrıca, metastatik meme kanseri olan hastalarda da bu tedavi yöntemi, tümörlerin vücudun diğer bölgelerine yayılmasını kontrol altına almak için tercih edilmektedir. Kemoterapide sıkça kullanılan ilaçlar arasında doksorubisin, siklofosfamid, paklitaksel ve karboplatin bulunmaktadır.

2.2.6.4 Hormonal terapi

Hormon reseptörü pozitif meme kanseri olan hastalarda hormonal terapi, östrojen ve progesteron hormonlarının etkilerini azaltarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurmayı hedeflemektedir. Bu tedavi genellikle çeşitli ilaçlarla uygulanmaktadır. Tamoxifen, östrojen reseptörlerini bloke ederek hem premenopozal hem de postmenopozal kadınlarda kullanılmaktadır ve genellikle 5-10 yıl süresince devam

etmektedir. Aromataz inhibitörleri ise, östrojen üretimini azaltarak çalışmaktadır ve genellikle postmenopozal kadınlarda tercih edilmektedir; anastrozol, letrozol ve eksemestan bu grubun örneklerindendir (Bradley vd. 2022). GnRH agonistleri (leuprolid ve goserelin), premenopozal kadınlarda yumurtalıkların östrojen üretimini baskılamaktadır ve genellikle kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Huerta-Reyes vd. 2019). Son yıllarda, hormonal tedaviye ek olarak CDK4/6 inhibitörleri gibi yeni ajanlar da geliştirilmiştir; bu ilaçlar, hücre döngüsünü kontrol eden proteinleri hedef alarak tedavi sonuçlarını iyileştirmeyi hedeflemektedir (Finn vd. 2016; McAndrew ve Finn, 2022). Bu çeşitli tedavi yaklaşımları, hormon reseptörü pozitif meme kanserinin yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır ve hastaların tedavi seçeneklerini genişletmektedir.

2.2.6.5 Hedefe yönelik tedavi

Hedefe yönelik tedavi, meme kanseri tedavisinde kanser hücrelerinin belirli moleküler özelliklerini hedef alarak daha etkili ve genellikle daha az yan etkiye sahip bir tedavi yaklaşımı sunmaktadır. Bu tedavi türü, kanser hücrelerinin büyüme ve yayılma mekanizmalarını hedef alan ilaçlar kullanmaktadır.

HER2-pozitif meme kanseri hastalarında trastuzumab (herceptin) gibi ilaçlar, hücre yüzeyindeki HER2 proteinini hedef alarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurmaktadır. Pertuzumab ve ado-trastuzumab emtansine (kadcyla) gibi diğer ilaçlar da HER2'yi hedef alarak tedavi etkinliğini artırmaktadır (Zhu vd. 2024). CDK4/6 inhibitörleri olan palbociclib, ribociclib ve abemaciclib, hücre döngüsünü kontrol eden proteinleri hedef alarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engeller ve hormonal tedavi ile kombine edildiğinde özellikle hormon reseptörü pozitif metastatik meme kanserinde etkilidir (Li vd. 2022). PARP inhibitörleri (olaparib ve talazoparib) ise BRCA1 veya BRCA2 mutasyonları taşıyan hastalarda DNA onarım mekanizmalarını hedef alarak etkili olmaktadır (Xiong vd. 2024).

2.2.6.6 İmmünoterapi

İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine karşı doğal savunma mekanizmalarını güçlendiren bir tedavi yöntemidir ve belirli genetik özelliklere sahip meme kanseri türlerinde kullanılmaktadır. Pembrolizumab (Keytruda), bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine saldırmasına yardımcı olan PD-1 proteinini hedef almaktadır ve özellikle triple negatif meme kanseri (TNBC) olan hastalarda etkili olabilmektedir (Sunshine ve Taube, 2015). Benzer şekilde, Atezolizumab (Tecentriq), PD-L1 proteinini hedef alarak bağışıklık yanıtını artırmaktadır ve TNBC hastalarında kullanılabilir. Bu tedavi yöntemleri, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanımasını ve yok etmesini sağlayarak, hastalığın ilerlemesini durdurmayı veya yavaşlatmayı amaçlamaktadır (Schmid vd. 2020).

Bu tedavi yaklaşımları, kanser hücrelerinin spesifik zayıf noktalarını hedef alarak sağlıklı hücrelere minimum zarar verirken kanser tedavisinde daha iyi sonuçlar elde edilmesini amaçlamaktadır. Bu tür tedaviler, moleküler testlerle belirlenen uygun hastalarda kullanılmaktadır ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır.

Bu tedavilerin kansere karşı kullanımını ve etkinliğini zayıflatan sınırlamalar bulunmaktadır. Kanser tedavisinde en yaygın kullanılan tedavi türü kemoterapi, sağlıklı hücrelere de zarar vermekte veya öldürmektedir, bu da hastalar arasında ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, normal hücreler üzerinde daha az olumsuz etkisi olan kanser hücrelerini hedef alan ve aynı zamanda kanser hastalarının yaşam kalitesini artıran yeni anti-kanser bileşiklerini keşfetmek gerekmektedir. Doğal ürünler, kanserin önlenmesinde ve tedavisinde yardımcı olabilecek bileşiklerin keşfi için önemli bir kaynak haline gelmiştir (Yao vd. 2022).

Son yıllarda yapılan invitro ve invivo çalışmalar, çok çeşitli kanser hücre hatlarında polisakkaritlerin mükemmel anti-kanser aktivitelerini ortaya koymaktadır. Özellikle bazı polisakkaritler, tümör hücresi proliferasyonunu inhibe etmede ve olumsuz etkilere neden olmadan kanser hücrelerine zarar vermede etkilidir, böylece geleneksel kemoterapinin

başlıca dezavantajlarını gidermektedir. Polisakkaritlerin anti-kanser aktivitesi uzun zamandır biliniyor olmasına rağmen, anti-kanser etkileri ve terapötik etkilerinin altında yatan mekanizmalar hakkında çok az çalışma bulunmaktadır. Polisakkaritlerin anti-kanser aktivitelerinin altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, anti-kanser tedavilerinin tanımlanmasına ve geliştirilmesine şüphesiz katkıda bulunacaktır (Yao vd. 2022).

2.3 Sülfatlanmış Polisakkaritler

Polisakkaritler doğal makromoleküler bileşiklerdir. Glikosidik bağlarla bağlanmış tek veya çoklu çeşitli monosakkarit birimlerinden oluşmaktadırlar. Deniz algleri zengin bir polisakkarit kaynağıdır. Hücre duvarı yapısının ve enerji rezervlerinin ana bileşenleri olan polisakkaritler, deniz alglerinin kuru ağırlığının %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Sülfatlanmış polisakkaritler (SP'ler) olarak da bilinen deniz alglerinden ekstrakte edilen polisakkaritler, bileşimleri ve yapıları bakımından bitki kökenli diğer tüm polisakkaritlerden farklıdır ve spesifik olarak biyolojik işlevleri bulunmaktadır (Yao vd. 2022).

Deniz yosunları olarak da bilinen deniz algleri, okyanustaki en bol biyolojik kaynaklardan biridir ve insan diyetinin önemli bir parçası haline gelmektedir. Antik çağlardan beri, deniz algleri birçok ülkede, özellikle Çin, Japonya, Tayland ve Kore gibi Asya ülkelerinde gıda ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Proteinler, peptitler, mineraller, vitaminler, polifenoller ve polisakkaritler gibi çeşitli biyoaktif maddelerin zengin kaynakları olan deniz algleri, diyet takviyeleri, fonksiyonel gıdalar, ilaçlar ve kozmetikler olarak kullanılmak üzere büyük bir potansiyele sahiptir (Yao vd. 2022).

Sülfatlanmış Polisakkaritler, sülfat grupları içeren bir polisakkaritler sınıfıdır ve şeker birimlerinin hidroksil grupları üzerinde sülfat grupları içeren polisakkaritleri ifade etmektedir. Polisakkaritlerin sülfatlanmasından sonra, sülfatlanmış hidroksil grupları, sterik engelleme ve elektrostatik itmede değişiklikler göstermektedir; ayrıca polisakkarit zincirinin esnemesi, uzaması ve suda çözünürlüğü artarak biyolojik aktivitelerin değişmesine neden olmaktadır (Zhang vd. 2005). Çok sayıda bilimsel çalışma,

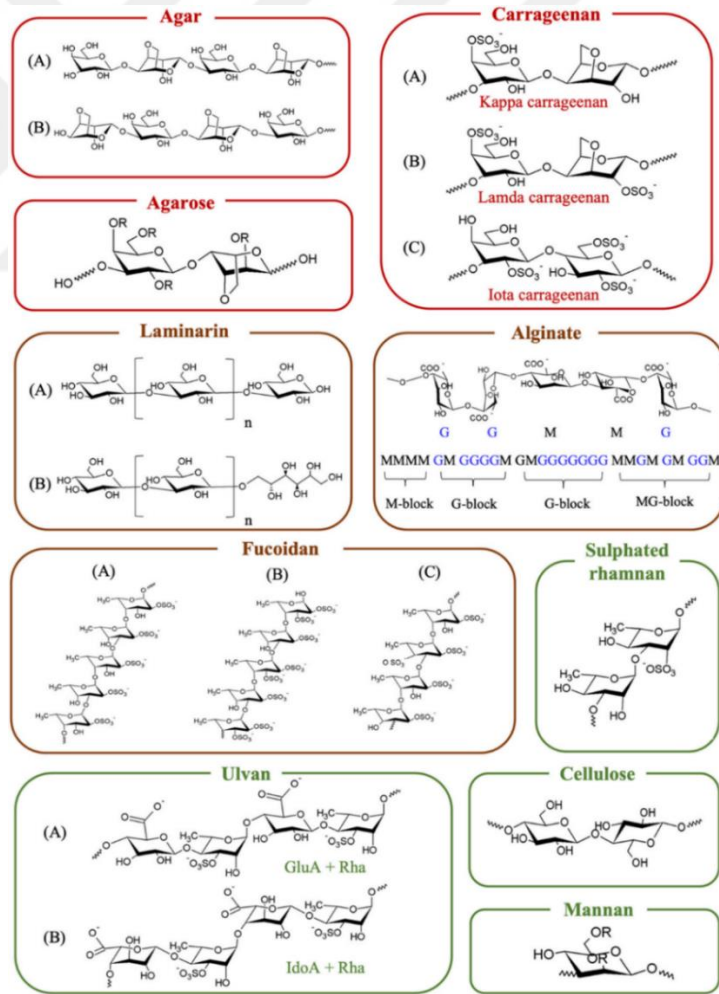
sülfatlanmış polisakkaritlerin, sülfatlanmayanlardan daha iyi biyolojik özellikler sergilediğini göstermektedir; ayrıca bağışıklık, anti-virüs ve anti-oksidasyon gibi önemli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır (Wang vd. 2014; Xie vd. 2016). Bu eşsiz yapısal özellikleri nedeniyle, sülfatlanmış polisakkaritler çeşitli matris ve hücrel proteinlerle etkileşime girerek çeşitli fizyolojik tepkilere yol açmaktadır (De Araújo vd. 2011; Kang vd. 2022).

Sülfatlanmış polisakkaritler genellikle deniz alglerinde, deniz omurgasızlarında ve deniz mikroorganizmalarında yaygındır (Nunes vd. 2019). Deniz algleri, esas olarak Chlorophyceae (yeşil algler), Rhodophyceae (kırmızı algler) ve Phaeophyceae (kahverengi algler) dahil olmak üzere en bol SP kaynaklarıdır. SP'lerin moleküler yapısı alg türlerine, yaşlarına ve ekstraksiyon yöntemlerine göre değişmektedir. Deniz alglerinde bulunan başlıca SP'ler, kahverengi alglerden fucoidan, kırmızı alglerden karragenan ve agar, yeşil alglerden ulvan olarak bilinmektedir (Gupta ve Abu-Ghannam, 2011; Kang vd. 2022). SP'ler, deniz alg gruplarının üç ana bölümünde, Rhodophyta, Phaeophyta ve Chlorophyta'da farklı miktarlarda bulunmaktadır. Rhodophyta'da bulunan bu bileşikler, tamamen galaktoz veya modifiye galaktoz birimlerinden oluşan galaktanlardır. Phaeophyta'nın genel sülfatlanmış polisakkaritlerine, sülfatlanmış 1-fukoza dayanan polidispers molekül ailelerini içeren fucoidanlar denmektedir. Chlorophyta'da başlıca polisakkaritler polidispers heteropolisakkaritlerdir, ancak homopolisakkaritler de bulunabilmektedir. Sülfatlanmış polisakkaritler genellikle antikoagülan, antioksidan, antiproliferatif, antitümöral, antiinflamatuvar, antiviral, antipeptik ve antiadesive aktiviteler gibi önemli farmakolojik aktivitelere sahiptir. (Costa vd. 2010).

2.3.1 Sülfatlanmış Polisakkaritlerin kimyasal yapısı

Polisakkaritler glikosidik bağlarla bağlanmış tek veya çoklu monosakkarit birimlerinden oluşmaktadırlar. Dikkate değer bir keşif olarak; moleküler ağırlık, monosakkarit alt birimleri ve glikosidik bağlar gibi SP'lerin kimyasal özellikleri, anti-kanser aktivitelerini etkileyebilmektedir. Araştırmalar, fucoidan'ın moleküler ağırlığının anti-kanser etkileri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca, (1 → 3) ve (1 → 4) bağlı α -l-fukopiranoz kalıntılarından oluşan sülfatlanmış ve kısmen asetillenmiş fucoidan'ın, melanom hücrelerinde koloni oluşumunun ilerlemesini önemli ölçüde baskıladığı bilinmektedir. Bu nedenle, pek çok çalışmada araştırma konusu olan SP'lerin tam karakterizasyonu için sadece etkilerin ve çoklu mekanizmaların değil, aynı zamanda yapılarının da tanımlanması gerekmektedir. Pek çok SP, karasal bitkilerde bulunanlardan farklı olarak benzersiz yapılara sahiptir. Aynı zamanda üç filumdan elde edilen SP'lerin de kimyasal yapılarında farklılıklar gözlemlenmektedir (Şekil 3) (Yao vd. 2022). Kırmızı alglerde, agar, agaroz ve karrageenan başlıca polisakkaritlerdir. Buna karşılık, kahverengi alglerdeki başlıca polisakkaritler laminarin, fucoidan ve aljinattır, ulvan, selüloz, mannan ve sülfatlanmış rhamnan ise yeşil alglerde en bol bulunan polisakkaritlerdir (Yao vd. 2022).



Şekil 2.5 Sülfatlanmış polisakkaritlerin kimyasal yapıları (Yao vd. 2022)

2.3.2 Alglerden elde edilen önemli sülfatlanmış polisakkaritler

Deniz algleri, hayvansal olmayan sülfatlanmış polisakkaritlerin en önemli kaynağıdır. Ayrıca, alglerden elde edilen sülfatlanmış polisakkaritlerin yapısı alg türlerine göre değişmektedir. Bu nedenle, bir deniz yosunundan saflaştırılan her yeni sülfatlanmış polisakkarit, benzersiz yapılara ve dolayısıyla potansiyel yeni biyolojik aktivitelere sahip yeni bir bileşiktir.

Algler kahverengi (Phaeophyta), kırmızı (Rhodophyta) ve yeşil (Chlorophyta) algler olarak sınıflandırılabilir (do-Amaral vd. 2020). Polisakkaritlerin içeriği farklı türler arasında değişmektedir (kahverengi alglerde %35-70, kırmızı alglerde %38-76 ve yeşil alglerde %15-65) (Saravana ve Chun, 2017). Kahverengi alglerden fucoidan, kırmızı alglerden karragenan ve agar, yeşil alglerden ulvan dahil olmak üzere bazı tipik alg polisakkaritleri hakkında pek çok çalışma yapılmaktadır (Morelli vd. 2017).

2.4 Fucoidan Tanımı ve Tarihçesi

Fucoidan, başlıca kahverengi deniz yosunlarında bulunan kompleks bir sülfatlanmış polisakkarittir. Bu bileşik, L-fukoz ve sülfat gruplarının yanı sıra galaktoz, mannoz ve glukuronik asit gibi diğer monosakkaritleri de içerebilmektedir. Fucoidanın kimyasal yapısı, kaynağına ve ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Anisha vd. 2022). Bu polimer, biyolojik aktiviteleri nedeniyle tıp ve sağlık bilimlerinde büyük ilgi görmektedir. Antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antikoagülan ve antikanserojen özellikleriyle dikkat çeken fucoidan, çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel bir ajan olarak incelenmektedir. (Jayawardena vd. 2022).

Fucoidan ilk olarak 1913 yılında İsveçli kimyager Harald Kylin tarafından keşfedilmiştir. Kylin, kahverengi deniz yosunlarından fucoidanı izole etmiş ve kimyasal yapısını incelemiştir. Keşfinden sonra, fucoidanın biyolojik etkileri üzerine yapılan araştırmalar yavaş ilerlemiştir. Ancak, 20. yüzyılın sonlarına doğru fucoidanın biyomedikal potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

1990'lı yıllardan itibaren, özellikle Asya'da, fucoidanın sağlık üzerindeki olumlu etkileri üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Japonya, Güney Kore ve Çin gibi ülkelerde yapılan bu çalışmalar, fucoidanın kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve immün sistem bozuklukları gibi çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde kullanım potansiyelini ortaya koymuştur (Li vd. 2008). Son yıllarda, modern bilim ve teknoloji kullanılarak fucoidanın daha detaylı yapısal ve biyolojik analizleri yapılmış, böylece bu bileşiğin terapötik uygulamaları hakkında daha fazla bilgi edinilmiştir. Fucoidanlar gibi doğal biyoaktif bileşiklerin antiproliferatif potansiyeli daha iyi bilinmektedir ve bu aktivite, doğal biyoçeşitlilik ile birleştiğinde, kansere karşı yeni nesil terapötiklerin geliştirilmesine izin verecektir (Malyarenko ve Ermakova, 2017).

2.4.1 Fucoidan yapısı ve özellikleri

Fucoidan, esas olarak bir glikosidik bağ ile doğrusal veya dallı bir zincire bağlanan sülfatlanmış α -Fuc kalıntıları tarafından oluşturulmaktadır (Andryukov vd. 2020). Genellikle kahverengi alglerin hücre duvarı matrislerinde bulunmaktadır. Aynı zamanda bazı deniz kestanesi ve deniz hıyarı türlerinde de mevcut olduğu bilinmektedir (Pradhan vd. 2020). Farklı omurgasızlardan ekstrakte edilen fucoidan'ın benzer bir yapıya sahip olduğu bildirilmektedir. Kahverengi alglerden elde edilenlerinin ise farklı türler ve yaşlar arasında çeşitlendirilmiş moleküler yapılaraya sahip olduğu bilinmektedir (Etman vd. 2020). Sülfatlanmış polisakkaritlerde sülfat gruplarının varlığı ve dağılımı, fucoidanın biyolojik aktivitelerini belirleyen önemli kritik faktörlerdendir.

Fucoidanların kimyasal bileşimleri ve moleküler yapıları, çeşitli kahverengi alg türleri arasında farklıdır (Vo 2020). Fucoidan esas olarak sülfatlanmış Fuc içermektedir (%60'tan fazla). Manno, galaktoz, glikoz, ksiloz ve üronik asitler dahil olmak üzere diğer monosakkaritlerin küçük bir yüzdesini de içerdiği rapor edilmektedir (do-Amaral vd. 2020). Fucoidan'daki sülfat içeriği, %7,66 ila %38,3 arasında kaynaklarına göre farklılık göstermektedir (Wen vd. 2021). Fucoidan ayrıca türlere, hasat mevsimlerine ve coğrafi bölgelere bağlı olarak 7 kDa ile 2379 kDa arasında değişen geniş bir Mw aralığı göstermektedir (Lim ve Wan Aida, 2017). Farklı alg türlerinden Fucoidan, farklı kimyasal bileşimler içermektedir. Genel olarak deniz kaynaklarından elde edilen doğal fucoidan iki

tip kimyasal yapıya sahiptir. Tip I fucoidan, Fuc'un O-2 ve O-4 pozisyonlarında sülfat grupları ile 1,3- α -L-Fucp'den oluşmaktadır. Tip II fucoidan, Fuc'un O-2, O-3 ve O-4 pozisyonlarında sülfat gruplarıyla değişen 1,3- ve 1,4- α -L-Fucp'den oluşmaktadır. (Shang, 2020; Chi ve Wang, 2023). Son zamanlarda, tip I ve II fucoidana kıyasla farklı sülfat ikameleri, Mw, dallanma ve şeker kalıntıları ile bazı farklı fucoidan türleri de rapor edilmektedir (Etman vd. 2020).

Yapılarındaki tüm bu farklılıklar farklı biyolojik sonuçlara yol açabilmektedir. Fucoidanın en dikkat çekici biyolojik aktivitelerinden biri antikoagülan etkisidir. Kan pıhtılaşmasını önleme yeteneği, sülfat gruplarının trombin ve diğer pıhtılaşma faktörlerini inhibe etmesi ile ilişkilidir. Bu özellik, damar tıkanıklıkları ve diğer pıhtılaşma bozukluklarının tedavisinde fucoidanın kullanımını desteklemektedir (Nagahawatta vd. 2023). Ayrıca, fucoidanın yapısındaki sülfat gruplarının viral partiküllerle etkileşime girerek virüslerin hücrelere bağlanmasını ve girişini engellediği gösterilmiştir. Özellikle HIV ve influenza gibi zarflı virüslere karşı etkili olan fucoidan, viral enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel bir ajan olarak değerlendirilmektedir (Nagahawatta vd. 2023).

Fucoidanın immünomodülatör etkileri, bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivitesini modüle ederek bağışıklık yanıtlarını güçlendirmesini içermektedir. Bu etki, enfeksiyonlarla mücadelede ve bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerin tedavisinde oldukça önemlidir ve fucoidan'ın farklı alg türlerinden elde edilen versiyonlarının yapısal farklılıkları ve kimyasal bileşimlerinin, anti-inflamatuar ve immünomodülatör aktiviteleri üzerinde belirleyici olduğu belirtilmektedir.

Fucoidan'ın farmakokinetik özellikleri, uygulama yöntemine göre değişiklik gösterebilmektedir. Nanoparçacıklar içinde enkapsüle edilmesi, hücre geçirgenliğini artırarak sitotoksik aktivitesini yükseltebilir (Apostolova vd. 2020).

Fucoidanın antitümör aktiviteleri de geniş bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Çeşitli kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif ve apoptotik etkiler göstermektedir. Kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurma ve programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) tetikleme

yeteneği, fucoidanın antitümör etkinliğini ortaya koymaktadır. Bu özellik, kanser tedavisinde destekleyici bir ajan olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Yapısındaki sülfat gruplarının yoğunluğu, bu biyolojik aktivitenin etkinliğini artırmaktadır (Li vd. 2008). Buna ek olarak, fucoidan antioksidan özellikleri ile de dikkat çekmektedir. Serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır. Bu antioksidan aktivite, hücrelerin yaşlanma sürecini yavaşlatmada ve oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kronik hastalıkların tedavisinde ve yaşlanma karşıtı ürünlerde fucoidanın kullanımı bu bağlamda değerlendirilmektedir (Patel, 2012).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, fucoidan'ın osteoporoz tedavisinde ve kemik metabolizmasının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca, antiinflamatuvar özellikleri sayesinde iltihaplanma süreçlerini azaltmada etkin olabileceği belirtilmektedir (Luthuli vd. 2019). Bu biyolojik aktiviteler, fucoidan'ı hem farmasötik hem de gıda takviyeleri alanında da değerli kılmaktadır.

2.4.2 Fucoidanın kullanım alanları ve kanserle ilişkisi

Fucoidan, geniş biyolojik aktivitelere sahip bir bileşik olarak çeşitli tıbbi ve sağlık uygulamalarında kullanılmaktadır. İnflamasyonu azaltıcı özellikleri sayesinde, artrit ve diğer kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde önemli bir ajan olarak değerlendirilmektedir. Özellikle, fucoidanın inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ederek inflamasyonu azaltabileceği bulunmuştur (Oliyaei vd. 2022). COVID-19 pandemisi sırasında fucoidanın antiviral etkileri de önemli bir araştırma konusu olmuştur. Fucoidanın SARS-CoV-2'ye karşı potansiyel koruyucu etkileri incelenmiş ve virüs replikasyonunu inhibe edebileceği ve bağışıklık yanıtını modüle edebileceği belirtilmiştir (Ogodo vd. 2022). Bu bulgular, fucoidanın viral enfeksiyonlara karşı etkili bir savunma mekanizması olabileceğini göstermektedir.

Fucoidanın antikoagölan ve anti-trombotik özellikleri, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde de önemli rol oynamaktadır. Fucoidanın kan pıhtılaşmasını inhibe ederek tromboz ve diğer kardiyovasküler rahatsızlıkların önlenmesinde etkili olabileceği

belirtilmiştir (Phull ve Kim, 2017). Bağışıklık sistemi üzerindeki olumlu etkileri sayesinde, fucoidan immün yanıtı güçlendirmek için de kullanılmaktadır. Fucoidanın bağışıklık hücrelerini aktive ederek ve inflamatuvar yanıtı modüle ederek immün sistemi güçlendirdiği gösterilmiştir (Oliyaei vd. 2022).

Kanser hücreleri üzerinde farmasötik ve terapötik yaklaşımlar açısından potansiyel bir etkiye sahip olabileceğine işaret eden sülfatlanmış polisakkaritler, deniz makrofitleri, polisakkaritler, yağ asitleri, biyoaktif peptitler, vitaminler, mineraller, antioksidanlar ve diğerleri dahil olmak üzere değerli ve yapısal olarak değişken biyolojik olarak aktif bileşiklerin kaynağı olarak bilinmektedir (Yao vd. 2022).

Fucoidanın kanser tedavisindeki potansiyeli, son yıllarda yapılan birçok araştırma ile desteklenmiştir. Bu bileşiğin çeşitli kanser türleri üzerinde antiproliferatif, pro-apoptotik ve anti-anjiyogenik etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır. Fucoidanın farklı kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptotik yolları aktive ettiği belirtilmiştir (Duan vd. 2020).

Özellikle meme kanseri üzerine yapılan araştırmalar, fucoidanın bu kanser türünde etkili olabileceğini göstermektedir. Fucoidanın meme kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu inhibe ederek metastazı önleyebileceği ortaya konmuştur (Lin vd. 2020). Bu çalışma, fucoidanın metastazla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek kanser hücrelerinin yayılmasını engelleyebileceğini göstermektedir. Kolon kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar da fucoidanın antikanser etkilerini desteklemektedir. Fucoidanın kolon kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü durdurarak ve apoptotik yolları aktive ederek hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Lin vd. 2020).

Fucoidanın kanser üzerindeki etkileri, hücresel sinyal yollarını modüle etmesi ve bağışıklık sistemini güçlendirmesi ile ilişkilidir. Bu bileşik, kanser hücrelerinde oksidatif stresi artırarak ve antioksidan savunma mekanizmalarını bozarak hücre ölümünü teşvik eder. Fucoidanın oksidatif stres ve apoptoz yoluyla kanser hücrelerini öldürdüğü belirtilmiştir (Shiau vd. 2022). Ayrıca, fucoidan, tümör mikroçevresinde inflamasyonu azaltarak ve immün yanıtı artırarak tümör büyümesini engelleyebilir. Fucoidanın immün

yanıtı modüle ederek ve inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ederek tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Phull ve Kim, 2017).

2.5 Kaveolin-1 Proteini Yapısı ve Özellikleri

Kaveola; İlk kez 1953'te gözlemlenen ve hücre zarının 60-80 nm çapında küçük "kese şeklindeki" invaginasyonlardır (Palade, 1953). Bu yapılar, bazı hücre yüzey reseptörleri de dahil olmak üzere çeşitli sinyal molekülleri ile zenginleştirilmiştir. Kaveola, fibroblastlarda, vasküler endotel hücrelerinde, adipositlerde ve epitel hücrelerinde belirgin şekilde bulunmaktadır. Kaveol'lerin ana membran bileşenleri, kaveolinler olarak bilinen bir integral membran proteinleri ailesidir. Kaveolinler endositoz, transitoz, lipid homeostazı, sinyal iletimi ve tümörigenez gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynarlar (Lai vd. 2021; Yang vd. 2021; Reshkin vd. 2022). Kaveolin-1, araştırmacılar tarafından kaveolanın önemli bir bileşeni olarak keşfedilen, plazma membranı, Golgi cisimciğı ve trans-Golgi türevi taşıma veziküllerinde lokalize olan bir proteindir (Glenney ve Soppet, 1992; Kurzchalia vd. 1992; Schlegel ve Lisanti, 2000).

Kaveolin-1 yaklaşık 22 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve merkezi transmembran bölgesi ile hem N-terminal hem de C-terminal uçları sitoplazmada bulunmaktadır. Bu özellik, proteinin plazma membranına sıkıca bağlanmasını sağlamaktadır. Kaveolin-1, hücre membranında lipid rafları adı verilen mikrodoman stabilizasyonunda kritik bir rol oynar. Bu mikrodomanlar, hücresel sinyal iletimi, endositoz ve kolesterol homeostazı gibi birçok önemli hücresel süreçte yer alır (Goetz vd. 2008). Kaveolin-1, hücre tipine bağlı olarak çözünür bir sitoplazmik formda veya salgılanan bir formda eksprese edilmektedir. (Rudick ve Anderson, 2002). Kaveolin ailesi üç üyeden oluşur: kaveolin-1, kaveolin-2 ve kaveolin-3. Kaveolin-1 çeşitli dokularda yaygın olarak eksprese edilirken, kaveolin-3 kaslara özgüdür. Stabilizasyon ve plazma membran lokalizasyonu için kaveolin-1 gereklidir (Parolini vd. 1999).

Kaveolin-1, çeşitli sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu sinyal yolları arasında Ras, Src kinaz ve eNOS gibi önemli proteinler bulunur. Kaveolin-1'in bu proteinlerle etkileşimi, hücresel büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi süreçleri

etkileyebilir. Hücre tipi ve dokuya bağlı olarak Kaveolin-1'in işlevi değişkenlik gösterebilir ve özellikle kanser biyolojisinde hem tümör baskılayıcı hem de tümör destekleyici roller üstlenebilir. (Goetz vd. 2008).

2.5.1 Tümör baskılayıcı rolü ve kanserle ilişkisi

Son yıllarda yapılan çalışmalar, Kaveolin-1'in kanser, diyabet, ateroskleroz, restriktif akciğer hastalığı, pulmoner fibrozis, kardiyomiyopati, kas distrofisi ve mesane disfonksiyonu dahil olmak üzere bir dizi insan hastalığında kaveolinin önemli rolü gösterilmiştir (Hnasko ve Lisanti, 2003). Birçok çalışma, tümör progresyonu sürecinde kaveolin-1'in önemini ortaya koymuş ve farklı tümör tiplerinde farklı ekspresyon seviyeleri ile tespit edilmiştir (Williams vd. 2005; Diaz-Valdivia vd. 2022). Birçok raporda, kaveolin-1 ekspresyonunun tümör derecesi, büyüklüğü ve evresi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Raja vd. 2019; Teruel vd. 2024; Wang vd. 2024).

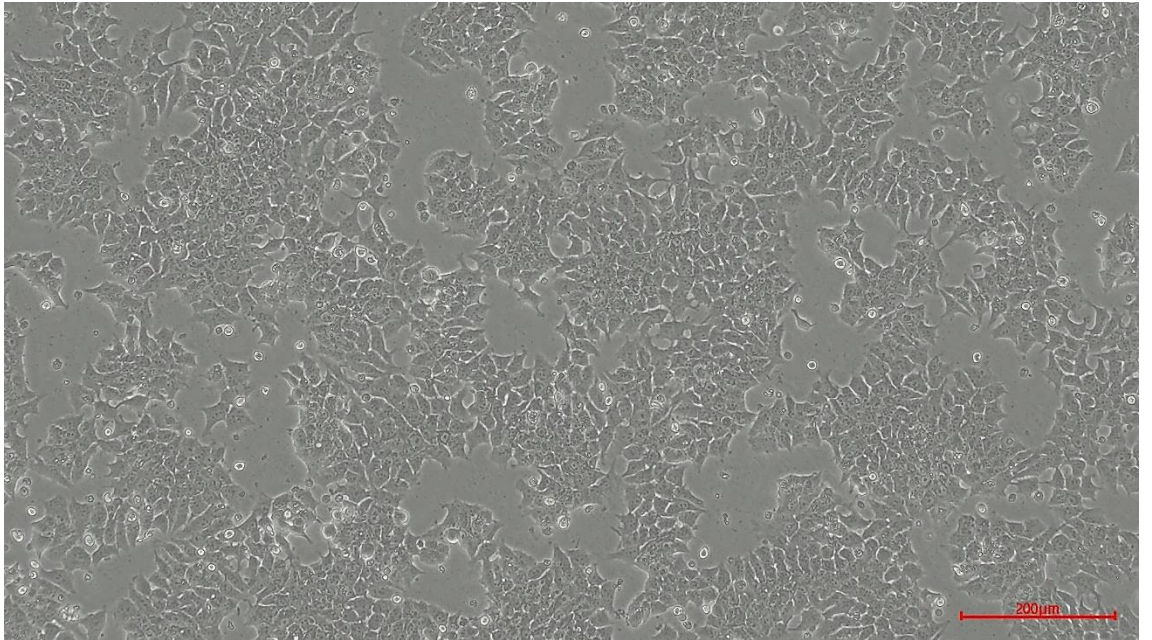
Özellikle meme kanseri gibi bazı kanser türlerinde, Kaveolin-1 seviyeleri tümör progresyonu ve metastaz ile ilişkilidir. Kaveolin-1'in düşük ekspresyonu, daha agresif tümör fenotipleri ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Önceki çalışmalarda meme kanseri hastalarında prognozu belirlemek için hem epitelyal hem de stromal kaveolin tespit edilmiştir (Witkiewicz vd. 2010).

Bununla birlikte, kaveolin-1'in aynı zamanda bir tümör baskılayıcı olarak da işlev gördüğü çalışmalar bulunmaktadır (Diaz vd. 2020). Kaveolin-1'in bu ikili rolünün tümör tiplerindeki ekspresyon düzeylerine bağlı olduğu ifade edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında sülfatlanmış polisakkaritlerden fucoidan ile muamele edilen MCF-7 kanser hücrelerinde, kaveolin-1 ekspresyonunun hangi yönde etkilendiği ve bu etkilerin tümör progresyonu ile olan bağlantısı değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışmasında kanser hücreleri üzerinde sitotoksik madde olarak kullanılacak sülfatlanmış polisakkarit olan fucoidan ticari olarak temin edilmiştir (Katalog No: C4038, ApexBio, Houston, USA). DMSO 'da 50 mg/ml konsantrasyonunda çözündürülerek fucoidan çözeltisi hazırlanmıştır. Ek olarak hazırlanan fucoidan çözeltisi, deneylere uygun olarak kullanılacak şekilde DMEM besiyeri ile farklı konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Benzer şekilde pozitif kontrol grubu olarak kullanılmış kemoterapötik bir ajan olan tamoxifen ticari olarak satın alınmıştır (Katalog No: B5965, ApexBio, Houston, USA). DMSO 'da 25 mg/ml konsantrasyonunda çözündürülerek tamoxifen çözeltisi hazırlanmıştır. Tez çalışması kapsamında yapılacak deneyler için meme kanseri MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri, %10 FBS ve %1 penicillin/streptomycin içeren yüksek glukozlu DMEM besi yeri ortamında, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ ihtiva eden ortamda kültürlenmiştir.



Şekil 3.1 MCF-7 meme kanseri hücrelerinin inverted mikroskop altında 10x büyütme ile elde edilen görüntüsü

3.1.1 MCF-7 hücre hattı ve özellikleri

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler için meme kanseri MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattı, 1970 yılında Michigan Kanser Vakfı tarafından oluşturulmuş ve adını buradan almıştır (Soule vd. 1973). Bu hücre hattı, invaziv duktal karsinoma tipi meme kanseri hücrelerinden türetilmiştir ve meme kanseri araştırmalarında en çok kullanılan hücre hatlarından biridir. MCF-7 hücre hattı meme kanseri hücre hattı alt tiplemesi için oldukça önemli olan östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktör 2 (HER2) değerlerine göre belirlenmiştir.

MCF-7 hücre hattı ER (+), PR (+) HER2 (-) değerlerine sahiptir (Dai vd. 2017). Bu özellik MCF-7 hücrelerini östrojen ve progesteron hormonlarına duyarlı hale getirmektedir ve bu sayede hormon tedavileri ile yapılan çalışmalarda ideal bir model oluşturmaktadır. Kanser hücrelerinin östrojen ve progesteron reseptörlerini taşıması kanserin, nispeten daha az agresif olduğu ve negatif değerlere göre daha iyi seyredebileceği anlamına gelmektedir. Dolayısıyla proje kapsamında MCF-7 hücrelerinin sitotoksik madde olarak uygulanacak olan fucoidan'a daha az direnç göstermesi ile birlikte daha olumlu sonuçlar alınması amaçlanmıştır. Fucoidan, deniz yosunlarından elde edilen bir polisakkarit olarak çeşitli kanser türlerinde antiproliferatif etkileri ile bilinirken, tamoxifen meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir östrojen reseptör modülatörüdür ve bu çalışmada pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Yapılan pek çok çalışmada, fucoidan'ın, doza bağımlı bir şekilde MCF-7 hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etkileri ile antiproliferatif ve antikanser özellikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte, fucoidan, normal insan meme epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir (Lu vd. 2018; Xue vd. 2013; Yamasaki-Miyamoto vd. 2009; Zhang vd. 2011). Literatür araştırmaları sonucunda fucoidanın insan meme kanseri için umut verici bir terapötik ajan olabileceği düşünülmektedir (He vd. 2019; Hsu ve Hwang, 2019).

3.1.2 Kullanılan cihazlar

Cihaz olarak: CO₂'li inkübatör (Nüve, Türkiye), Santrifüj (Nüve, Türkiye), Çalkalayıcı (MIU Lab, Çin), Sıcak su banyosu (Nüve, Türkiye), Mikroplaka okuyucu (BioTech, ABD), Hücre sayım cihazı (Bio-Rad, ABD), Inverted mikroskop (Olympus, Japonya), Vortex karıştırıcı (Helma, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal olarak: DMEM High Glucose, Fetal Bovine Serum, Trypsin-EDTA, Dulbecco's PBS, Penicillin/Streptomycin, MTT powder, L- glutamine, Fucoidan, Tamoxifen, Dimethyl Sulfoxide, Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity Assay Kit, Caspase3/7 Activity Assay Kit, Human CAV1 (Caveolin 1) ELISA Kit, Crystal Violet, Trypan Blue kullanılmıştır.

Sarf malzeme olarak: 25 'lik ve 75 'lik Hücre Kültür Flaskları, 6 'lı ve 96'lı Kuyulu Hücre Kültürü Plakaları, 15 ml ve 50 mL 'lik Falkon Tüpler, 1,5 ml ve 2 mL 'lik Ependorflar, Cryo Tüpler , 10 ve 25 mL 'lik Serolojik Pipet, 10, 100, 1000 µL 'lik pipet uçları kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre kültürü

Hücre kültürü, izole edilmiş hücrelerin kontrollü laboratuvar koşullarında büyütülmesini ve çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu yöntem, biyolojik ve tıbbi araştırmalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Hücre kültürü, hücrelerin doğal ortamlarından alınarak, steril ve besin açısından zengin bir ortamda büyütülmesi sürecini içermektedir. Böylece, hücrelerin büyümesi, gelişmesi ve davranışları detaylı bir şekilde incelenmektedir.

Sunulan tez çalışması kapsamında, invaziv duktal karsinoma tipi meme kanseri hücrelerinden türetilmiş MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattı %10 fetal bovine serum ve %1 penicillin/streptomycin içeren yüksek glukozlu DMEM besi yeri ortamında, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ ihtiva eden ortamda kültürlenmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşarak konfluans hale gelen hücreler, hücrelerin yüzeyden ayrılması için tripsin-EDTA çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bu işlem, hücrelerin birbirinden ayrılmasını ve süspansiyon haline gelmesini sağlamaktadır. Ayrılan hücreler daha sonra T-75 kültür flasklarına transfer edilerek uygun yoğunluklarda pasajlanmıştır. Devam eden deney süreçlerinde hücrelerin proliferasyonu, pasajları ve izleme işlemleri düzenli aralıklarla inverted mikroskop kullanılarak gözlemlenmiştir.

3.2.1.1 Hücre sayımı

Canlı hücre sayımını belirlemek için, flasktan kaldırılan hücreler besiyerinde çözdürülmüş homojenize bir karışım elde edilmiştir. Hücre sayımı için 10 µL Tryphan Blue boyası, 10 µL hücre süspansiyonuna eklenmiş ve bu sayede ölü hücreler mavi renkte boyanarak canlı hücrelerden ayrılmıştır. Canlı hücrelerin sayımı için oluşturulan karışımdan 10 µL alınıp otomatik hücre sayım cihazı (TC20™ Bio-Rad) kullanılarak hassas bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bununla birlikte çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kemoterapötik bir ajan olan Tamoxifen kullanılmıştır. Tamoxifen, özellikle östrojen reseptör pozitif (ER+) meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antiöstrojen ilaçtır. Bu ilaç, meme kanserinde östrojen reseptörlerine bağlanarak, östrojenin bu reseptörlerle etkileşimini engeller ve bu sayede kanser hücrelerinin büyümesini kısıtlayarak tümörlerin büyümesini engellemeye yardımcı olmaktadır (Jordan, 2003).

Tez çalışmasında kullanılan MCF-7 hücre hattında besiyeri olarak High Glukoz DMEM kullanılmıştır. High Glukoz DMEM; 5 mL FBS, 1 mL penicillin/streptomycin ve 44 mL DMEM eklenerek 50 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.2 Fucoidan ve Tamoxifen muamelesi

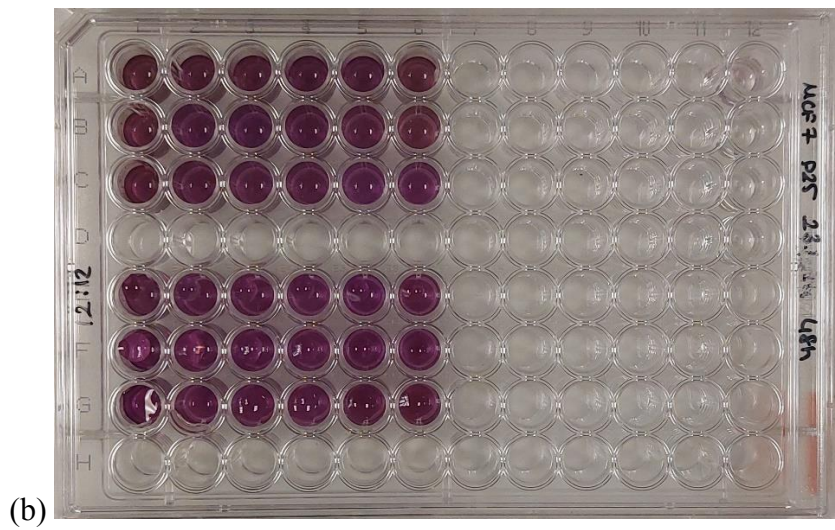
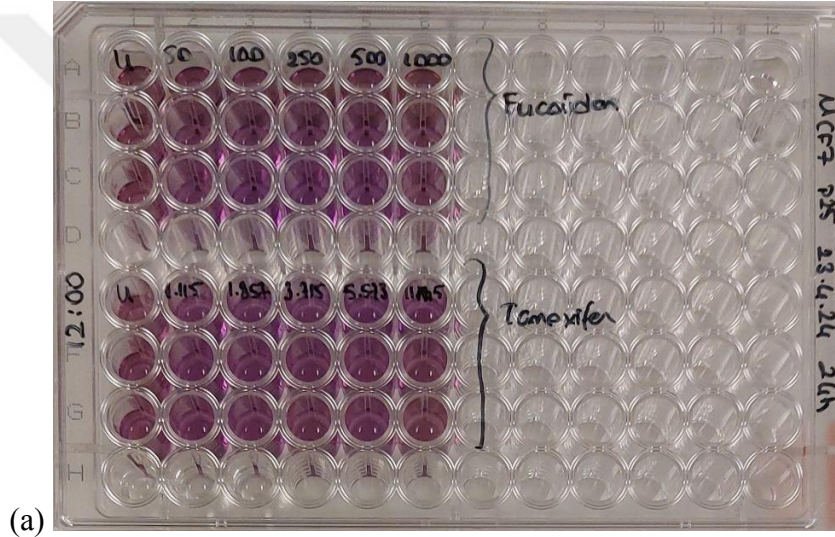
Fucoidan solüsyonu hazırlamak için, fucoidan DMSO içerisinde 50 mg/ml olacak şekilde çözündürülmüştür. Fucoidan'ın kanser hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek için, 96 kuyulu hücre plakalarının her bir kuyusuna yaklaşık 10.000 hücre ekilmiştir ve uygun dozu belirlemek için hücreler farklı konsantrasyonlarda (100, 200, 400, 800, 1600, 3200 µg/ml) fucoidan ile muamele edildikten sonra 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Benzer şekilde, pozitif kontrol grubu olan hücreler, farklı konsantrasyonlarda (2.83, 5.65, 11.30, 22.60 µg/ml) kemoterapötik bir ajan olan tamoxifen ile muamele edildikten sonra 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Sadece besiyeri içeren kuyular ve kemoterapötik ajan içeren kuyular kontrol grupları olarak kullanılmıştır ve etken maddeleri MCF-7 hücre hattı üzerindeki değişimlerinin tespiti yapılmıştır.

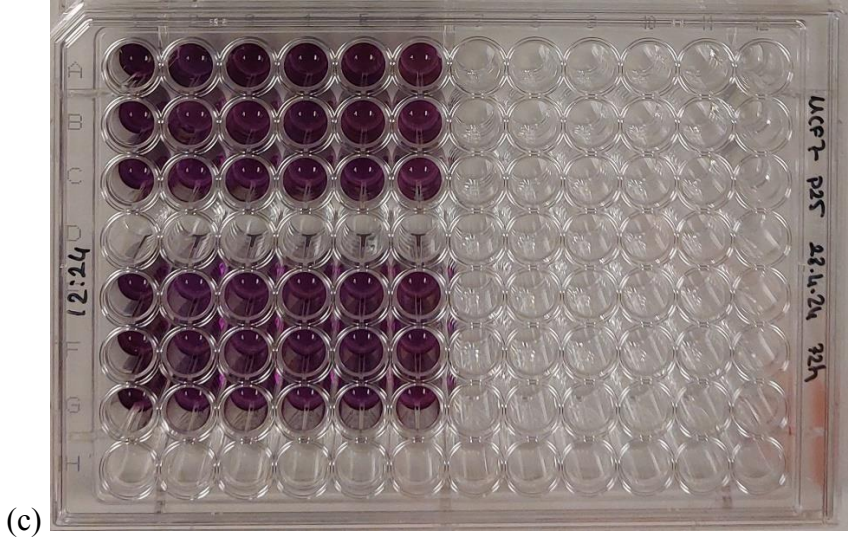
3.2.3 Hücre canlılık testi

Hücre canlılığını takip etmek amacıyla metabolizmaya dayalı hücre proliferasyonu testi olarak da bilinen MTT testi kullanılmıştır. MTT testinde esas amaç hücre çoğalması ve hücre canlılığı ölçümüdür. Prensipte olarak, MTT testi, canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesinin sabit kaldığı varsayımına dayanır ve canlı hücrelerin sayısındaki değişikliklerin doğrudan mitokondriyal aktivite ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, mitokondriyal aktivite, tetrazolyum tuzunun mor renkli formazan kristalleri şekline dönüştürülmesiyle tespit edilmektedir (Mosmann, 1983). Hücre canlılıkları MTT tozu kullanımıyla spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

MCF-7 hücreleri büyüme besiyeri ortamında 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir. Fucoidan'ın kanser hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek için hücre canlılığın değerlendirilmesinde, trypan blue boyası kullanarak sayım yapılarak 96 kuyulu hücre plakalarının her bir kuyusuna yaklaşık 10.000 hücre ekilmiştir hücreler plakaya tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücreler, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 µg/ml konsantrasyonlarda fucoidan ile muamele edildikten sonra 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Benzer şekilde pozitif kontrol grubu olan hücreler kemoterapötik bir ajan olarak tamoxifen ile 2.83, 5.65, 11.30, 22.60 µg/ml

konsantrasyonlarda edildikten sonra 24, 48 ve 72 saat 37 °C'ye ayarlanmış %5 CO₂ inkübatöründe IC₅₀ değerini belirlemek amacıyla inkübe edilmiştir. İstenilen zaman noktasından sonra, ortamdaki her bir kuyucuğa 10 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. Formazan kristalleri oluşana kadar 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuk başına 100 µL DMSO eklenerek formazan kristalleri çözündürülmüştür. Plakalar, 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınarak, her bir konsantrasyon için 3 tekrar olacak şekilde mikroparka okuyucuda okunmuştur. Hem fucoidan hem de tamoxifen için, yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) hesaplanmıştır.





Şekil 3.2 MCF-7 hücrelerine uygulanan MTT testinde (a) 24 saat, (b) 48 saat, (c) 72 saat inkübasyon sonrası 96 kuyulu plaka görüntüleri ve formazan oluşumu

3.2.4 Sitotoksosite analizi

Sitotoksosite analizi LDH sitotoksosite test kiti kullanılarak yapılmıştır. Laktat dehidrojenaz, tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücreler, toksik etkilere maruz kaldığında plazma membran bütünlükleri bozulur ve LDH enzimi hücrelerden sızarak vasata geçer. Böylece maruziyet sonrası LDH enzim aktivitesi ölçülerek hücre hasarı değerlendirilebilmektedir. (Lappalainen vd. 1994; Riss ve Moravec, 2006).

Hücre sitotoksitesini biyokimyasal olarak değerlendirmek için aşağıda verilen LDH sitotoksosite test kiti protokol basamakları uygulanmıştır.

3.2.4.1 Örnek hazırlığı

Örnek gruplarını oluşturmak için hücreler fucoidan ve tamoxifen için belirlenen IC50 dozları ile muamele edilmiştir. Sadece besiyeri bulunan grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

- LDH enzim analizi için en az 1×10^6 hücre gerekmektedir.
- Hücreler kaldırma işlemleri için 3 mL 1x PBS ile yıkandı.

- PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL tripsin eklenip 3 dk 37°C’de inkübatöre bırakıldı.
- Hücrelerin kalkması inverted mikroskopta gözlemlendi.
- 3 mL inaktivasyon besiyeri Tripsin EDTA’lı hücelere eklendi ve 15 mL’lik falkona aktarılarak 200 xg’de 5 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant ile birlikte eski besiyeri atıldı ve 1 mL taze besiyeri eklendi.
- 1×10^6 hücre 300uL PBS içinde 4°C’de ile ultrasonikatör ile homojenize edilmiştir. (PBS: homojenize ortamı olarak kullanılmıştır.)
- Çözünmeyen materyalin uzaklaştırılması için 4°C’de 10000×g’de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir, süpernatant toplanmıştır ve analiz adımına geçilmiştir.

3.2.4.2 Reaktif hazırlığı

- Kullanım sırasında Koenzim I buzda tutulmuştur ve diğer reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
- Koenzim I uygulama solüsyonunun hazırlanması: Bir tüp Koenzim I 1.33 mL çift distile su ile çözülmüştür.
- Alkali uygulama solüsyonunun hazırlanması: 20 µL alkali reaktifi ve 180 µL çift distile su karıştırılarak her kuyu için, 200 µL alkali uygulama solüsyonu hazırlanmıştır.
- Standart eğrisinin hazırlanması: 2 µmol/mL pirüvik asit standart çözelti çift distile su ile bir dizi konsantrasyona kadar seyreltilmiştir. Tavsiye edilen seyreltme gradyanı aşağıdaki gibidir;

Item	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
Concentration (µmol/mL)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
2 µmol/mL standard (µL)	0	10	20	40	80	120	160	200
Double distilled water (µL)	400	390	380	360	320	280	240	200

3.2.4.3 LDH enzim aktivite analizi

- Enzim Aktivitesini belirlemek için 3 grup oluşturulmuştur.

Standart grubu: Standart grubu kuyularına 5 µL çift distile su ve 20 µL 0.2 µmol/mL pirüvik asit standart uygulama solüsyonu eklendi.

Örnek grubu: Örnek kuyularına 20 µL örnek eklendi.

Kontrol grubu: Kontrol kuyularına 5 µL çift distile su ve 20 µL örnek kontrol solüsyonu eklendi.

- Her bir kuyuya 25 µL substrat buffer eklendi.
- Örnek kuyularına 5 µL koenzim I uygulama solüsyonu eklendi.
- Tamamen karıştırıldı ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- Her bir kuyuya 25 µL kromojenik ajan eklendi. Tamamen karıştırıldı ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- Her bir kuyuya 200 µL reaktif alkali uygulama solüsyonu eklendi.
- Tamamen karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Mikroplaka okuyucuda her kuyunun 450 nm'de OD değerlerini ölçüldü ve sonuçlar her örnek için hesaplandı.

3.2.5 Apoptoz analizi

Apoptoz analizi kaspaz 3/7 aktivite kolorimetrik test kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle tespit edilmiştir. Erken ve geç apoptoz evrelerinde önemli biyokimyasal olaylardan biri sistein proteazları olarak da bilinen kaspazlar'ın aktivasyonudur. Doku ve hücrelerde kaspaz-3 aktivitesinin saptanması ve değerlendirilmesi apoptoza neden olan çeşitli apoptotik sinyallerin tespit edilmesi için önemli bir yöntem olarak bilinmektedir (Wang vd. 2021).

Kaspaz aktivitesi için enzimatik reaksiyon aşağıda verilen kaspaz 3/7 aktivite kolorimetrik test kiti protokol basamakları uygulanarak değerlendirilmiştir.

3.2.5.1 Örnek hazırlığı

Örnek gruplarını oluşturmak için hücreler fucoidan ve tamoxifen için belirlenen IC50 dozları ile muamele edilmiştir. Sadece besiyeri bulunan grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

- 1×10^6 hücre sayılarak daha önce LDH kiti örnek hazırlığında belirtilen yöntemlerle toplanmıştır.
- 1×10^6 hücre PBS ile süspanse edildikten sonra $600 \times g$ 'de 5 dakika santrifüjlenmiştir ve süpernatantı atılarak ve hücre pelleti tutulmuştur.
- Hücre pelleti önceden soğutulmuş Hücre Lizis Tamponu ile, 1×10^6 hücre başına 100 μL olacak şekilde muamele edildi ve buz banyosunda her seferinde 10 saniye olmak üzere 3-4 kez karıştırılarak 30 dakika inkübe edildi.
- Ardından lizis işlemi yapılmış örnek $4^\circ C$ 'de $11000 \times g$ 'de 10-15 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatantı dikkatlice yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı ve kullanmak üzere buz üzerinde bekletildi.

3.2.5.2 Reaktif hazırlığı

pNA Standart Eğrisinin Hazırlanması:

- 1) Standart seyreltici hazırlama: Standart seyreltici hazırlamak için Hücre Lizis Tamponu ve $2 \times$ Reaksiyon Tamponu 1:1 oranında alındı ve tamamen karıştırıldı.
- 2) Seyreltme yöntemi: 6 adet ependorf tüpü alındı, ilk tüpe 294 μL standart seyreltici eklendi ve diğer her tüpe 150 μL standart seyreltici eklendi. İlk tüpe 6 μL pNA (10 mM) eklendi ve 200 μM pNA çalışma çözeltisi elde etmek için karıştırıldı. Bir önceki tüpten 150 μL çözelti alarak sonraki tüpe eklendi. Son tüp, blank olarak kabul edildi ve önceki tüpten çözelti eklenmedi. Farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerden 100 μL alarak 96 'lı plaka kuyularına eklendi.

3.2.5.3 Caspase 3/7 enzim aktivite analizi

- Lizis işlemi yapılmış örnek çözeltisinden 50 µL alındı ve aşağıdaki tabloya göre reaksiyon sistemi kuruldu.

	Blank	Experimental group
Cell Lysis Buffer	50 µL	0 µL
2×Reaction Buffer	45 µL	45 µL
Sample	0 µL	50 µL
Ac-DEVD-pNA	5 µL	5 µL
Total Volume	100 µL	100 µL

- Reaksiyon sistemi kurulurken, önce 2×Reaksiyon Tamponu, ardından örnekler, son olarak AC-DEVD-pNA eklendi ve kabarcık oluşumundan kaçınmak için nazıkçe karıştırıldı.
- Renk değişimi belirgin hale gelene kadar 37°C'de 1-2 saat inkübe edildi.
- 405 nm'de OD değerleri ölçüldü ve sonuçlar hesaplandı.

3.2.6 Kaveolin-1 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

Kaveolin-1 ekspresyon seviyeleri, kaveolin-1 kolorimetrik ELISA kit kullanılarak üreticinin talimatlarına uygun şekilde tespit edilmiştir. Kit test prensibi, Sandwich enzim immünosorbent yöntemi üzerine kuruludur. Kaveolin-1 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi, hücre veya doku örneklerinde bu proteinin miktarını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Test prensibinde, örneklerdeki Kaveolin-1 protein seviyesi, antikorlar kullanılarak saptanmaktadır ve ölçülen değerler standart bir eğriyle karşılaştırılarak kantitatif bir sonuca ulaşılmaktadır.

3.2.6.1 Örnek hazırlığı

Örnek gruplarını oluşturmak için hücreler fucoidan ve tamoxifen için belirlenen IC50 dozları ile muamele edilmiştir. Sadece besiyeri bulunan grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Deneye başlamadan önce hücreler aşağıdaki talimatlara göre lizis işlemi gerçekleştirilmiştir:

- 1) Adherent MCF-7 hücreleri soğuk PBS ile nazikçe yıkanmıştır. Ardından tripsin ile kaldırılmıştır ve $1000 \times g$ 'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek toplanmıştır.
- 2) Hücreler 3 kez önceden soğuk PBS ile yıkanmıştır.
- 3) Daha sonra, hücreler taze lizis tamponunda 10^7 hücre/ML konsantrasyonunda yeniden süspanse edilmiştir. Çözelti berrak olana kadar hücrelere ultrasonikasyon uygulanmıştır.
- 4) Ardından $2-8^{\circ}C$ 'de 10 dakika boyunca $1500 \times g$ 'de santrifüj edilmiştir ve analize hazırlanmıştır.

3.2.6.2 Reaktif hazırlığı

- Deneye başlamadan önce tüm kit bileşenleri ve örnekler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- $25\times$ Yıkama Tamponunu çift distile su ile $1\times$ Yıkama Tamponuna seyreltilmiştir.
- Standart Çalışma Solüsyonu hazırlamak için standart $1000 \times g$ 'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Standart 1 mL Standart Diluent Buffer ile yeniden çözündürülmüş ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek nazikçe çalkalanmıştır. Stok çözeltideki standartın konsantrasyonu 15 ng/mL'dir.
- 0.5 mL Standart Diluent Buffer içeren 7 tüp hazırlanmıştır ve seri dilüsyon oluşturmak için; 15 ng/mL, 7.5 ng/mL, 3.75 ng/mL, 1.88 ng/mL, 0.94 ng/mL, 0.47 ng/mL, 0.24 ng/mL konsantrasyonlarında dilüe standart ayarlanmıştır ve son ependorf tüpü 0 ng/mL olacak şekilde boş bırakılmıştır.
- Biotinylated Antibody ve Streptavidin-HRP kullanmadan önce kısa bir süre santrifüj edilmiştir. Sırasıyla Biotinylated Antibody Diluent ve HRP Diluent ile çalışma konsantrasyonuna 100 kat seyreltilmiştir.

3.2.6.3 Kaveolin-1 ekspresyon analizi deney prosedürü

- 1) Kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildikten sonra belirlenen 100 μ L Standard Working Buffer (talimatlara göre aşamalı olarak seyreltilmiş) ve 100 μ L numune eklenmiştir ve 37°C'de 80 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 2) Plakadaki sıvı uzaklaştırılmıştır, her kuyuya 200 μ L 1 $\times$ Wash Buffer eklenmiştir ve plaka 3 kez yıkanmıştır. Temiz emici kağıtla kuruladıktan sonra, her kuyuya 100 μ L Biotinylated Antibody Work (1 $\times$) eklenmiştir ve 37°C'de 50 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 3) Plakadaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tekrar her kuyuya 200 μ L 1 $\times$ Wash Buffer eklenmiştir ve plaka 3 kez yıkanmıştır. Temiz emici kağıtla kuruladıktan sonra, her kuyuya 100 μ L 1 $\times$ Streptavidin-HRP Working Solution eklenmiştir ve 37°C'de 50 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 4) Plakadaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 200 μ L 1 $\times$ Wash Buffer ekleyerek 5 kez yıkama yapılmıştır. Kuruladıktan sonra, her kuyuya 90 μ L TMB Substrate Solution eklenmiştir ve karanlıkta 37°C'de 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 5) Son aşamada her kuyuya 50 μ L Stop Solution eklenmiştir ve 1 dakika boyunca karıştırmak için plaka sallayıcıda çalkalanmıştır. Daha sonra 450 nm'de OD okuması alınmıştır ve sonuçlar hesaplanmıştır.

3.2.7 Koloni oluşum testi

Koloni oluşum testi Fucoidan ve Tamoxifen maddelerinin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisini ve klonal büyüme yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

500 hücre 6 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna ekildi ve ekilen hücrelerin tutunabilmesi için 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası eski besiyeri atılmış ve belirlenen IC₅₀ dozları dikkate alınarak Fucoidan ve Tamoxifen içeren besiyeriler kuyulara eklenmiştir. Fucoidan ve Tamoxifen içermeyen besiyeri negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 72 saat inkübasyondan sonra Fucoidan ve Tamoxifen içeren besiyerleri uzaklaştırılıp taze besiyeri ile değiştirilmiştir.

7. Gün tamamlandıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmış ve ardından metanol ile 5 dakika muamele edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler 0,5 mL %0,5'lik kristal viyole ile 30 dakika boyandıktan sonra yıkanmıştır ve morfolojik görüntüleri fotoğraflanmıştır. Her bir test grubundaki 50'den fazla hücre içeren koloniler mikroskop altında sayılmış ve sonuçlar kontrol grubuna göre normalize edilerek hücre sayısı olarak ifade edilmiştir.

3.2.8 Hücre göçü analizi

Hücre göçü olarak da bilinen hücre migrasyonu analizi, yara iyileşmesi veya kanser hücrelerinde metastaz gibi çeşitli fizyolojik aktivitelerin mekanizmalarını aydınlatmak amacıyla *in vitro* olarak ölçülen bir testtir.

Uygulama protokolü olarak 6 kuyulu plakaya 1.000.000 hücre ekilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Steril 1000 µL'lik pipet ucu kullanılarak kuyularda bir çizik oluşturulmuştur. IC50 değeri belirlenmiş konsantrasyonlarda fucoidan ve tamoxifen çözeltileri içeren besiyerleri kuyulara eklenmiş, kontrol grubu olarak sade besiyeri eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 saatler olacak şekilde belirli aralıklarla fotoğraf çekilmiş ve aralığın iki kenarı arasındaki mesafeler belirlenen referans noktalarında ölçülmüş, ImageJ (NIH, ABD) yazılımı kullanılarak analizi yapılmıştır.

3.2.9 İstatistiksel analizler

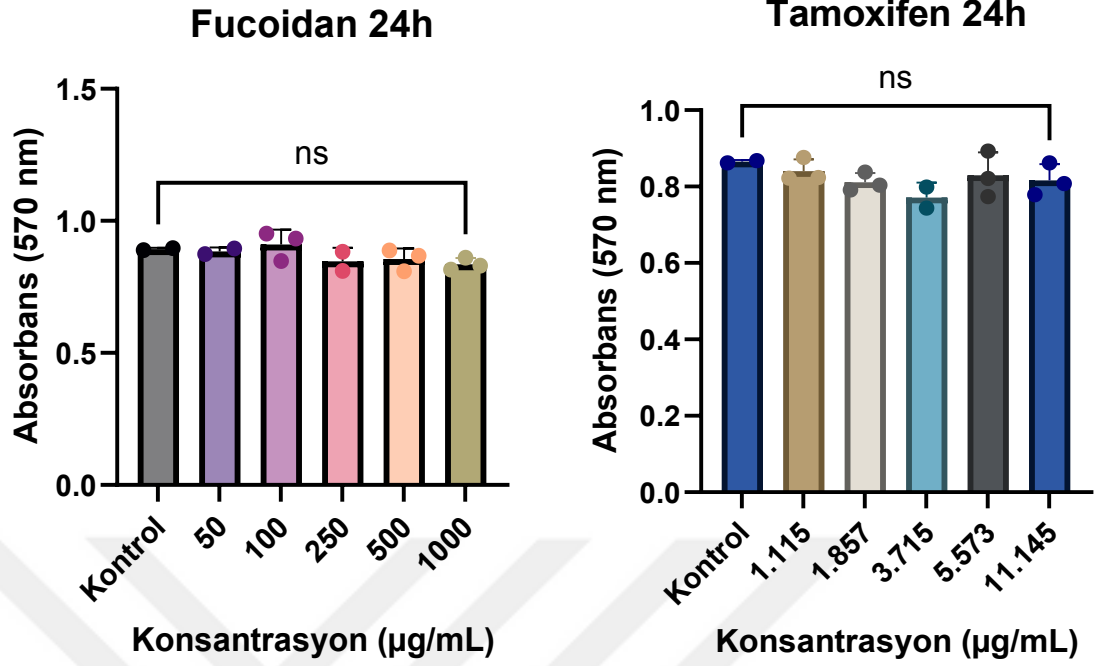
Sunulan tez çalışmasında hücre canlılığı sonuçları ortalama $\pm$ standart sapma (SEM) olarak ifade edilmiştir. Tüm analizlerde elde edilen veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA), Dunnett ve Tukey analizleri ile birlikte GraphPad Prism v.10.1.0 (GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Fucoidanın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

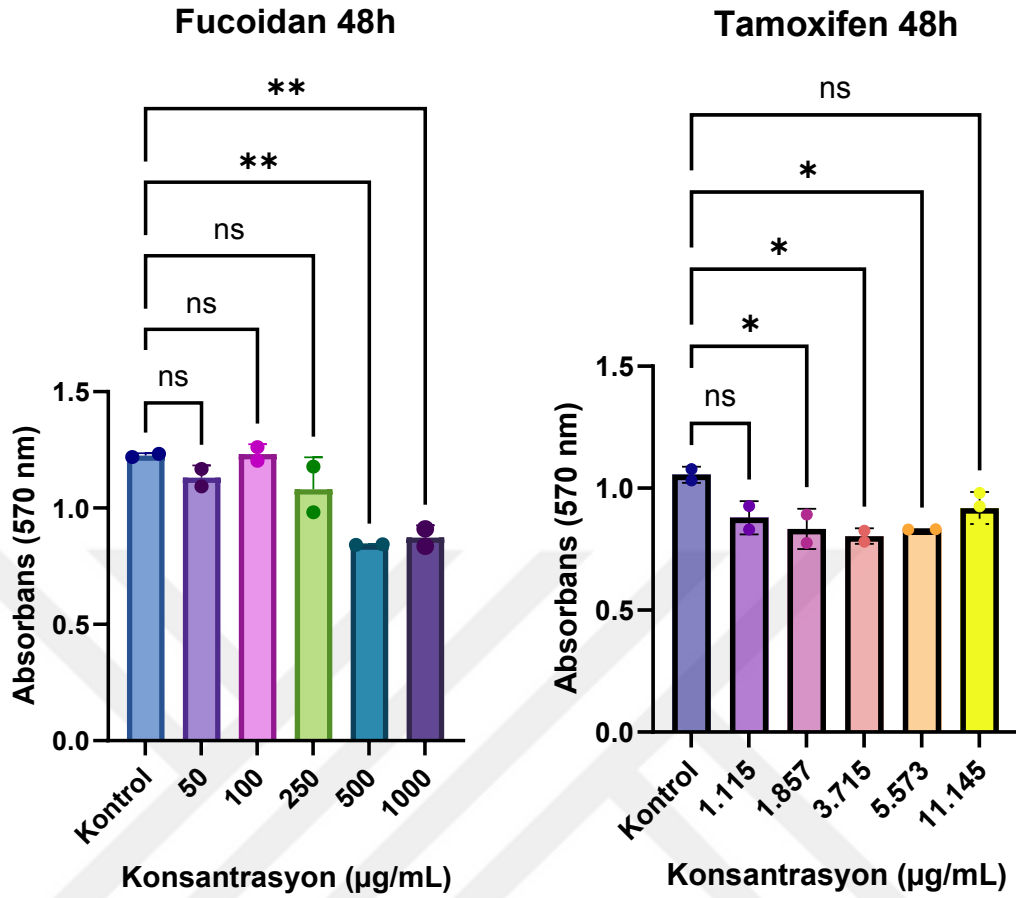
Sülfatlanmış polisakkarit Fucoidanın ve pozitif kontrol olarak kullanılan Tamoxifenin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72 saat sonra MTT testi ile belirlenmiştir. Sitotoksik etkilerinin belirlenebilmesi için hücrelere farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml) fucoidan ve 1.115, 1.857, 3.715, 5.573, 11.145 µg/ml tamoxifen DMSO 'da çözünerek uygulanmıştır. Ancak MTT sonuçları ile gerekli analizler yapıldığında dozların yükseltilerek optimum saat olan 72 saatte deney tekrarı yapılmasına karar verilmiştir.

100, 200, 400, 800, 1600, 3200 µg/ml fucoidan ve 2.83, 5.65, 11.30, 22.60 µg/ml tamoxifen DMSO' da çözünerek uygulanmıştır. Farklı dozlarla işlem gören mikro plakalar, optimum saat olarak belirlenen 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, MCF-7 hücrelerinin canlılık oranlarını belirlemek amacıyla MTT analizi yapılarak mikroparka okuyucusunda 540 nm'de ölçümler yapılmıştır. MTT analizi ile elde edilen verilerden sitotoksik dozları belirlemek için fucoidan ve tamoxifenin hücreleri en çok öldürdüğü değerin yarısı olan IC50 değeri hesaplanmıştır.



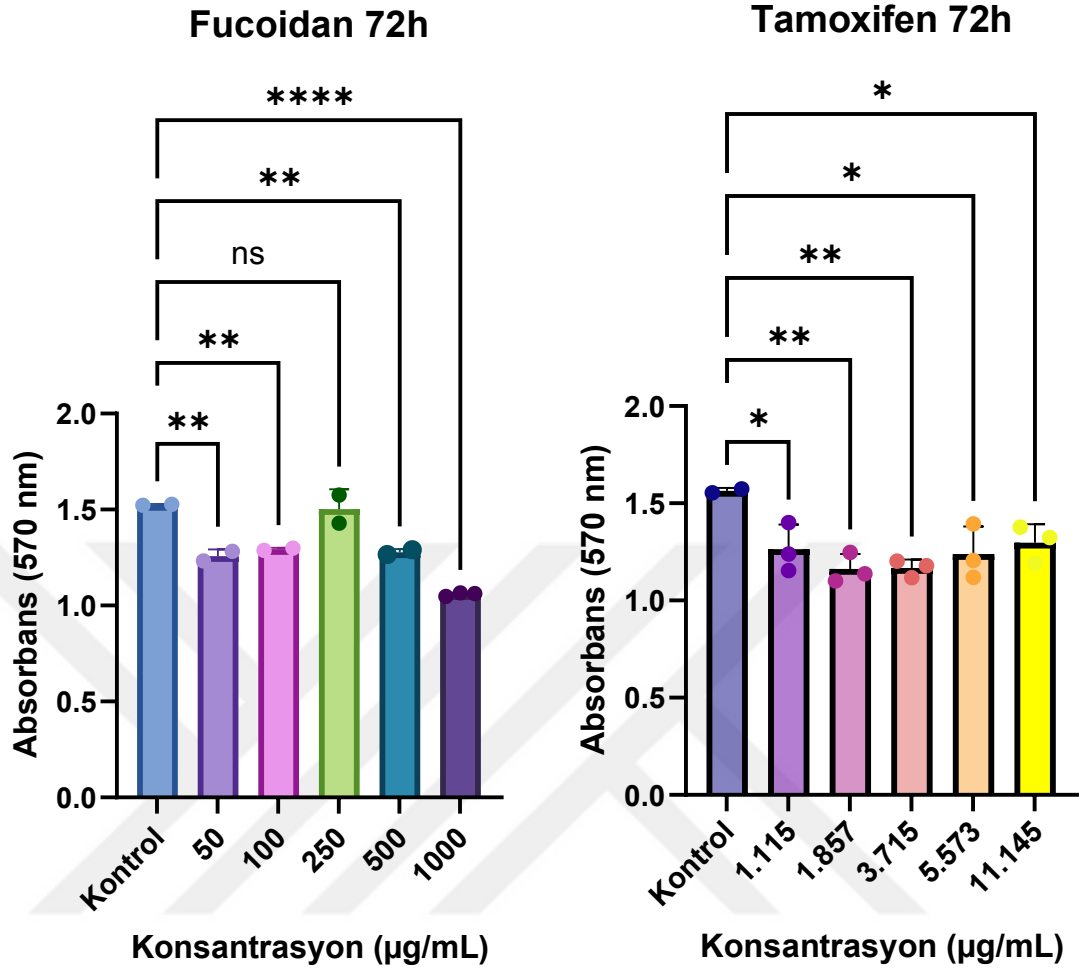
Şekil 4.1 24 saatte Fucoidan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler (Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, ns: anlamlı olmayan fark).

24 saatlik fucoidan uygulamasında, 50-1000 µg/mL aralığındaki farklı konsantrasyonların hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Uygulanan dozlar kontrol grubuna benzer absorbans değerleri göstermiştir. Benzer şekilde tamoxifenin 24 saatlik uygulaması sonrasında, 1.115-11.145 µg/mL konsantrasyonlarındaki gruplarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.



Şekil 4.2 48 saatte Fucoidan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler (Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, ns: anlamlı olmayan fark, $p < 0.05$: *, $p < 0.01$: **).

Fucoidan'ın düşük konsantrasyonları (50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$) ile kontrol grubu arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu, fucoidan'ın bu dozlarda hücre canlılığı üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. 250 $\mu\text{g/mL}$ ve üzeri konsantrasyonlarda (500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$) ise hücre canlılığında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu durum, fucoidan'ın daha yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik bir etki oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, tamoxifenin en düşük konsantrasyonu olan 1.115 $\mu\text{g/mL}$ 'de hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlenmemiştir.



Şekil 4.3 72 saatte Fucoidan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler (Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, ns: anlamlı olmayan fark, $p < 0.05$: *, $p < 0.01$: **, $p < 0.001$: ***, $p < 0.0001$: ****).

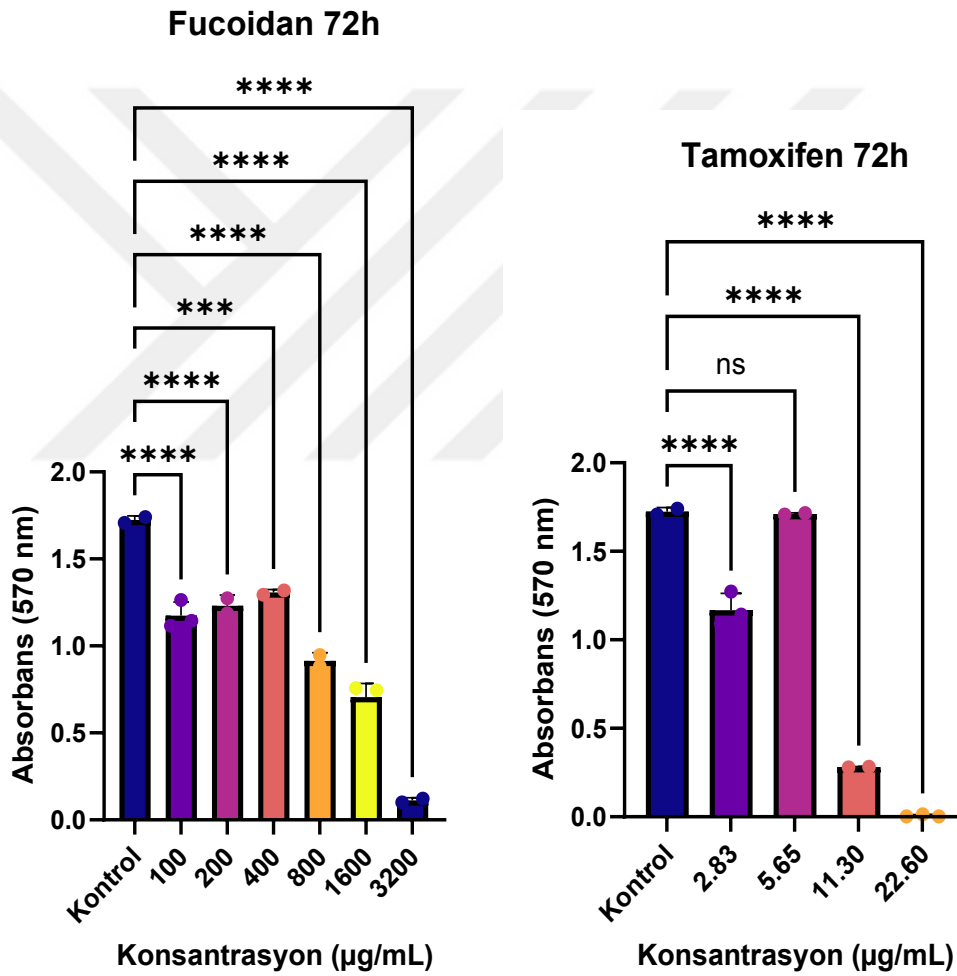
Çizelge 4.1 MCF-7 hücre hattında, farklı konsantrasyonlarda Fucoidan ve Tamoxifen'in 24, 48 ve 72 saatte ölçülen absorbans değerleri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 3)

Konsantrasyon (mg/mL)	24 Saat Fucoidan Mean $\pm$ SEM	48 Saat Fucoidan Mean $\pm$ SEM	72 Saat Fucoidan Mean $\pm$ SEM
Kontrol	0,9117 $\pm$ 0,0146	1,178 $\pm$ 0,0397	1,672 $\pm$ 0,1448
50	0,9107 $\pm$ 0,0269	1,196 $\pm$ 0,0664	1,471 $\pm$ 0,2115
100	0,911 $\pm$ 0,0275	1,154 $\pm$ 0,0746	1,353 $\pm$ 0,0599
250	0,806 $\pm$ 0,0378	1,1807 $\pm$ 0,0997	1,404 $\pm$ 0,1107
500	0,855 $\pm$ 0,0186	0,9857 $\pm$ 0,0987	1,310 $\pm$ 0,0334
1000	0,8353 $\pm$ 0,0118	0,8123 $\pm$ 0,0627	1,059 $\pm$ 0,0053
Konsantrasyon (μM)	24 Saat Tamoxifen Mean $\pm$ SEM	48 Saat Tamoxifen Mean $\pm$ SEM	72 Saat Tamoxifen Mean $\pm$ SEM
Kontrol	0,833 $\pm$ 0,0287	1,157 $\pm$ 0,0934	1,646 $\pm$ 0,0835
1.115	0,841 $\pm$ 0,0160	0,954 $\pm$ 0,0731	1,265 $\pm$ 0,0725
1.857	0,811 $\pm$ 0,0134	0,8917 $\pm$ 0,0673	1,162 $\pm$ 0,0443
3.715	0,7923 $\pm$ 0,0215	0,8703 $\pm$ 0,0577	1,167 $\pm$ 0,0246
5.573	0,8293 $\pm$ 0,0303	0,888 $\pm$ 0,0526	1,240 $\pm$ 0,0809
11.145	0,8163 $\pm$ 0,0198	0,9187 $\pm$ 0,0310	1,298 $\pm$ 0,0551

72 saat sonunda yapılan MTT analizi sonucunda hem fucoidan hem de tamoxifenin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde doza bağımlı bir sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Fucoidan, 50 ve 100 μ g/mL konsantrasyonlarında hücre canlılığını anlamlı derecede azaltmıştır ($p < 0.01$). Bununla birlikte, 500 ve 1000 μ g/mL gibi yüksek konsantrasyonlarda fucoidanın, hücre canlılığını belirgin şekilde baskıladığı ve ciddi bir sitotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir ($p < 0.0001$).

Tamoxifen ise, düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını kademeli olarak azalttığı halde, belirgin sitotoksik etkisini daha yüksek konsantrasyonlarda göstermiştir. 1.115 - 3.715 μ g/mL aralığında tamoxifenin, MCF-7 hücre canlılığını anlamlı şekilde düşürdüğü ($p < 0.05$), ancak etkisinin fucoidana kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır. Yüksek tamoxifen konsantrasyonları, hücre canlılığını azaltmış, ancak bu azalma $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı olmuştur. Bu, tamoxifenin doza bağlı olarak sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu, ancak bu etkinin uygulanan en yüksek konsantrasyonlarda bile belirgin şekilde güçlü olmadığını göstermektedir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, fucoidan ve tamoxifenin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini daha kapsamlı incelemek amacıyla, daha yüksek konsantrasyonlar kullanılarak deney tekrarlanmıştır. Önceki analizlerde 72 saatin en etkili zaman dilimi olduğu gözlemlendiği için, bu süre yeniden deneyde tercih edilmiştir. Bu sayede, her iki sitotoksik maddenin doza bağlı etkilerini daha net bir şekilde değerlendirme ve hücre canlılığı üzerindeki maksimum sitotoksik etkiyi belirleme imkanı sağlanmıştır.



Şekil 4.4 Yeni dozlar ile deney tekrarı yapıldıktan sonra 72 saatte Fucoidan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler (Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, ns: anlamlı olmayan fark, $p < 0.0001$: ****).

Çizelge 4.2 MCF-7 hücre hattında, farklı konsantrasyonlarda Fucoidan ve Tamoxifen'in 72 saatte ölçülen absorbans değerleri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 3)

Konsantrasyon (mg/mL)	72 Saat Fucoidan Mean $\pm$ SEM
Kontrol	1,671 $\pm$ 0,056
100	1,174 $\pm$ 0,044
200	1,298 $\pm$ 0,072
400	1,244 $\pm$ 0,062
800	0,987 $\pm$ 0,073
1600	0,706 $\pm$ 0,045
3200	0,145 $\pm$ 0,033
Konsantrasyon (μM)	72 Saat Tamoxifen Mean $\pm$ SEM
Kontrol	1,671 $\pm$ 0,054
2.83	1,168 $\pm$ 0,054
5.65	1,603 $\pm$ 0,108
11.30	0,336 $\pm$ 0,055
22.60	0,0067 $\pm$ 0,0040

Yeni dozlar ile 72 saatte yapılan MTT deneyi sonucunda, fucoidan doz arttıkça hücre canlılığını belirgin şekilde azaltmış ve bu etki her bir doz artışında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Özellikle 100 μ g/mL'den itibaren hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlenmiş, 1600 μ g/mL ve 3200 μ g/mL gibi yüksek konsantrasyonlarda bu azalma neredeyse tamamen baskılayıcı bir düzeye ulaşmıştır ($p < 0.0001$).

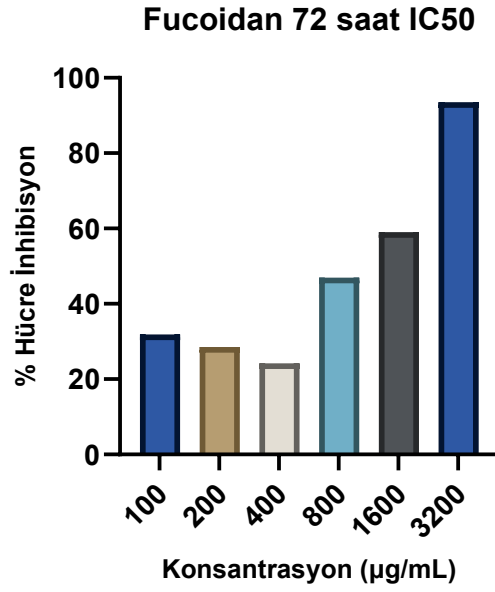
Bu bulgular, fucoidanın yüksek dozlarda güçlü bir antikanser potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde pozitif kontrol grubu olan tamoxifenin, MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi doza bağımlı olup, 11.30 μ g/mL'den itibaren etkili bir hücre canlılığı baskılanması gözlemlenmiştir. Özellikle 22.60 μ g/mL dozunda, hücre canlılığı neredeyse tamamen ortadan kalkmıştır, bu da tamoxifenin yüksek dozlarda çok güçlü bir sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar fucoidanın MCF-7 hücre hattı üzerinde doza bağımlı güçlü sitotoksik etkileri ile potansiyel antikanser bir ajan olarak değerlendirilebileceğini gösterirken tamoxifenin bilinen klinik başarısını bir kez daha doğrulamaktadır.

Yapılan tez çalışmasında, fucoidanın MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla tamoxifen pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Tamoxifen, bilinen bir antikanser ajanı olarak hücre canlılığı üzerindeki etkileri iyi tanımlanmış bir bileşiktir. Bu nedenle, fucoidanın sitotoksik etkilerini doğru bir şekilde değerlendirebilmek ve karşılaştırabilmek için güvenilir bir referans noktası sağlamıştır. Deney sonuçları, fucoidanın özellikle yüksek dozlarda tamoxifene benzer, hatta bazı dozlarda onun kadar güçlü bir sitotoksik etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

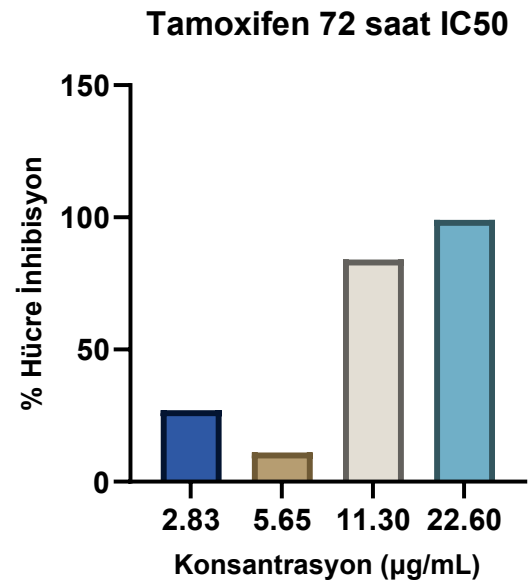
Tamoxifenin farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücre hattı üzerinde gözlemlenen etkileri, fucoidanın etkinliğini kıyaslamak için bir temel oluşturmuştur. Tamoxifenin, özellikle yüksek dozlarda gösterdiği güçlü sitotoksik etki, fucoidanın aynı hücre hattı üzerindeki etkilerini daha anlamlı bir şekilde analiz etmeye olanak tanımıştır. Bu sayede, fucoidanın potansiyel antikanser özellikleri tamoxifen ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve fucoidanın doza bağımlı sitotoksik etkileri ortaya konulmuştur. Tamoxifenin pozitif kontrol olarak kullanılması, fucoidanın MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin daha güvenilir ve karşılaştırılabilir sonuçlar vermesine yardımcı olmuş ve çalışmanın bilimsel geçerliliğini artırmıştır.

4.1.2 IC50 değerinin belirlenmesi

MCF-7 hücre hattında analizi yapılan Fucoidan ve Tamoxifenin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi analizinden elde edilen absorban değerleri kullanılarak hücre inhibisyon yüzdeleri belirlendi ve hedef hücre popülasyonunda hücrelerin %50sinin proliferasyonunu inhibe eden konsantrasyon (IC50) değeri hesaplandı. Fucoidan ve Tamoxifen için uygun IC50 değeri GraphPad Prism 10.2.2. programı kullanılarak sırasıyla 1.174 µg/mL ve 9.76 µg/mL şeklinde belirlenmiştir.



IC50= 1,174 µg/mL



IC50= 9,76 µg/mL

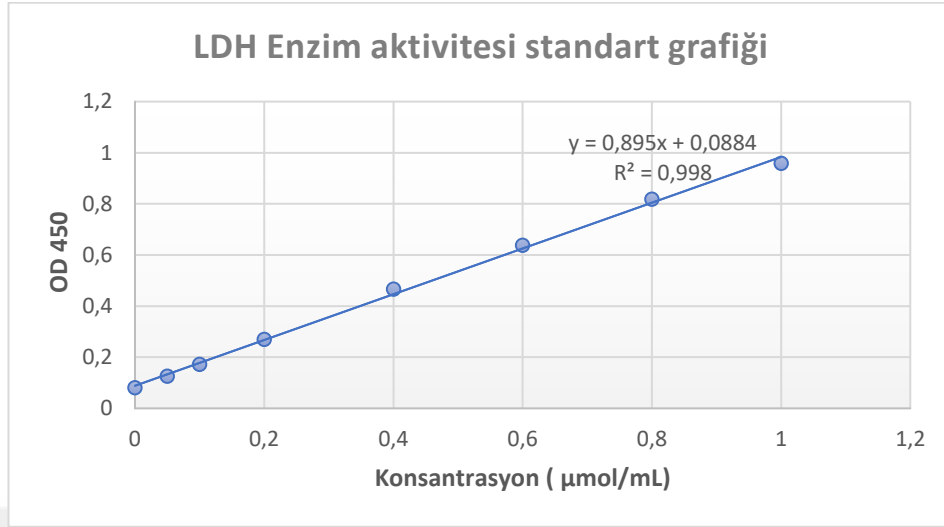
Şekil 4.5 GraphPad Prism 10.0.1 programı ile fucoidan ve tamoxifenin IC50 değerlerinin hesaplanması

Hücre inhibisyonu, İnhibisyon (%) = (A kontrol – A örnek) / A kontrol x100 formülü ile hesaplanmıştır.

4.2 Sitotoksosite Analizi Sonuçları

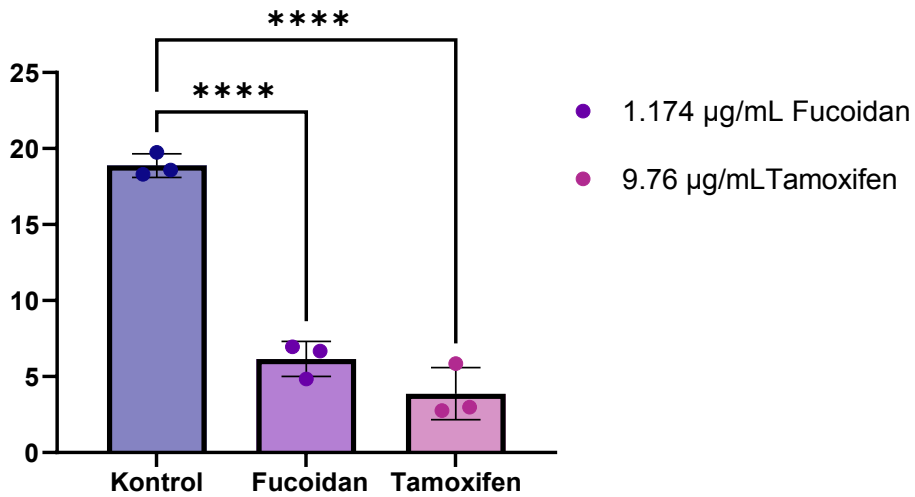
Fucoidan ve pozitif kontrol grubu olarak kullanılan tamoxifenin, MCF-7 hücrelerinde hücre membranı bütünlüğünü ne ölçüde etkilediğini belirlemek için uygun bir yöntem olarak tercih edilen LDH enzim aktivite deney sonuçları analiz edilmiştir.

Çizelge 4.3 LDH Enzim aktivite deneyi standart grafiği



LDH Enzim aktivite test kiti kullanılarak gerçekleştirilen deney sonrası kolorimetrik ölçüm sonucu elde edilen standart değerleri kullanılarak Excel uygulamasında standart grafiği çizilmiştir. Grafik sonuç değerleri LDH enzim aktivitesi hesaplanırken kullanılmıştır.

LDH Enzim Aktivitesi (U/L)



Şekil 4.6 MCF-7 hücre hattında LDH enzim aktivite deney sonucu (Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, $p < 0.0001$: ****).

Çizelge 4.4 Fucoïdan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında LDH enzim aktivitesi üzerindeki etkileri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 3)

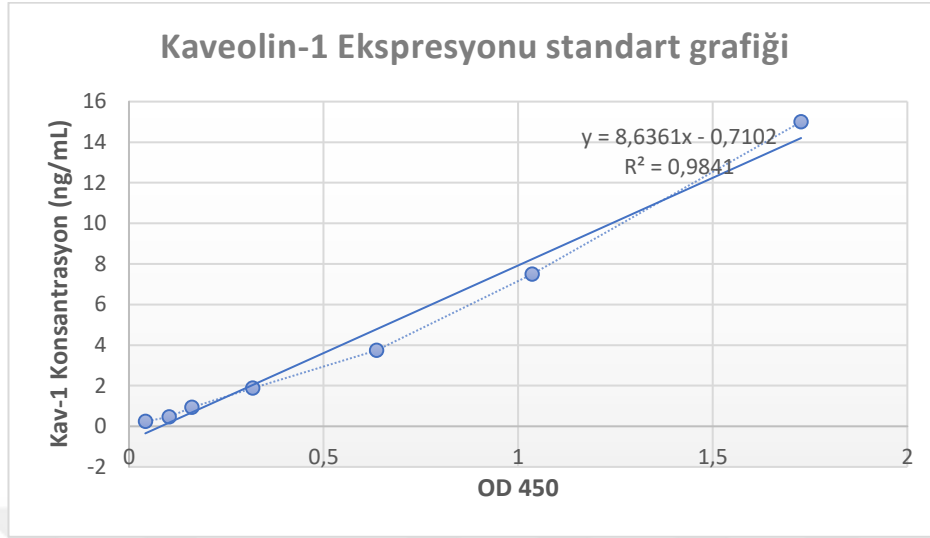
Grup	Mean $\pm$ SEM
Kontrol	18.88 $\pm$ 0.45
Fucoïdan	6.16 $\pm$ 0.67
Tamoxifen	3.87 $\pm$ 0.99

LDH enzim aktivitesi testi sonuçları, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan ANOVA analizi sonucunda, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$). Hem fucoïdan hem de tamoxifenin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. Fucoïdan ve tamoxifen uygulamalarının etkileri, yapılan istatistiksel testlerle doğrulanmış olup, her iki tedavinin de hücre membran bütünlüğünü bozarak hücre ölümüne neden olduğu görülmüştür. Analizler, bu iki maddenin kanser hücreleri üzerinde etkili olduğunu ve kontrollü ortamlarda değerlendirilmesinin, potansiyel antikanser ajanlar olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur.

4.3 Fucoïdanın Kaveolin-1 Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

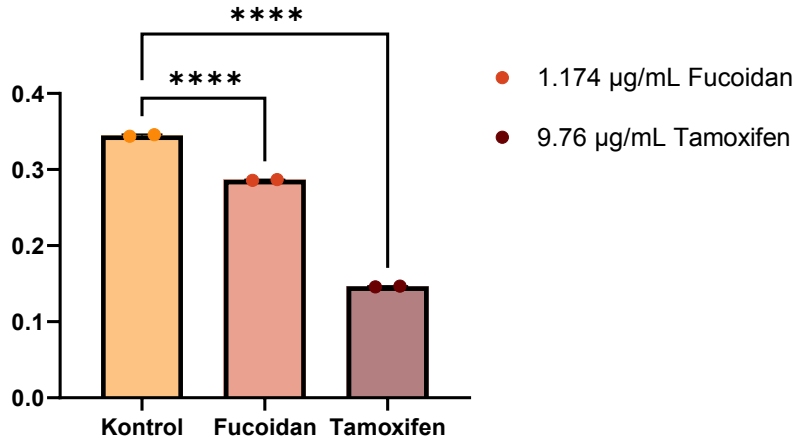
Bu tez çalışmasında, doğal bir biyomolekül olan fucoïdan ve pozitif kontrol olarak kullanılan tamoxifenin, MCF-7 meme kanseri hücre hattında, özellikle kanser hücrelerinde proliferasyon, apoptoz ve metastaz gibi süreçleri etkileyen sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan kaveolin-1 proteininin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada, MTT testi ile belirlenen IC50 değerlerine dayalı olarak 1.174 $\mu\text{g/mL}$ fucoïdan ve 9.76 $\mu\text{g/mL}$ tamoxifen uygulanan hücrelerde, insan kaveolin-1'e özgü bir antikörle önceden kaplanmış mikropalakaların kullanıldığı sandviç enzim immünoassay prensibine dayalı bir kit aracılığıyla analiz edilmiştir.

Çizelge 4.5 Kaveolin-1 Ekspresyon ELISA deneyi standart grafiği



Kaveolin-1 Ekspresyon ELISA test kiti ile gerçekleştirilen deneyde elde edilen standart değerler kullanılarak Excel programında bir standart eğrisi oluşturulmuş ve bu eğri, Kaveolin-1 ekspresyon seviyelerinin hesaplanmasında temel alınmıştır.

Kaveolin-1 Ekspresyon Düzeyleri (ng/mL)



Şekil 4.7 MCF-7 hücre hattında Kaveolin-1 ekspresyon düzeyleri belirleme deney sonucu (Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, $p < 0.0001$: ****).

Çizelge 4.6 Fucoidan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında Kaveolin-1 proteinini ekspresyon düzeylerine olan etkileri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 2)

Grup	Mean $\pm$ SEM
Kontrol	0.345 $\pm$ 0.001
Fucoidan	0.2865 $\pm$ 0.0005
Tamoxifen	0.1465 $\pm$ 0.0005

Çalışmamızda, Kaveolin-1 protein ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla Graphpad Prism programı kullanılarak çeşitli analizler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, fucoidan ve tamoxifen uygulamalarının kaveolin-1 ekspresyonu üzerindeki etkilerini belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi uygulanmıştır. Bu analiz, tedavi grupları arasında anlamlı farklar olduğunu göstermiştir. Hem fucoidan hem de tamoxifen uygulamaları, kontrol grubuna kıyasla kaveolin-1 ekspresyon düzeylerinde belirgin azalmalara yol açmıştır. Brown-Forsythe testi, grup içindeki varyansların eşitliğini test ederek, tedavi grupları arasındaki varyansların anlamlı bir farklılık göstermediğini belirlemiştir. Bu, gruplar arasındaki varyansların benzer olduğunu ve ANOVA sonuçlarının güvenilir olduğunu desteklemektedir.

Son olarak, Dunnett's Multiple Comparisons çoklu karşılaştırma testi ile tedavi gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırılması yapılmıştır. Analiz sonuçları, fucoidan uygulamasının kontrol grubuna kıyasla kaveolin-1 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma sağladığını göstermektedir. Ortalama farkın ve düşük p değerinin yanı sıra, 95% güven aralığının sıfırdan uzak olması, fucoidanın kaveolin-1 üzerindeki etkisinin yüksek derecede istatistiksel olarak anlamlı olduğunu desteklemektedir ($p < 0.0001$: ****).

Benzer şekilde tamoxifen uygulamasının da kontrol grubuna kıyasla kaveolin-1 ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağladığı gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$: ****). Elde edilen bu bulgular, bu tedavilerin kaveolin-1 aracılığıyla hücresel süreçlerdeki potansiyel etkilerini anlamada önemli bilgiler sunmaktadır.

Yapılan tez çalışmamızda, fucoidanın MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki etkileri, özellikle kaveolin-1 proteininin ekspresyonu üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Kaveolin-1, hücre membranlarında mikrodoman oluşumunda ve hücresel

sinyal iletiminde kritik rol oynayan bir protein olup, kanser hücrelerinin büyüme ve metastazını etkileyen önemli bir biyomarkerdir. Bu bağlamda, kaveolin-1 ekspresyonunun değerlendirilmesi, fucoidan uygulamasının hücresel işlevler üzerindeki etkilerini anlamada temel bir adımdır.

Deney sonucumuzda tek yönlü varyans analizi (ANOVA), fucoidan ve tamoxifen uygulamalarının kaveolin-1 düzeylerinde belirgin bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur. Bu azalma, fucoidanın hücresel düzeyde önemli değişikliklere neden olabileceğini ve bu değişikliklerin biyolojik süreçler üzerindeki etkilerini yansıttığını göstermektedir. Fucoidan ve tamoxifen uygulamaları sonrası kaveolin-1'in bu şekilde ifade edilmesi, hücrelerin canlılığı, migrasyonu ve apoptotik yanıtları gibi çeşitli hücresel süreçlerle doğrudan ilişkili olabileceğini düşündürmektedir ve bu da tümör progresyonu ile ilişkili önemli bir parametredir.

Fucoidanın LDH enzim aktivitesi üzerindeki etkileri, hücresel hasar ve toksisite ile ilişkilidir; kaveolin-1 ekspresyonundaki değişikliklerin bu süreçlerle bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Kaveolin-1'in bu tür değişikliklere yanıt olarak nasıl rol oynadığını ve bunun hücresel davranışlarla nasıl etkileşime girdiğini vurgulamak, fucoidanın kanser tedavisindeki potansiyelini ve mekanizmalarını anlamak açısından kritik öneme sahiptir. Kaveolin-1'in azaltılması, hücrelerin proliferasyonunu ve metastaz potansiyelini etkileyebilir. Kaveolin-1'in düşük ekspresyonu, hücrelerin migrasyon kabiliyetini azaltabilir, çünkü bu proteinin hücre göçü ve invazyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca, kaveolin-1'in azalması, hücresel hayatta kalma ve apoptoz düzenlemesini etkileyebilir; bu durum, fucoidan ve tamoxifenin tedavi edici potansiyelini açıklayabilir.

Diğer deney sonuçlarıyla bağlantılı olarak, MTT testi ile belirlenen IC50 değerleri, fucoidan ve tamoxifenin hücre canlılığını azalttığını gösterirken, bu tedavilerin kaveolin-1 ekspresyonundaki azalma ile ilişkilendirilmesi, hücresel toksisite ve hasar üzerindeki etkilerini vurgulamaktadır. Bu sonuçlar, fucoidan uygulamasının kaveolin-1 aracılığıyla hücresel süreçlerdeki potansiyel etkilerini daha iyi anlamak için önemli bir temel

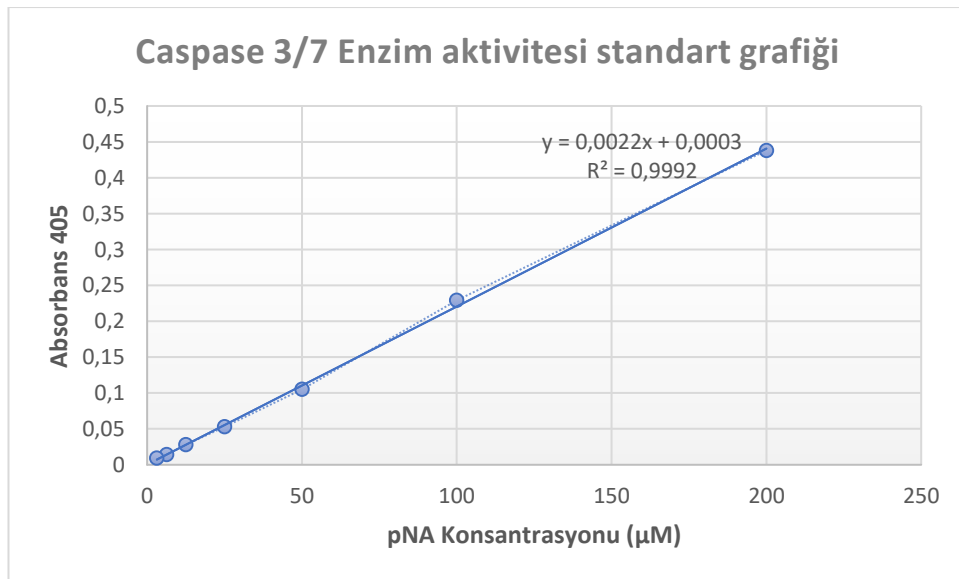
oluşturmaktadır. Kaveolin-1 düzeylerindeki değişimlerin bu süreçlerle olan ilişkisi, tedavi stratejilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır.

Sonuç olarak, doğal bir biyomolekül olan fucoidan ve kemoterapötik bir ajan olan tamoxifenin MCF-7 hücrelerinde kaveolin-1 ekspresyon düzeylerini azaltması, bu tedavilerin hücresel süreçlerdeki potansiyel etkilerini anlamak için ön veri oluşturan önemli bir bulgudur. Kaveolin-1'in bu değişikliklere yanıt olarak nasıl rol oynadığını ve bunun hücresel davranışlarla nasıl etkileşime girdiğini detaylı bir şekilde ele almak, tedavi stratejilerinin optimizasyonu ve tümör biyolojisinin anlaşılması açısından oldukça önemlidir.

4.4 Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

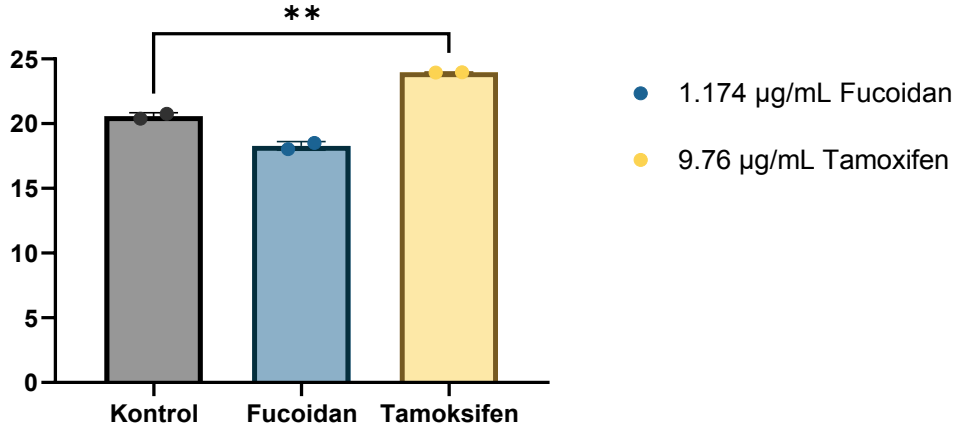
Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde deney, caspase 3/7 aktivite kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Caspase 3/7 aktivitesi, hücrelerde apoptotik sürecin başladığını ve hücre ölümünün gerçekleştiğini gösteren önemli bir biyokimyasal belirteçtir. Bu deneyde, fucoidan ve tamoxifenin IC50 değerlerine göre uygun doz tedavisi yapılmış ve MCF-7 hücrelerinde apoptotik yanıtları ne ölçüde tetiklediği analiz edilmiştir.

Çizelge 4.7 Caspase 3/7 Enzim aktivite deneyi standart grafiği



Caspase 3/7 enzim aktivite test kiti ile yapılan deneyin ardından, kolorimetrik ölçümden elde edilen standart veriler Excel'de bir standart eğri oluşturmak için kullanılmış ve bu eğri, Caspase 3/7 enzim aktivitesinin hesaplanmasında referans alınmıştır.

Caspase 3/7 Enzim Aktivitesi (μM)



Şekil 4.8 MCF-7 hücre hattında Caspase 3/7 enzim aktivite deney sonucu (Veriler, ortalama ± SEM olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, $p < 0.01$: **).

Çizelge 4.8 Fucoidan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında Caspase 3/7 enzim aktivitesi üzerindeki etkileri (Mean ± S.E.M., $n = 2$)

Grup	Mean ± SEM
Kontrol	20.5775 ± 0.1924
Fucoidan	18.28 ± 0.2399
Tamoxifen	23.9625 ± 0.0125

Apoptotik etkinin belirlenmesinde Caspase 3/7 aktivite kiti kullanılarak gerçekleştirilen analizde, elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Test sonuçları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fucoidan uygulamasının apoptotik aktivite üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını göstermiştir. Ancak, tamoxifen grubunun kontrol grubuna kıyasla daha yüksek apoptotik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, tamoxifenin MCF-7 hücrelerinde anlamlı bir apoptotik etki yarattığını, fucoidanın ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir etkisi olmadığını ortaya koymaktadır.

Fucoidanın MCF-7 hücre hattında apoptotik etkileri olduğu bilinmesine rağmen, Caspase 3/7 aktivite kitinin sonuçlarında belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu durumun birkaç olası nedeni bulunmaktadır. İlk olarak, fucoidanın apoptotik etkileri, Caspase 3 ve Caspase 7 dışındaki apoptotik sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşiyor olabilir. Fucoidanın, hücrelerde farklı mekanizmaları aktive edebilmesi ve bu mekanizmaların Caspase 3/7 ile ilişkili olmaması sebeplerden bir diğeri olabilmektedir. Ayrıca, Caspase 3/7 'nin yeterince aktive edilmemiş olması, bu enzimlerin aktivite kitinde tespit edilememesine yol açabilir. Hücre tipi özellikleri de önemli bir faktördür; MCF-7 hücre hattı, fucoidanın apoptotik etkilerine karşı farklı bir duyarlılığa sahip olabilir. Ayrıca, kullanılan yöntemsel yaklaşımların sınırlamaları da göz önünde bulundurulmalıdır; Caspase 3/7 aktivite kitinin, tüm apoptotik süreçleri tespit etme hassasiyeti sınırlı olabilmektedir. Bu nedenlerle, fucoidanın apoptotik etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi için farklı analiz yöntemlerinin ve hücre modellerinin kullanılmasını içeren ek çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir.

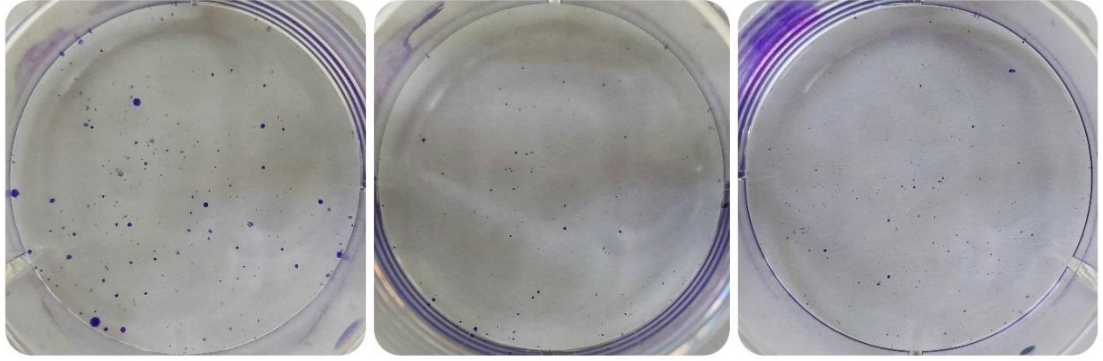
4.5 Fucoidanın MCF-7 Hücre Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi

Koloni oluşum deneyi, hücrelerin uzun süreli proliferasyon yeteneğini ve hayatta kalma kapasitesini ölçen kritik bir in vitro analiz yöntemidir. Bu çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin fucoidan ve tamoxifen uygulamalarına maruz kaldıktan sonra koloni oluşturma yeteneğini değerlendirerek, tedavinin sitotoksik ve antiproliferatif etkileri incelenmiştir. Deneyde, fucoidan ve tamoxifen, MCF-7 hücrelerine IC50 değerlerine göre uygulanmış ve canlı hücreler kristal viyole ile boyanarak mor renkte koloni oluşumları gözlemlenmiştir. Bu sayede, her iki ajanın hücre canlılığına ve uzun vadeli proliferasyon potansiyeline etkileri Image J yazılı kullanılarak detaylı bir şekilde analiz edilmiştir.

Kontrol

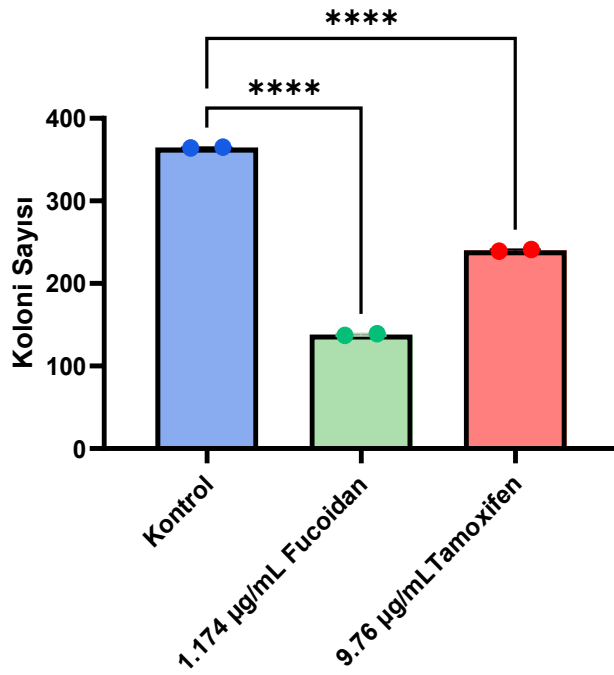
Fucoidan (1.174 µg/mL)

Tamoxifen (9.76 µg/mL)



Şekil 4.9 Kristal viyole ile boyanmış koloni görüntüleri

Koloni Oluşum Testi

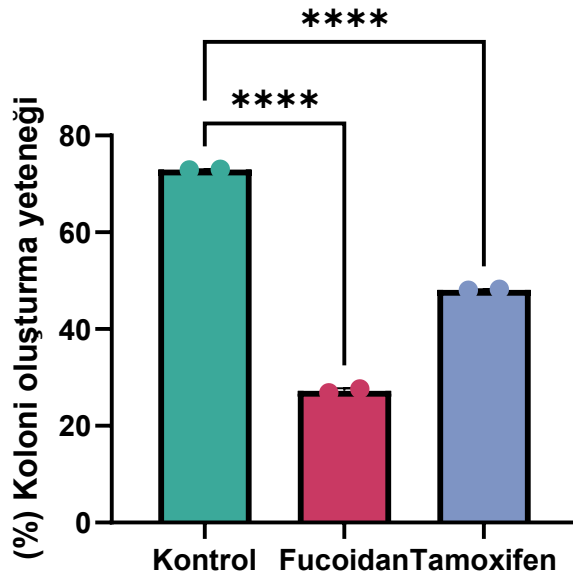


Şekil 4.10 Fucoidan ve tamoxifenin MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi (Veriler, ortalama ± SEM olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, $p < 0.0001$: ****).

Çizelge 4.9 Fucoidan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında koloni oluşumu üzerindeki etkileri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 2)

Grup	Mean $\pm$ SEM
Kontrol	364.5 $\pm$ 0.5
Fucoidan	138.0 $\pm$ 1.0
Tamoxifen	240.0 $\pm$ 1.0

Fucoidan uygulaması yapılan grupta, kontrol grubuna kıyasla koloni sayısında yaklaşık %61,92 oranında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, tamoxifen uygulaması da kontrol grubuna göre koloni sayısını koloni sayısını yaklaşık %33,97 oranında önemli ölçüde azaltmıştır. P değerinin <0.0001 olması, bu farkların oldukça anlamlı olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, fucoidan ve tamoxifenin MCF-7 hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe edici etkileri olduğunu ve bu etkinin oldukça güçlü olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.11 Fucoidan ve tamoxifenin MCF-7 hücrelerinde koloni oluşturma yeteneği (Veriler, ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiş ve istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir, p < 0.0001: ****).

Çizelge 4.10 Fucoidan ve Tamoxifen'in MCF-7 hücre hattında koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkileri (Mean $\pm$ S.E.M., n = 2)

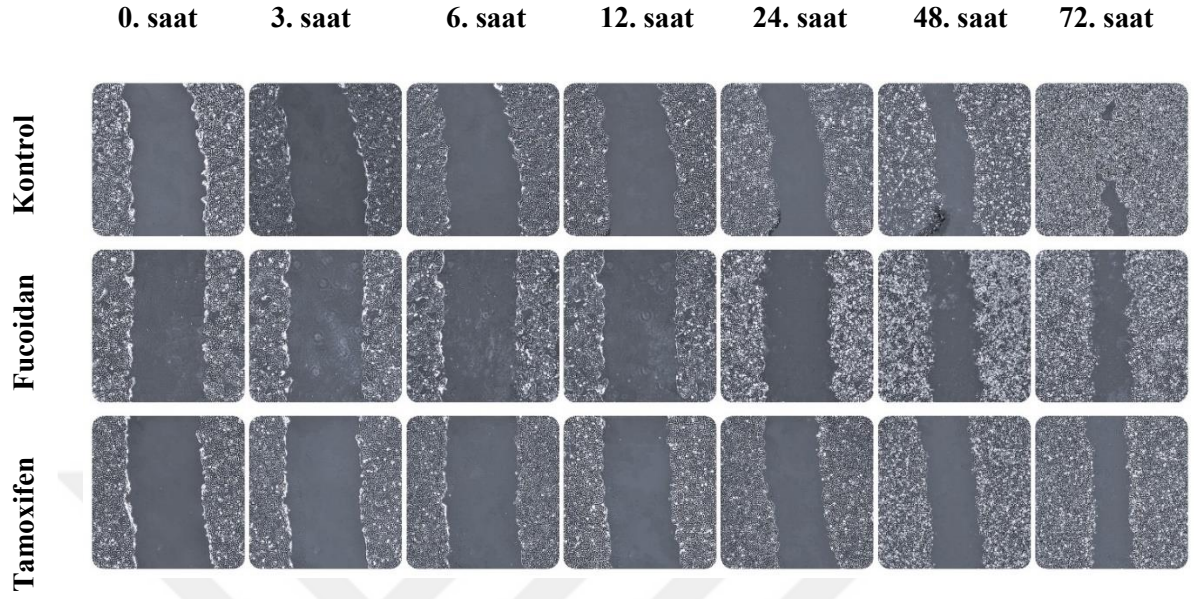
Grup	Mean $\pm$ SEM
Kontrol	72.95 $\pm$ 0.05
Fucoidan	27.2 $\pm$ 0.4
Tamoxifen	48.1 $\pm$ 0.1

Plating Efficiency (PE) olarak da bilinen koloni oluşturma yeteneği grafiğine göre ise; kontrol grubunda hücrelerin %73'ü hayatta kalırken, tamoxifen, meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaç olup, %48.2'lik survival oranı ile hücreler üzerinde belirgin bir sitotoksik etki göstermiştir. Buna karşılık, fucoidan uygulaması yapılan grup en düşük survival oranına (%27.8) sahip olup, hücreler üzerinde en güçlü sitotoksik etkiye neden olmuştur. Bu veriler, özellikle Fucoidan'ın Tamoxifen'e kıyasla daha güçlü bir hücre öldürücü etki gösterdiğini ortaya koymakta ve bu iki ajanın sitotoksik potansiyellerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmektedir. Bu sonuçlar, fucoidanın potansiyel bir antikanser ajanı olarak değerlendirilmesi açısından önemli veriler sunmaktadır.

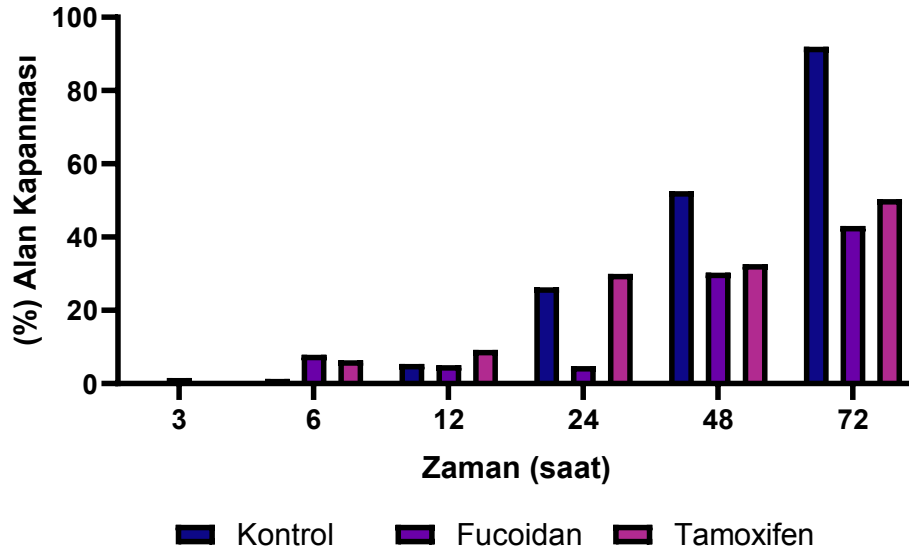
Koloni oluşturma yeteneği = (Kontrol grubundaki koloni sayısı / Başlangıçta ekilen hücre sayısı) x 100 formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

4.6 Fucoidanın MCF-7 Hücre Göçü Üzerine Etkisi

Hücre migrasyonu olarak da bilinen hücre göçü deneyi, hücrelerin hareket kabiliyetini ve tedaviye yanıtlarını değerlendirmek amacıyla yapılan kritik bir testtir. Bu deneyde, MCF-7 meme kanseri hücrelerine IC50 değerlerine göre belirlenen konsantrasyonlarda fucoidan ve tamoxifen uygulanarak hücre migrasyon kapasitesi mikroskop altında incelenmiştir. Hücrelerin 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 saatler boyunca nasıl göç ettiği gözlemlenmiştir ve bu süreçte hücrelerin hareket alanları, tedavinin hücresel motiliteye olan etkisini ortaya koymak için Image J yazılımı kullanılarak ölçülmüştür.



Şekil 4.12 MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 1.174 µg/mL fucoidan ve 9.76 µg/mL tamoxifen uygulamalarının hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin mikroskop altında görüntülenmesi



Şekil 4.13 MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı olarak kontrol, fucoidan ve tamoxifenin hücre migrasyonuna etkisi

Fucoidan ve tamoxifen gruplarındaki hücre göçü sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, kontrol grubunda hücre göçü sürecinde alan kapanma yüzdeleri zamanla artarak 72 saat sonunda %91.95'e ulaşmıştır. Fucoidan uygulanan grupta ise kapanma yüzdeleri daha düşük seviyelerde kalmış ve 72 saat sonunda %43.9'a ulaşmıştır. Tamoxifen grubunda ise 72 saat sonunda %50.36 kapanma yüzdesi hesaplanmıştır. Özellikle 24 ve 48 saatlerde fucoidan grubundaki kapanma yüzdeleri sırasıyla %4.8 ve %30.24 olarak hesaplanmıştır, bu değerler kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde düşüktür. Tamoxifen grubunda ise bu oranlar %29.92 ve %32.63 olarak hesaplanmıştır.

Bu bulgular, hem tamoxifen hem de fucoidanın hücre göçünü yavaşlatarak hücre hareketliliği inhibe ettiğini göstermektedir. Tedavi gruplarında hücre göç oranlarının belirgin şekilde düşük olması, her iki maddenin de hücre göçü üzerindeki olumsuz etkilerini vurgulamaktadır. Alan kapanma yüzdesi = $(\text{Başlangıç alanı} - \text{Belirli zamandaki alan}) / \text{Başlangıç alanı} \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve tüm kanserler arasında ikinci önde gelen ölüm nedenidir (Siegel vd. 2019). Son yıllarda meme kanseri tedavisinde yapılan araştırmalarda, hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkileyen geleneksel sitotoksik tedavi yöntemlerinden ziyade, doğal bileşiklerden elde edilen fucoidanın kanser hücreleri üzerinde farmasötik ve terapötik yaklaşımlar açısından potansiyel bir etkiye sahip olabileceği ifade edilmiştir (Lin vd. 2020; Minhas vd. 2024; Yu vd. 2024). Fucoidan, sülfatlanmış polisakkarit yapısıyla bilinen ve antikoagülan, antiviral, antiinflamatuvar ve antikanser gibi birçok önemli biyolojik aktiviteye sahip doğal bir bileşiktir (Luthuli vd. 2019; Pradhan vd. 2020; Zaitseva vd. 2022; Sanniyasi vd. 2023). Ayrıca, mevcut çalışmalarda fucoidanın sağlıklı hücrelere zarar vermeden yalnızca kanser hücrelerini hedefleyerek etkili olduğu bildirilmiştir (Yan vd. 2015; Turrini vd. 2023; Yunianta vd. 2024). Fucoidanın kanser üzerindeki etkileri, hücresel sinyal yollarını modüle etmesi ve bağışıklık sistemini güçlendirmesi ile ilişkilidir. Oksidatif stresi artırarak ve antioksidan savunma mekanizmalarını bozarak hücre ölümünü teşvik etmektedir (Shiau vd. 2022). Ayrıca, tümör mikroçevresindeki inflamasyonu azaltarak ve immün yanıtı artırarak tümör büyümesini engelleyebilmektedir (Phull ve Kim, 2017).

Literatür çalışmaları dikkate alındığında fucoidanın özellikle meme kanserinde hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmaya göre, sitotoksikite testi MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde inhibitör etkinin A549 akciğer kanseri hücre hattına kıyasla çok daha etkili olduğunu göstermektedir (Santhanam vd. 2022). Bu durum, fucoidanın MCF-7 meme kanseri hücre hattını öldürme potansiyeline sahip olduğunu, A549 hücre hattına göre daha güçlü bir etki sergilediğini işaret etmektedir. Benzer şekilde çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, mevcut literatürdeki bulgularla paralellik göstererek fucoidanın hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin doza bağımlı bir şekilde arttığını ve bu etkinin özellikle yüksek dozlarda belirginleştiğini göstermektedir. Fucoidan, 100 µg/mL konsantrasyonundan itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir hücre canlılığı azalmasına neden olmuş ve 1600 µg/mL ile 3200 µg/mL gibi yüksek konsantrasyonlarda neredeyse tamamen baskılayıcı bir etki göstermiştir. Benzer şekilde, pozitif kontrol grubu olarak kullanılan tamoxifen de 11.30

$\mu\text{g/mL}$ 'den itibaren anlamlı bir sitotoksik etki yaratmış ve $22.60 \mu\text{g/mL}$ dozunda hücre canlılığı neredeyse tamamen ortadan kalkmıştır.

Sitotoksik etki, yaptığımız LDH enzim aktivite testi ile de desteklenmiştir. Hücre canlılığı ve sitotoksiteyi değerlendirmek amacıyla hücre içi LDH enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu doğrultuda, çalışmamızda elde edilen düşük LDH aktivitesi, fucoidan ve tamoxifen uygulamaları sonrasında kanser hücrelerinin membran bütünlüğünün bozularak LDH enziminin kültür ortamına geçtiğini ve hücre içinde aktif LDH enziminin azaldığını göstermektedir. Deney sonuçları, fucoidan ve tamoxifenin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde güçlü bir sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Fucoidan'ın yüksek dozlarda sitotoksik bir etki göstermesi, doğal bileşiklerin kanser tedavisinde potansiyel bir alternatif olarak değerlendirilebileceğini desteklerken, tamoxifen'in etkileri ise bu ajanın bilinen klinik başarısını bir kez daha doğrulamaktadır. Literatürdeki çalışmalar, hücre ölümü ve membran bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte kültür ortamına salınan LDH enzim aktivitelerinin değerlendirildiğini ve benzer sonuçlar elde edildiğini göstermektedir (Palanisamy vd. 2018; Wang vd. 2018; Deepika vd. 2019).

Yapılan çalışmalarda meme kanseri hastalarında prognozu belirlemek için hem epitelyal hem de stromal kaveolin-1 ekspresyonu tespit edilmiştir (Witkiewicz vd. 2010). Birçok çalışma, tümör progresyonu sürecinde kaveolin-1'in önemini ortaya koymuş ve farklı tümör tiplerinde farklı ekspresyon seviyeleri ile tespit edilmiştir (Williams vd. 2005; Diaz-Valdivia vd. 2022; Godina vd. 2024). Birçok raporda, kaveolin-1'in aşırı ekspresyonunun tümör derecesi, büyüklüğü ve evresi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Raja vd. 2019; Teruel vd. 2024; Wang vd. 2024). Bununla birlikte, kaveolin-1'in aynı zamanda bir tümör baskılayıcı olarak da işlev gördüğü çalışmalar bulunmaktadır (Sunaga vd. 2004; Diaz vd. 2020; Gokani vd. 2022; Pang vd. 2022; Chai vd. 2024). Kaveolin-1'in bu ikili rolünün tümör tiplerindeki ekspresyon düzeylerine bağlı olduğu ifade edilmiştir. Fucoidan'ın hücre sinyalleme ve tümör progresyonunda kritik bir rol oynayan kaveolin-1 proteini üzerindeki etkileri hala tam olarak aydınlatılmamıştır. Literatür incelemesinde, fucoidan ve kaveolin-1 ile ilgili ayrı ayrı çalışmalar mevcuttur ancak fucoidanın kaveolin-1 ekspresyon seviyelerini doğrudan düzenlediğine dair herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma, yapılan ilk araştırmalardan biri olarak literatüre

katkı sağlama potansiyeline sahiptir. Fucoidanın etkilerine benzer şekilde kaveolin-1, hücre transformasyonu, tümör büyümesi, apoptoz, hücre sağkalımı, çoklu ilaç direnci, anjiyogenez, hücre göçü, gibi kanser ile ilişkili pek çok süreci düzenlemektedir ve özellikle meme kanserinde, ekspresyon düzeylerine bağlı olarak hem tümör baskılayıcı hem de teşvik edici rolleri olduğu ifade edilmiştir (Gupta vd. 2014; Pang vd. 2022; Singh vd. 2024).

Çalışmamızda kaveolin-1 protein ekspresyon düzeyleri GraphPad Prism programı kullanılarak detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA), fucoidan ve tamoxifenin MCF-7 hücrelerinde kaveolin-1 ekspresyon seviyelerini grubuna kıyasla anlamlı derecede azalttığını göstermektedir ($p < 0.0001$). Brown-Forsythe testi ise grup içindeki varyansların eşitliğini doğrulayarak ANOVA sonuçlarının güvenilirliğini desteklemiştir. Bu bulgular, kaveolin-1'in tümör baskılayıcı rolünün, ekspresyon seviyelerindeki azalma yoluyla gerçekleştiğini ve bu mekanizmanın antikanser etkilerin artırılmasında nasıl bir rol oynayabileceğini vurgulamaktadır. Ayrıca, çalışmamızda, kemoterapötik bir ajan olan tamoxifenin de kaveolin-1 ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. Bu durum, tamoxifenin etkilerinin yalnızca östrojen reseptör blokajı ile sınırlı olmadığını, aynı zamanda hücre sinyalleme yollarında belirgin değişikliklere yol açtığını ortaya koymaktadır. Bu bilgilere ek olarak, fucoidanın etkileri, pozitif kontrol olarak kullanılan tamoxifenin etkileri ile karşılaştırıldığında oldukça güçlü bulunmuştur. Tamoxifen, östrojen reseptör blokajı yoluyla kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ederken, fucoidanın kaveolin-1 üzerindeki etkileri ve kanser hücrelerinde canlılığı azaltma kapasitesi, bu doğal bileşiğin kemoterapötik ajanlarla kıyaslanabilir bir etki potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Fucoidanın kaveolin-1 ekspresyonunu azaltmasının yanı sıra, apoptotik etkileri, hücre migrasyonu ve koloni oluşturma yeteneği üzerindeki sonuçları da dikkate alındığında, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, fucoidan, apoptozu indükleyen morfolojik değişikliklere ve hücre aracılı ölüme neden olmaktadır (Fernando vd. 2020). MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmaya göre, fucoidanın kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerini artırdığı, Poli-ADP riboz polimeraz (PARP) parçalanmasını indüklediği, pro-apoptotik genlerin aktivasyonu ve anti-apoptotik genlerin inhibisyonu

ile hücre proliferasyonunu baskılayarak apoptoza yol açtığı ifade edilmiştir. (Kong vd. 2009). Ayrıca, Fucoidanın SMMC-7721 insan hepatosellüler karsinom hücrelerinde, ROS üretiminin artışı, nükleer fragmentasyon, mitokondriyal vakuolizasyon, mitokondriyal membran potansiyel depolarizasyonu, mitokondriyal sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonunun eşlik ettiği ROS aracılı mitokondriyal yollar üzerinden apoptoza indüklediği bildirilmiştir (Yang vd. 2013). Başka bir çalışmada ise fucoidanın, U937 insan lösemi hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivasyonuna bağımlı yollarla apoptoza indüklediği, ek olarak kaspaz 3/7 'nin aktivasyonuna ve PARP'ın zamana ve doza bağımlı bir şekilde parçalanmasına neden olduğu bildirilmektedir (Teruya vd. 2007).

Ancak literatürde yer alan önceki çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda elde edilen Caspase 3/7 aktivite sonuçlarına göre, fucoidanın apoptotik aktivite üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Tamoxifen grubunda ise kontrol grubuna kıyasla apoptotik aktivite gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, fucoidanın apoptotik etkilerinin caspase 3/7 dışındaki sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşebileceğini veya bu enzimlerin yeterince aktive edilmemiş olabileceğini düşündürmektedir. MCF-7 hücre hattının fucoidanın apoptotik etkilerine karşı farklı bir duyarlılığa sahip olabileceği ve kullanılan yöntemlerin sınırlamaları da göz önünde bulundurulmalıdır. Fucoidan'ın apoptoza kaspazlardan bağımsız olarak indükleyebileceği çeşitli mekanizmalar da literatürde tanımlanmıştır (Cruz Riquelme vd. 2024). Bunlardan biri, mitokondriyal zar geçirgenliğinin artmasıyla birlikte apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve Endonükleaz G'nin sitoplazmaya salınarak DNA parçalanmasını ve kromatin yoğunlaşmasını tetikleyen bir mekanizmadır (Parreño vd. 2008). Fucoidanın meme kanseri hücrelerinde bu mekanizmayı kullanarak AIF ve Endonükleaz G seviyelerini önemli ölçüde artırdığı ve bu sayede kaspazdan bağımsız olarak apoptoza indüklediği bildirilmiştir (Xue vd. 2017). Fucoidanın, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak mitokondriyal disfonksiyon yoluyla da kaspazdan bağımsız apoptoza indüklediği ifade edilmiştir (Zhang vd. 2011). Ek olarak fucoidan, endoplazmik retikulum (ER) stresini artırarak ve hücre içi Ca^{2+} dengesizliği ile protein katlanma bozukluklarına neden olarak kaspazdan bağımsız hücre ölümünü tetikleyebilmektedir (Chen vd. 2014).

Fucoidan'ın kanser hücreleri üzerindeki etkisinin sadece apoptozla sınırlı olmayabileceğini, aynı zamanda otofaji veya hücre döngüsünü durdurma gibi alternatif yollarla da gerçekleşebileceğini gösteren çeşitli mekanizmalar literatürde yer almaktadır (Park vd. 2011; Chan vd. 2023; Cholaraj ve Venkatachalam 2024). Fucoidan'ın hücre döngüsünü etkileyen çalışmalar, bu bileşiğin hücre döngüsünü G1 fazında durdurduğunu ortaya koymuştur. P53, stres koşullarında normal hücrelerde apoptozu yönlendiren gen dizilerini düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Özellikle P21 ekspresyonu, P53 transkripsiyon faktöründen bağımsız olarak da düzenlenebildiği belirtilmiştir. Ras-Raf-MAPK yolakları, KLF6 transkripsiyon faktörü ve diğer bazı faktörler, P53'ten bağımsız bir şekilde P21'i aktive edebilmektedir. Bunun yanı sıra, P21 gen ekspresyonundaki artışın apoptozu inhibe edebileceği gözlemlenmiştir (Abbas ve Dutta, 2009). Fucoidanın E2F1 seviyelerini azaltarak ve Ser795'te retinoblastoma proteininin fosforilasyonunu etkileyerek hücre döngüsünü düzenlediği bildirilmiştir (Lin vd. 2019). Fucoidan'ın, G1 fazında hücre döngüsü duraklamasına neden olduğu ve p21 (WAF1) -siklin-CDK mekanizmasını etkilediği gösterilmiştir.

Bu bulgular, fucoidanın HT29 kolon kanser hücrelerinde Akt aktivasyonu yoluyla hücre çoğalmasını inhibe ettiğini ortaya koymaktadır (Han vd. 2015). Ayrıca, fucoidan'ın, siklin E, siklin D1, CDK2 ve CDK4 gibi hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ekspresyonunu azaltarak hücre göçünü ve çoğalmasını inhibe ettiği belirtilmiştir (Han vd. 2015).

Bu bulgular ışığında, fucoidanın apoptozu kaspazlardan bağımsız bir şekilde indükleyebileceği çeşitli mekanizmalarla ifade edilmiştir. Hem hücre döngüsü düzenleyici etkileri hem de kaspaz bağımsız apoptoz mekanizmaları, fucoidanın antikanser etkilerini açıklamada önemli rol oynamaktadır. Sonuç olarak, fucoidanın apoptotik etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi için farklı analiz yöntemlerinin ve hücre modellerinin kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Tez çalışmamız, kaveolin-1'in meme kanseri hücrelerinin hayatta kalma ve proliferasyonundaki rolünü daha iyi anlamamıza katkı sağlamaktadır. Kaveolin-1 ekspresyonunun azaltılmasının, özellikle kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz

yeteneklerini sınırlayabileceği düşünölmektedir. Bu durum, fucoidanın yalnızca tümör büyümesini engellemekle kalmayıp, aynı zamanda kanserin ileri evrelerinde de etkili olabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, fucoidanın kaveolin-1 yoluyla kanser hücrelerinin biyolojik davranışlarını modöle etme kapasitesine sahip olduğunu ve bu bileşimin yeni nesil kanser tedavilerinde önemli bir yer tutabileceğini işaret etmektedir.

Sonuç olarak, fucoidanın kaveolin-1 üzerindeki etkileri ve bu protein aracılığıyla sağlanan antikanser etkiler, meme kanseri tedavisinde yeni hedefler belirlenmesi açısından umut verici görünmektedir. Gelecek çalışmalarda, fucoidanın diğer kanser türlerindeki etkilerinin ve özellikle kaveolin-1 düzeylerindeki değişimlerin daha ayrıntılı olarak incelenmesi, bu bileşimin potansiyel terapötik rolünün daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abbas, T., Dutta, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:6, 9(6), 400–414. doi:10.1038/nrc2657
- Admoun, C., Mayrovitz, H. 2021. Choosing Mastectomy vs. Lumpectomy-With-Radiation: Experiences of Breast Cancer Survivors. *Cureus*, 13(10).
- Allison, K. H., Elizabeth, ; M., Hammond, H., Dowsett, ; Mitchell, Mckernin, S. E., Carey, L. A., ... Wolff, A. C. 2020. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol*, 38, 1346–1366.
- Andryukov, B. G., Besednova, N. N., Kuznetsova, T. A., Zaporozhets, T. S., Ermakova, S. P., Zvyagintseva, T. N., ... Smolina, T. P. 2020. Sulfated Polysaccharides from Marine Algae as a Basis of Modern Biotechnologies for Creating Wound Dressings: Current Achievements and Future Prospects. *Biomedicines*, 8(9).
- Anisha, G. S., Padmakumari, S., Patel, A. K., Pandey, A., Singhanian, R. R. 2022. Fucoidan from Marine Macroalgae: Biological Actions and Applications in Regenerative Medicine, Drug Delivery Systems and Food Industry. *Bioengineering*, 9(9).
- Apostolova, E., Lukova, P., Baldzhieva, A., Katsarov, P., Nikolova, M., Iliev, I., ... Kokova, V. 2020. Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effects of Fucoidan: A Review. *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 2338, 12(10), 2338.
- Baudrand, R., Gupta, N., Garza, A. E., Vaidya, A., Leopold, J. A., Hopkins, P. N., ... Pojoga, L. H. 2016. Caveolin 1 Modulates Aldosterone-Mediated Pathways of Glucose and Lipid Homeostasis. *Journal of the American Heart Association*, 5(10). doi: 10.1161/JAHA.116.003845
- Bradley, R., Braybrooke, J., Gray, R., Hills, R. K., Liu, Z., Pan, H., ... Swain, S. M. 2022. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in premenopausal women with oestrogen receptor-positive early-stage breast cancer treated with ovarian suppression: a patient-level meta-analysis of 7030 women from four randomised trials. *The Lancet Oncology*, 23(3), 382–392.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., Jemal, A. 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263.
- Cancer Statistics - NCI, 2024. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services, Medical and Health Content on cancer.org | American Cancer Society.
- Chai, T., Yue, W., Xu, P., Gildea, J., Felder, R. 2024. Caveolin-1, a Determinant of the Fate of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 18.
- Chan, C. H., Deng, Y. H., Peng, B. Y., Chiang, P. C., Wu, L. A., Lee, Y. Y., ... Deng, W. P. 2023. Anti-Colorectal Cancer Effects of Fucoidan Complex-Based

Functional Beverage Through Retarding Proliferation, Cell Cycle and Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling Pathways. Integrative cancer therapies, 22.

Chemotherapy for breast cancer - Mayo Clinic. 2024.

Chen, S., Zhao, Y., Zhang, Y., Zhang, D. 2014. Fucoidan Induces Cancer Cell Apoptosis by Modulating the Endoplasmic Reticulum Stress Cascades. PLoS ONE, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0108157

Chi, Y., Wang, P. 2023. Structure, preparation, and biological activity of sulfated polysaccharides from the genus *Caulerpa* (Chlorophyta): A review. Journal of Applied Phycology, 35(6), 3069–3085.

Cholaraj, R., Venkatachalam, R. 2024. Investigation of antioxidant and anticancer potential of fucoidan (in-vitro & in-silico) from brown seaweed *Padina boergesenii*. Algal Research, 79, 103442.

Collignon, J., Lousberg, L., Schroeder, H., Jerusalem, G. 2016. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. Breast Cancer : Targets and Therapy, 8, 93.

Costa, L. S., Fidelis, G. P., Cordeiro, S. L., Oliveira, R. M., Sabry, D. A., Câmara, R. B. G., ... Rocha, H. A. O. 2010. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. Biomedicine & Pharmacotherapy, 64(1), 21–28.

Cruz Riquelme, R. T., Colona-Vallejos, E. H., Alzamora-Gonzales, L., Condori Macuri, R. M. 2024. Fucoidan from *Lessonia trabeculata* Induces Apoptosis through Caspase Dependent and Caspase-Independent Activation in 4T1 Breast Adenocarcinoma In Vitro. Marine Drugs, 22(6), 251.

Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., Li, J. 2017. Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. Journal of Cancer, 8(16), 3131–3141.

De Araújo, I. W. F., Vanderlei, E. D. S. O., Rodrigues, J. A. G., Coura, C. O., Quinderé, A. L. G., Fontes, B. P., ... Benevides, N. M. B. 2011. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. Carbohydrate Polymers, 86(3), 1207–1215.

Deepika, M. S., Thangam, R., Sheena, T. S., Sasirekha, R., Sivasubramanian, S., Babu, M. D., ... Thirumurugan, R. 2019. A novel rutin-fucoidan complex based phytotherapy for cervical cancer through achieving enhanced bioavailability and cancer cell apoptosis. Biomedicine & Pharmacotherapy, 109, 1181–1195.

DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., ... Siegel, R. L. 2019. Breast cancer statistics, 2019. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 69(6), 438–451.

Diaz, M. I., Díaz, P., Bennett, J. C., Urrea, H., Ortiz, R., Orellana, P. C., ... Quest, A. F. G. 2020. Caveolin-1 suppresses tumor formation through the inhibition of the unfolded protein response. Cell Death & Disease 2020 11:8, 11(8), 1–16. doi: 10.1038/s41419-020-02792-4

- Díaz-Valdivia, N., Simón, L., Díaz, J., Martínez-Meza, S., Contreras, P., Burgos-Ravanal, R., ... Quest, A. F. G. 2022. Mitochondrial Dysfunction and the Glycolytic Switch Induced by Caveolin-1 Phosphorylation Promote Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cancers*, 14(12), 2862. doi: 10.3390/CANCERS14122862/S1
- do-Amaral, C. C. F., Pacheco, B. S., Seixas, F. K., Pereira, C. M. P., Collares, T. 2020. Antitumoral effects of fucoidan on bladder cancer. *Algal Research*, 47, 101884. doi: 10.1016/j.algal.2020.101884
- Dogliani, G., Parik, S., Fendt, S. M. 2019. Interactions in the (pre)metastatic niche support metastasis formation. *Frontiers in Oncology*, 9(MAR), 219. doi: 10.3389/fonc.2019.00219
- Duan, Y., Li, J., Jing, X., Ding, X., Yu, Y., Zhao, Q. 2020. Fucoidan Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of Hepatocellular Carcinoma via the p38 MAPK/ERK and PI3K/Akt Signal Pathways. *Cancer Management and Research*, 12, 1713. doi: 10.2147/CMAR.S243495
- Etman, S. M., Elnaggar, Y. S. R., Abdallah, O. Y. 2020. Fucoidan, a natural biopolymer in cancer combating: From edible algae to nanocarrier tailoring. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 799–808.
- Fernandes, C. L., Silva, D. J., Mesquita, A. 2023. Novel HER-2 Targeted Therapies in Breast Cancer. *Cancers* 2024, Vol. 16, Page 87, 16(1), 87.
- Fernando, I. P. S., Sanjeewa, K. K. A., Lee, H. G., Kim, H. S., Prasanna Vaas, A. P. J., de Silva, H. I. C., ... Jeon, Y. J. 2020. Fucoidan Purified from *Sargassum polycystum* Induces Apoptosis through Mitochondria-Mediated Pathway in HL-60 and MCF-7 Cells. *Marine Drugs* 2020, Vol. 18, Page 196, 18(4), 196.
- Finn, R. S., Martin, M., Rugo, H. S., Jones, S., Im, S.-A., Gelmon, K., ... Slamon, D. J. 2016. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(20), 1925–1936.
- Glenney, J. R., Soppet, D. 1992. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), 10517–10521.
- Godina, C., Belting, M., Vallon-Christersson, J., Isaksson, K., Bosch, A., Jernström, H. 2024. Caveolin-1 gene expression provides additional prognostic information combined with PAM50 risk of recurrence (ROR) score in breast cancer. *Scientific reports*, 14(1).
- Goetz, J. G., Lajoie, P., Wiseman, S. M., Nabi, I. R. 2008. Caveolin-1 in tumor progression: The good, the bad and the ugly. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(4), 715–735.
- Gokani, S., Bhatt, L. K. 2022. Caveolin-1: A Promising Therapeutic Target for Diverse Diseases. *Current Molecular Pharmacology*, 15(5), 701-715. doi: 10.2174/1874467214666211130155902

- Gupta, R., Toufaily, C., Annabi, B. 2014. Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer. *Biochimie*, 107(PB), 188–202. doi: 10.1016/j.biochi.2014.09.010
- Han, Y. S., Lee, J. H., Lee, S. H. 2015. Antitumor Effects of Fucoidan on Human Colon Cancer Cells via Activation of Akt Signaling. *Biomolecules & Therapeutics*, 23(3), 225. doi: 10.4062/biomolther.2014.136
- Hanahan, D., Weinberg, R. 2015. Chapter 2 : Hallmarks of Cancer : An Organizing Principle for Cancer Medicine.
- Hart, P. C., Ratti, B. A., Mao, M., Ansenberger-Fricano, K., Shajahan-Haq, A. N., Tyner, A. L., ... Bonini, M. G. 2016. Caveolin-1 regulates cancer cell metabolism via scavenging Nrf2 and suppressing MnSOD-driven glycolysis. *Oncotarget*, 7(1), 308–322. doi: 10.18632/oncotarget.5687
- Hassanpour, S. H., Dehghani, M. 2017. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129.
- He, X., Xue, M., Jiang, S., Li, W., Yu, J., Xiang, S. 2019. Fucoidan Promotes Apoptosis and Inhibits EMT of Breast Cancer Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(3), 442–447.
- Hnasko, R., Lisanti, M. P. 2003. The Biology of Caveolae: Lessons from Caveolin Knockout Mice and Implications for Human Disease. *Molecular Interventions*, 3(8), 445.
- Hsu, H., Hwang, P. 2019. Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. *Clinical and Translational Medicine*, 8(1), 1–18.
- Huerta-Reyes, M., Maya-Núñez, G., Pérez-Solis, M. A., López-Muñoz, E., Guillén, N., Olivo-Marin, J. C., Aguilar-Rojas, A. 2019. Treatment of Breast Cancer With Gonadotropin-Releasing Hormone Analogs. *Frontiers in Oncology*, 9, 485434.
- Jayawardena, T. U., Nagahawatta, D. P., Fernando, I. P. S., Kim, Y. T., Kim, J. S., Kim, W. S., ... Jeon, Y. J. 2022. A Review on Fucoidan Structure, Extraction Techniques, and Its Role as an Immunomodulatory Agent. *Marine Drugs*, 20(12).
- Jordan, V. C. 2003. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(3), 205–213.
- Kang, J., Jia, X., Wang, N., Xiao, M., Song, S., Wu, S., ... Guo, Q. 2022. Insights into the structure-bioactivity relationships of marine sulfated polysaccharides: A review. *Food Hydrocolloids*, 123, 107049.
- Ketteler, J., Klein, D. 2018. Caveolin-1, cancer and therapy resistance. doi: 10.1002/ijc.31369
- Khotimchenko, M., Tiasto, V., Kalitnik, A., Begun, M., Khotimchenko, R., Leonteva, E., ... Khotimchenko, Y. 2020. Antitumor potential of carrageenans from marine red algae. *Carbohydrate Polymers*, 246, 116568. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116568

- Kong, C. S., Kim, J. A., Yoon, N. Y., Kim, S. K. 2009. Induction of apoptosis by phloroglucinol derivative from *Ecklonia Cava* in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1653–1658. doi: 10.1016/j.fct.2009.04.013
- Kurzchalia, T. V., Dupree, P., Parton, R. G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M., Simons, K. 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles.. *Journal of Cell Biology*, 118(5), 1003–1014.
- Lai, X., Guo, Y., Chen, M., Wei, Y., Yi, W., Shi, Y., Xiong, L. 2021. Caveolin1: its roles in normal and cancer stem cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 147(12), 3459–3475. doi: 10.1007/S00432-021-03793-2
- Lappalainen, K., Jääskeläinen, I., Syrjänen, K., Urtti, A., Syrjänen, S. 1994. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharmaceutical research*, 11(8), 1127–1131. doi: 10.1023/A:1018932714745
- Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R. 2008. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules* 2008, Vol. 13, Pages 1671-1695, 13(8), 1671–1695.
- Li, Q., Jiang, B., Guo, J., Shao, H., Del Priore, I. S., Chang, Q., ... Chandarlapaty, S. 2022. INK4 Tumor Suppressor Proteins Mediate Resistance to CDK4/6 Kinase Inhibitors. *Cancer Discovery*, 12(2), 356–371.
- Lim, B., Miller, E., Lee, H. J., Lulla, A., Hernandez, L., Gokare, P. 2014. Current treatment of early breast cancer: adjuvant and neoadjuvant therapy. *F1000Research*, 3.
- Lim, S. J., Wan Aida, W. M. 2017. Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) From Brown Seaweed. *Seaweed Polysaccharides: Isolation, Biological and Biomedical Applications*, 27–46.
- Lin, Y., Qi, X., Liu, H., Xue, K., Xu, S., Tian, Z. 2020. The anti-cancer effects of fucoidan: A review of both in vivo and in vitro investigations. *Cancer Cell International*, 20(1), 1–14. doi: 10.1186/S12935-020-01233-8/TABLES/5
- Lu, J., Shi, K. K., Chen, S., Wang, J., Hassouna, A., White, L. N., ... Nie, S. 2018. Fucoidan Extracted from the New Zealand *Undaria pinnatifida*-Physicochemical Comparison against Five Other Fucoidans: Unique Low Molecular Weight Fraction Bioactivity in Breast Cancer Cell Lines. *Marine drugs*, 16(12).
- Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., Tong, H. 2019. Therapeutic Effects of Fucoidan: A Review on Recent Studies. *Marine Drugs* 2019, Vol. 17, Page 487, 17(9), 487. doi:10.3390/md17090487
- Malyarenko, O. S., Ermakova, S. P. 2017. Fucoidans: Anticancer Activity and Molecular Mechanisms of Action. *Seaweed Polysaccharides: Isolation, Biological and Biomedical Applications*, 175–203.
- McAndrew, N. P., Finn, R. S. 2022. Clinical Review on the Management of Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. *JCO Oncology Practice*, 18(5), 319–327.

- Michailidou, K., Beesley, J., Lindstrom, S., Canisius, S., Dennis, J., Lush, M. J., ... Easton, D. F. 2015. Genome-wide association analysis of more than 120,000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer.
- Minhas, L. A., Kaleem, M., Farooqi, H. M. U., Kausar, F., Waqar, R., Bhatti, T., ... Mumtaz, A. S. 2024. Algae-derived bioactive compounds as potential pharmaceuticals for cancer therapy: A comprehensive review. *Algal Research*, 78, 103396.
- Morelli, A., Puppi, D., Chiellini, F. 2017. Perspectives on Biomedical Applications of Ulvan. *Seaweed Polysaccharides: Isolation, Biological and Biomedical Applications*, 305–330.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Mylavarapu, S., Das, A., Roy, M. 2018. Role of BRCA mutations in the modulation of response to platinum therapy. *Frontiers in Oncology*, 8(FEB), 324213.
- Nagahawatta, D. M. ; P. ;, Jayawardena, T. U. ;, Sanjeeva, K. K. A. ;, Jayawrdhana, H. H. A. C. K. ;, Kim, J.-I. ;, Jeon, Y.-J., ... Jeon, Y.-J. 2023. Sulfated Polysaccharides from Seaweeds: A Promising Strategy for Combatting Viral Diseases—A Review. *Marine Drugs* 2023, Vol. 21, Page 461, 21(9), 461.
- National Cancer Institute. 2022. Breast Cancer Treatment (Adult) (PDQ®). PDQ Cancer Information Summaries, 1–5.
- Nunes, C., Rocha, A., Quitério, P., Ferreira, S. S., Correia, A., Vilanova, M., Coimbra, M. A. 2019. Salt pan brine water as a sustainable source of sulphated polysaccharides with immunostimulatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 235–242.
- Ogodo, A. C., Egbuna, C., Okoronkwo, C. U. 2022. Marine organisms as a potential source of antiviral drugs for the treatment of coronavirus infections and other viral diseases. *Coronavirus Drug Discovery: Volume 2: Antiviral Agents from Natural Products and Nanotechnological Applications*, 2, 207–224.
- Oliyai, N., Moosavi-Nasab, M., Mazloomi, S. M. 2022. Therapeutic activity of fucoidan and carrageenan as marine algal polysaccharides against viruses. *3 Biotech*, 12(7), 1–15.
- Ortiz, R., Díaz, J., Díaz, N., Lobos-Gonzalez, L., Cárdenas, A., Contreras, P., ... Quest, A. F. G. 2016. Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *Oncotarget*, 7(26), 40571. doi: 10.18632/oncotarget.9738
- Palade, G.E. 1953. Fine Structure of Blood Capillaries. *Journal of Applied Physics*, 24, 1424-1432. doi: 10.1177/1.4.188
- Palanisamy, S., Vinosha, M., Manikandakrishnan, M., Anjali, R., Rajasekar, P., Marudhupandi, T., ... Prabhu, N. M. 2018. Investigation of antioxidant and

- anticancer potential of fucoidan from *Sargassum polycystum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 151–161.
- Pang, L., Yang, S., Dai, W., Wu, S., Kong, J. 2022. Role of caveolin-1 in human organ function and disease: friend or foe?. *Carcinogenesis*, 43(1), 2-11. doi:10.1093/carcin/bgab080
- Park, H. S., Kim, G. Y., Nam, T. J., Deuk Kim, N., Hyun Choi, Y. 2011. Antiproliferative activity of fucoidan was associated with the induction of apoptosis and autophagy in AGS human gastric cancer cells. *Journal of food science*, 76(3), T77–T83. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02099.x
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J. A., ... Lisanti, M. P. 1999. Expression of Caveolin-1 Is Required for the Transport of Caveolin-2 to the Plasma Membrane: RETENTION OF CAVEOLIN-2 AT THE LEVEL OF THE GOLGI COMPLEX. *Journal of Biological Chemistry*, 274(36), 25718–25725.
- Parreño, M., Casanova, I., Céspedes, M. V., Vaqué, J. P., Pavón, M. A., Leon, J., Mangles, R. 2008. Bobel-24 and Derivatives Induce Caspase-Independent Death in Pancreatic Cancer Regardless of Apoptotic Resistance. *Cancer Research*, 68(15), 6313–6323. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1054
- Partin, J. F. 2022. Special Considerations in Patients with Early-Stage Breast Cancer and Survivors. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 49(1), 195–208.
- Patel, S. 2012. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *3 Biotech* 2:3, 2(3), 171–185.
- Pathak, A., Tomar, S., Pathak, S. 2023. Epigenetics and Cancer: A Comprehensive Review. *Asia Pacific Journal of Cancer Biology*, 8(1), 75–89.
- Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C., Mei, W., Zeng, C. 2022. PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway. *Frontiers in Oncology*, 12.
- Phull, A. R., Kim, S. J. 2017. Fucoidan as bio-functional molecule: Insights into the anti-inflammatory potential and associated molecular mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 38, 415–426.
- Pradhan, B., Patra, S., Nayak, R., Behera, C., Dash, S. R., Nayak, S., ... Jena, M. 2020. Multifunctional role of fucoidan, sulfated polysaccharides in human health and disease: A journey under the sea in pursuit of potent therapeutic agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4263–4278. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.09.019
- Raja, S. A., Shah, S. T. A., Tariq, A., Bibi, N., Sughra, K., Yousuf, A., ... Hussain, A. 2019. Caveolin-1 and dynamin-2 overexpression is associated with the progression of bladder cancer. *Oncology Letters*, 18(1), 219.
- Reshkin, S. J., Cardone, R. A., Low, J.-Y., Laiho, M. 2022. Caveolae-Associated Molecules, Tumor Stroma, and Cancer Drug Resistance: Current Findings and

Future Perspectives. *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 589, 14(3), 589. doi: 10.3390/CANCERS14030589

- Riss TL, Moravec RA, 2006: Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In “Cell Biology”, Ed; Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington. doi: 10.1016/B978-012164730-8/50005-8
- Rudick, M., Anderson, R. G. W. 2002. Multiple functions of caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41295–41298.
- Sanniyasi, E., Gopal, R. K., Damodharan, R., Arumugam, A., Sampath Kumar, M., Senthilkumar, N., Anbalagan, M. 2023. In vitro anticancer potential of laminarin and fucoidan from Brown seaweeds. *Scientific reports*, 13(1).
- Santhanam, R. C., Yacoob, S. A. M., Venkatraman, A. 2022. In vitro cytotoxicity assay of Fucoidan extracted from *Turbinaria conoides* against cancer cell lines MCF7, A549, and normal cell line L929. *Braz. J. Pharm. Sci. (Online)*, 58, e19542–e19542. doi: 10.1590/S2175-97902022E19542
- Saravana, P. S., Chun, B. S. 2017. Seaweed Polysaccharide Isolation Using Subcritical Water Hydrolysis. *Seaweed Polysaccharides: Isolation, Biological and Biomedical Applications*, 47–73.
- Satpathi, S., Gaurkar, S. S., Potdukhe, A., Wanjari, M. B. 2023. Unveiling the Role of Hormonal Imbalance in Breast Cancer Development: A Comprehensive Review.
- Schlegel, A., Lisanti, M. P. 2000. A Molecular Dissection of Caveolin-1 Membrane Attachment and Oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21605–21617.
- Schmid, P., Rugo, H. S., Adams, S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., ... Emens, L. A. 2020. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer
- Shah, C., Al-Hilli, Z., Vicini, F. 2021. Advances in Breast Cancer Radiotherapy: Implications for Current and Future Practice. *JCO Oncology Practice*, 17(12), 697–706.
- Shang, Q. 2020. Revisit the effects of fucoidan on gut microbiota in health and disease: What do we know and what do we need to know. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 23, 100221.
- Shiau, J. P., Chuang, Y. T., Yang, K. H., Chang, F. R., Sheu, J. H., Hou, M. F., ... Chang, H. W. 2022. Brown Algae-Derived Fucoidan Exerts Oxidative Stress-Dependent Antiproliferation on Oral Cancer Cells. *Antioxidants*, 11(5), 841.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. doi: 10.3322/CAAC.21551
- Singh, D. P., Pathak, R., Chintalaramulu, N., Pandit, A., Kumar, A., Ebenezer, P. J., ... Francis, J. 2024. Caveolin-1 knockout mitigates breast cancer metastasis to the lungs via integrin $\alpha 3$ dysregulation in 4T1-induced syngeneic breast cancer model. *Cancer Gene Therapy* 2024 31:11, 31(11), 1658–1668.

- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M. 1973. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409–1416.
- Sun, L., Wang, C., Shi, Q., Ma, C. 2009. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(1), 42–47. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201673
- Sunaga, N., Miyajima, K., Suzuki, M., Sato, M., White, M. A., Ramirez, R. D., ... Minna, J. D. 2004. Different Roles for Caveolin-1 in the Development of Non-Small Cell Lung Cancer versus Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 64(12), 4277-4285. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3941
- Sunshine, J., Taube, J. M. 2015. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 23, 32–38.
- Swain, S. M., Shastry, M., Hamilton, E. 2023. Nature reviews drug discovery Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery* |, 22, 101–126.
- Teruel, I., Castellà, E., Recalde, S., Viñas, G., Petit, A., Trigueros, M., ... Margelí, M. 2024. Assessing the Prognostic Value of Cytoplasmic and Stromal Caveolin-1 in Early Triple-Negative Breast Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12241.
- Teruya, T., Konishi, T., Uechi, S., Tamaki, H., Tako, M. 2007. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(3), 221–226. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.02.010
- Timbres, J., Kohut, K., Caneppele, M., Troy, M., Schmidt, M. K., Roylance, R., Sawyer, E. 2023. DCIS and LCIS: Are the Risk Factors for Developing In Situ Breast Cancer Different. *Cancers*, 15(17).
- Treatment of Breast Cancer Stages I-III | American Cancer Society. 2024.
- Turrini, E., Maffei, F., Fimognari, C. 2023. Ten Years of Research on Fucoidan and Cancer: Focus on Its Antiangiogenic and Antimetastatic Effects. *Marine Drugs* 2023, Vol. 21, Page 307, 21(5), 307.
- Vo, T. S. 2020. The role of algal fucoidans in potential anti-allergic therapeutics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1093–1098.
- Wang, L., Wang, X., Wu, H., Liu, R. 2014. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. *Marine drugs*, 12(9), 4984–5020.
- Wang, M. Q., Zhu, W. J., Gao, P. 2021. New insights into long non-coding RNAs in breast cancer: Biological functions and therapeutic prospects. *Experimental and Molecular Pathology*, 120. Doi: 10.1016/j.yexmp.2021.104640
- Wang, Z. J., Zheng, L., Yang, J. M., Kang, Y., Park, Y. D. 2018. Proteomic analyses for profiling regulated proteins/enzymes by *Fucus vesiculosus* fucoidan in B16

- melanoma cells: A combination of enzyme kinetics functional study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 667–674.
- Wang, Z., Chen, G., Yuan, D., Wu, P., Guo, J., Lu, Y., Wang, Z. 2024. Caveolin-1 promotes glioma proliferation and metastasis by enhancing EMT via mediating PAI-1 activation and its correlation with immune infiltrates. *Heliyon*, 10(2), e24464.
- Wen, Y., Gao, L., Zhou, H., Ai, C., Huang, X., Wang, M., ... Zhao, C. 2021. Opportunities and challenges of algal fucoidan for diabetes management. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 628–641.
- Williams, T. M., Hassan, G. S., Li, J., Cohen, A. W., Medina, F., Frank, P. G., ... Lisanti, M. P. 2005. Caveolin-1 Promotes Tumor Progression in an Autochthonous Mouse Model of Prostate Cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25134–25145. doi: 10.1074/jbc.M501186200
- Witkiewicz, A. K., Dasgupta, A., Sammons, S., Er, O., Potoczek, M. B., Guiles, F., ... Lisanti, M. P. 2010. Loss of stromal caveolin-1 expression predicts poor clinical outcome in triple negative and basal-like breast cancers. doi: 10.4161/cbt.10.2.11983
- Xie, J. H., Wang, Z. J., Shen, M. Y., Nie, S. P., Gong, B., Li, H. S., ... Xie, M. Y. 2016. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. *Food Hydrocolloids*, 53, 7–15.
- Xiong, N., Wu, H., Yu, Z. 2024. Advancements and challenges in triple-negative breast cancer: a comprehensive review of therapeutic and diagnostic strategies. *Frontiers in Oncology*, 14.
- Xue, M., Ge, Y., Zhang, J., Liu, Y., Wang, Q., Hou, L., Zheng, Z. 2013. Fucoidan Inhibited 4T1 Mouse Breast Cancer Cell Growth In Vivo and In Vitro Via Downregulation of Wnt/ β -Catenin Signaling.
- Xue, M., Ji, X., Xue, C., Liang, H., Ge, Y., He, X., ... Zhang, L. 2017. Caspase-dependent and caspase-independent induction of apoptosis in breast cancer by fucoidan via the PI3K/AKT/GSK3 β pathway in vivo and in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 898–908. doi: 10.1371/journal.pone.0166823
- Yamasaki-Miyamoto, Y., Yamasaki, M., Tachibana, H., Yamada, K. 2009. Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8677–8682.
- Yan, M. De, Yao, C. J., Chow, J. M., Chang, C. L., Hwang, P. A., Chuang, S. E., ... Lai, G. M. 2015. Fucoidan Elevates MicroRNA-29b to Regulate DNMT3B-MTSS1 Axis and Inhibit EMT in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Marine Drugs*, 13(10), 6099.
- Yang, C., He, B., Dai, W., Zhang, H., Zheng, Y., Wang, X., Zhang, Q. 2021. The role of caveolin-1 in the biofate and efficacy of anti-tumor drugs and their nano-drug delivery systems. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 11(4), 961–977. doi: 10.1016/j.apsb.2020.11.020

- Yang, L., Wang, P., Wang, H., Li, Q., Teng, H., Liu, Z., ... Zou, X. 2013. Fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via the ROS-mediated mitochondrial pathway. *Marine Drugs*, 11(6), 1961–1976. doi: 10.3390/md11061961
- Yao, W., Qiu, H. M., Cheong, K. L., Zhong, S. 2022. Advances in anti-cancer effects and underlying mechanisms of marine algae polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221, 472–485. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.055
- Yu, H., Zhang, Q., Farooqi, A. A., Wang, J., Yue, Y., Geng, L., Wu, N. 2024. Opportunities and challenges of fucoidan for tumors therapy. *Carbohydrate Polymers*, 324, 121555.
- Yunianta, Y., Laeliocattleya, R. A., Wulan, S. N., Risjani, Y. 2024. Fucoidan extract from brown seaweed (*Sargassum echinocarpum*): molecular weight, elemental composition, selectivity and anticancer activity against breast cancer cells. *Natural Product Research*.
- Zaitseva, O. O., Sergushkina, M. I., Khudyakov, A. N., Polezhaeva, T. V., Solomina, O. N. 2022. Seaweed sulfated polysaccharides and their medicinal properties. *Algal Research*, 68, 102885. doi: 10.1016/j.algal.2022.102885
- Zhang, L., Chen, L., Xu, X., Lin, Y., Cheung, P. C. K., Kennedy, J. F. 2005. Comparison on chain stiffness of a water-insoluble (1→3)- α -D-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia and its sulfated derivative. *Carbohydrate Polymers*, 59(2), 257–263.
- Zhang, Z., Teruya, K., Eto, H., Shirahata, S. 2011. Fucoidan Extract Induces Apoptosis in MCF-7 Cells via a Mechanism Involving the ROS-Dependent JNK Activation and Mitochondria-Mediated Pathways. *PLOS ONE*, 6(11), e27441.
- Zhu, K., Yang, X., Tai, H., Zhong, X., Luo, T., Zheng, H. 2024. HER2-targeted therapies in cancer: a systematic review. *Biomarker Research* 2024 12:1, 12(1), 1–17.