

**FUNGAL KAYNAKLI BASSIATİN'İN (3R,6R) MEME  
KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FUNGAL-  
SOURCED BASSIATIN (3R, 6R) ON BREAST CANCER  
CELL LINES**

**ERKAY ÖZGÖR**

**Prof. Dr. NEVİN KESKİN**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

ERKAY ÖZGÖR' ün hazırladığı "Fungal Kaynaklı Bassiatin'in (3R,6R) Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI' nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emir Cansunar  
Başkan



Prof. Dr. Nevin KESKİN  
Danışman



Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ  
Üye



Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU  
Üye



Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**  
(Bu seçenikle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)
- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**  
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)
- Tezimin/Raporumun 06/06/2020 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

06 / 06 / 2017

  
Erkay Özgör

*İpek Saçlı Kızıma...*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

17/05/2017



ERKAY ÖZGÖR

## ÖZET

# FUNGAL KAYNAKLI BASSİATİN'İN (3R,6R) MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Erkay ÖZGÖR**

**Doktora, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nevin KESKİN**

**Mayıs 2017, 149 sayfa**

Çağımızın en önemli hastalıklarından biri olarak görülen kanser, milyonlarca kişinin ölümüne neden olmaktadır. Kanser, ileri evrelerde vücuttaki fiziksel hasarlar yanı sıra psikolojik olarak da yıpratıcı etkilere neden olmaktadır. Bu denli insan hayatını olumsuz etkileyen ve insanları ölüme sürükleyen bir hastalığın tedavisi için bilim adamları bu konuya yönelik çeşitli araştırmalar yapmaktadır. Çalışmaların, daha çok kanserin tipi ve kanser gelişimini etkileyen faktörler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Oluştığı organ ve dokuya bağlı olarak, kanserin gelişimini ve proliferasyonunu tetikleyen birçok vücut içi ve dışı faktör bulunması nedeniyle tedavi, kanser türüne göre değişiklik göstermektedir. Kullanılan tedavi yöntemlerinden en etkili olanları, klasik kemoterapi olarak adlandırılan sentetik veya doğal yollarla elde edilen maddelerin kanser hücrelerini öldürmek üzere kullanılması şeklindedir. Genellikle kanserin kemoterapisinde kullanılan maddeler, kanser hücreleri ve normal hücreler arasında ayırım yapmaksızın etkili olmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarla, hedef dokuya yönelik maddeler keşfedilmeye çalışılmaktadır. Bu maddelerin, normal hücreleri etkilememesi, sadece kanserli hücreleri ortadan kaldırması istenmektedir. Günümüzde birçok madde, hedefe yönelik olarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla araştırılmaktadır. Ancak bu maddelerin çok azı günümüzde kanser tedavisinde kullanılabilir.

Kadınlarda en çok görülen kanser tipi olan meme kanseri, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenidir. Bu nedenle erken tanı ve etkin tedavisi son derece önemlidir. Günümüzde sitotoksik kemoterapi ilaçları ile meme kanseri tedavi edilmekteyse de, bu tedavi sonucunda, hastanın normal vücut hücreleri de zarar görmekte ve yaşam kalitesi bozulmaktadır. Dolayısıyla meme kanseri tedavisinde etkili ve diğer normal hücelere zararsız bir maddenin bulunması için çalışmalar sürdürülmektedir. Özellikle östrojen reseptörü taşıyan (ER+) meme kanseri hücrelerinde, 17 $\beta$ -östradiol' un hücreyi etkilemesini engelleyen "tamoksifen" olarak bilinen antiöstrojenik madde, meme kanseri hastalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak tamoksifenin gerek pahalı bir ürün olması, gerekse hücrelerin direnç geliştirmeye başlaması, bilim dünyasını yeni ve daha etkili alternatif bir ürünün bulunması için teşvik etmektedir.

Bazı funguslar (örneğin; entomopatojenik fungus *Beauveria bassiana*) tarafından üretilen Bassiatin (3R,6R), morfolin temelli bir depsipeptittir. Yapılan son çalışmalarda bassiatin'in anti-östrojenik bir etkiye sahip olduğu ve ER+ MCF-7 meme kanseri hücre hattının proliferasyonunu durdurduğu görülmüştür. Bu hedefe yönelik olarak bu çalışmada; ilk olarak entomopatojenik funguslardan *Beauveria bassiana*, *Fusarium oxysporum* ve *Paecilomyces fumosoroseus* türleri kullanılarak bassiatin üretimi etkinliği değerlendirildi ve bassiatin'in saf olarak elde edilmesi sağlandı. Daha sonra bassiatin'in meme dokusundan köken alan MCF-7 kanser hücre hattı üzerindeki inhibisyonuna ve sitotoksitesine bakıldı ve bu hücre hattında apoptozis mekanizmasını aktive edip etmediği incelendi. Bu hücre hattı ile maddenin reseptörler üzerine etkisini karşılaştırmak için MDA-MB-231 ve SK-BR-3 meme kanseri hücre hatları ile sitotoksitesite çalışmaları yürütülmüştür. Bu kanser hücre hattı üzerinde bulunan östrojen reseptörünün yanı sıra, meme kanseri hücrelerinin gelişiminde etkili faktörleri tanıyan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörünün (VEGFR), bassiatin ile ilişkisi incelendi.

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular, bassiatinin hem kolay eldesi hem de seçici hücre inhibisyonu nedeniyle meme kanseri tedavisinde etkin bir şekilde kullanılabilceğini göstermiştir. İlerleyen çalışmalarla klinik meme kanseri vakalarına yönelik tedavi seçeneklerinden biri olarak ele alınması değerlendirilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Bassiatin, depsipeptit, meme kanseri, ER, EGFR, VEGFR, MCF-7

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FUNGAL-SOURCED BASSIATIN (3R, 6R) ON BREAST CANCER CELL LINES**

**Erkay ÖZGÖR**

**Doctor of Philosophy, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Nevin KESKİN**

**May 2017, 149 pages**

Cancer causes millions of deaths which is considered as one of the most important diseases of our century. It causes psychologically debilitating effects in advanced stages as well as physical damages to the body. Scientists conduct variety of research on this subject for the treatment of this disease that affects human life adversely and leads to deaths. It is seen that Studies have focused on factors influencing the type of cancer and cancer development. Treatment varies according to the type of cancer. Because there are many internal and external factors that trigger the growth and proliferation of cancer according to organs and tissues. The most effective one in the cancer treatment is called conventional chemotherapy, the substances obtained by synthetic or naturally are used to kill cancer cells. Generally, the substances used in the chemotherapy of cancer, are effective without distinguishing between normal cells and cancer cells. However, the substances are tried to be discovered on the target tissue with studies. It is required that these substances should eliminate only the cancer cells without affecting normal cells. Nowadays, many substances are investigated with *in vitro* and *in vivo* studies towards the target. However, very few of these substances are currently utilized in the treatment of cancer.



Breast cancer which the most common type of cancer in women is the leading cause of cancer deaths. Therefore, early diagnosis and effective treatment are extremely important. Although breast cancer is treated with cytotoxic chemotherapy drugs, the patient's normal body cells are damaged and the quality of life is impaired in this treatment. Therefore, the studies are continuing to find the substance for the effective treatment of breast cancer without any affect to other normal cells. Especially, the anti-estrogenic agents 'Tamoxifen' which prevents the effect of  $17\beta$ -oestradiol on estrogen receptor bearing (ER +) breast cancer cells, is widely used in breast cancer patients. However, tamoxifen is an expensive product and the cells begin to develop resistance. That's why, this situation encourages science world to find a new and more effective alternative agent.

Bassiatin (3R,6R) which is produced by some fungi (eg entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*), is a depsipeptid based on morpholine. In recent studies show that bassiatin has an anti-estrogenic effect and it stops the proliferation of ER + MCF-7 breast cancer cell line. In this study following this aim, firstly bassiatin was produced using entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Fusarium oxysporum* and *Paecilomyces fumosoroseus* species and it was provided to obtain bassiatin as pure. After that, bassiatin's inhibition and cytotoxicity was examined on MCF-7 cancer cell line derived from mammary tissue and apoptosis mechanism of this cell line was discussed in terms of activation. To compare the effect of this substance on receptors with this cell line, cytotoxicity tests were conducted with MDA-MB-231 and SK-BR-3 breast cancer cell lines. The relationship between bassiatin with epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) was examined that recognize effective factors in the development of breast cancer cells, in addition to the estrogen receptor in this cancer cell line.

The findings obtained as a result of this study, it was shown that bassiatin can be used effectively in breast cancer treatment because of both its simple production and selective cell inhibition. Progressive studies should be considered as one of the treatment options for clinical breast cancer cases.

**Keywords:** Bassiatin, depsipeptide, breast cancer, ER, EGFR, VEGFR, MCF-7

## TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden başlayarak akademik hayatımın tüm aşamalarında beni bilgi ve tecrübeleriyle bugünlere getiren ve tüm zorluklara rağmen çalıştığım alanlarda en iyisi olmam için beni idealist olarak yetiştiren en değerli öğretmenim, danışman hocam Prof. Dr. Nevin KESKİN' e, doktora çalışmalarımın şekillenmesi ve tüm bu çalışmaların yürütülmesinde benden bilgilerini ve çalışma ortamlarını esirgemeyen güzel yürekli hocam Doç. Dr. Özer Aylın GÜRPINAR' a, tez sürecinde çalışmamın en iyi bir şekilde gerçekleşmesi için elinden gelen her şeyi benimle paylaşan ve bilgileriyle beni aydınlatan değerli hocam Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ' a, tez çalışmamın birçok aşamasında emeği olan ve çalışmamın kalitesini en üst düzeylere çıkarmamı sağlayan hem bir hoca hem de bir arkadaş gibi benimle omuz omuza çalışmaları yürüten sevgili hocam Dr. Handan SEVİM' e, çalışmada kullandığım maddenin saf olarak elde edilmesi aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Adil DENİZLİ' ye ve ekibine, hücre hatlarının tedarik sürecinde her konuda yardımcı olan Şükran YILMAZ ve Doç. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU' na, hücre siklusu analizleri için tüm imkanlarını sunarak tez çalışmamın değerini artıran sevgili hocam Dr. Hande CANPINAR' a, ilk tanıştığımız günden beri hem bilimsel hem de sosyal alanda büyük bir ekip olmamızı sağlayan ve bir ekip olarak birçok önemli işler başarmamızı sağlayan canımdan çok sevdiğim Meltem ULUSOY' a, İrem ÇELEBİER' e, Semiha Selda YILDIZ' a ve Zeynep Kevser İĞDE' ye, tez çalışmam boyunca beni motive ederek yanımdan hiç ayrılmayan dostlarım Kübra ERKAN TÜRKMEN' e ve Mehmet Fatih TÜRKMEN' e, yanımda her zaman desteğini hissettiğim sevgili arkadaşlarım Özgecan ERDEM' e, Mehmet Kürşat ŞAHİN' e ve Muhammed Hasan AKYIL' a, benimle her zaman gururlanan ve övgü ile söz eden canım annem Fatma ÖZGÖR' e ve babam Fuat ÖZGÖR' e, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve benim akademik ilerleyişim için elinden geleni yapan biricik eşim Fatoş ÖZGÖR' e, hayatıma girdiğinden beri beni farklı bir insana dönüştüren ve bana baba olma duygusunu yaşatan canımdan çok sevdiğim kızım Melis ÖZGÖR' e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması; TÜBİTAK tarafından 215S096 numaralı proje ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından FHD-2017-13202 numaralı proje ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	viii
ŞEKİLLER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Kanser Patofizyolojisi ve Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler .....	4
2.1.1.1. Çevresel Faktörler .....	6
2.1.1.2. Kalıtsal Faktörler .....	8
2.2. Meme Kanseri.....	8
2.2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri .....	9
2.2.1.1. Genel Faktörler .....	10
2.2.1.2. Endokrin ve Üreme Faktörleri.....	10
2.2.1.3. Çevresel Faktörler .....	11
2.2.1.4. Hayat Tarzına Bağlı Faktörler .....	12
2.2.1.5. Genetik Faktörler .....	13
2.2.2. Meme Kanserinin Semptomları .....	14
2.2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması .....	15
2.2.4. Meme Kanserinde Tedavi .....	17
2.2.4.1. Cerrahi Müdahale .....	17
2.2.4.2. Radyoterapi.....	18
2.2.4.3. İlaç Tedavisi .....	18
2.3. Funguslar .....	21
2.3.1. Fungal Metabolitler .....	23
2.3.1.1. Bassiatinin Kimyasal Yapısı ve Etkileri .....	25
3. MATERYAL – METOT .....	27
3.1. Bassiatin Üretimi için Fungus Türlerinin Seçilmesi.....	27
3.2. Bassiatin’in Elde Edilmesi.....	29
3.2.1. Fungus Türlerinin Kültürasyonu ve Bassiatin Üretim Çalışmaları.....	29

3.2.2. Kùltùrlerin Ekstraksiyon ve Elüsyon Aşamaları .....	31
3.2.3. Nùkleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi ile Bassiatin'in Analizi...	32
3.2.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Bassiatinin Kromatografik Safılaştırma Durumunun İncelenmesi .....	34
3.2.5. Kolon Kromatografisi Çalışmaları .....	37
3.2.6. Bassiatinin Preparatif HPLC ile Saf Olarak Elde Edilmesi .....	38
3.3. Hücre Kùltürü Çalışmaları .....	38
3.4. Hücre Canlılığı Testleri.....	42
3.5. Apoptotik Hücrelerin Propidium Iodide (PI) Floresan Boyası İle Tespiti ve Hücre Siklusu Analizi.....	46
3.6. Bassiatin'in ER, EGFR ve VEGFR Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi .....	46
3.7. İstatistiksel Çalışmalar .....	48
4. SONUÇLAR.....	49
4.1. Fungus Türlerinin Bassiatin Üretimi Açısından Değerlendirilmesi .....	49
4.2. Üretim Maddelerinin NMR Spektroskopisi İle Değerlendirilmesi.....	50
4.3. Bassiatinin Preparatif HPLC ile Saf Eldesinin Değerlendirilmesi .....	55
4.4. Sitotoksisite Çalışmalarının Değerlendirilmesi .....	56
4.5. MCF-7 ve SVCT Hücre Hatlarının Apoptozis Durumu ve Hücre Siklusu Analizinin Sonuçları .....	90
4.6. Bassiatinin ER, EGFR ve VEGFR Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesinde Elde Edilen Sonuçlar.....	100
4.7. İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları .....	102
5. TARTIşMA.....	122
KAYNAKLAR.....	133
ÖZGEÇMİş.....	149

# ÇİZELGELER

## Sayfa

Çizelge 2.1. Funguslardan elde edilen toksik ve farmasötik olarak aktif bileşikler.....	24
Çizelge 3.1. Bassiatin üretimi için seçilen fungus türlerinin gen bankası benzerlik durumuna göre tür tespiti.....	27
Çizelge 3.2. McFarland standartlarının hazırlanışı ve hücre yoğunlukları ile karşılaştırılması.....	30
Çizelge 3.3. Bassiatinin C <sup>13</sup> NMR ve H <sup>1</sup> NMR kimyasal değişim spektrum değerleri .....	33
Çizelge 3.4. Sitotoksosite testinde kullanılan maddelerin (Bassiatin, Tamoksifen ve Kombine madde) konsantrasyonları.....	44
Çizelge 4.1. MCF-7 hücreleri üzerinde bassiatin, tamoksifen ve kombine maddeler ile gerçekleştirilen sitotoksosite çalışma verilerinin Normallik testi ile değerlendirilmesi (Kolmogorov-Smirnov, P<0,05) .....	102
Çizelge 4.2. SCVT hücreleri üzerinde bassiatin, tamoksifen ve kombine maddeler ile gerçekleştirilen sitotoksosite çalışma verilerinin Normallik testi ile değerlendirilmesi (Kolmogorov-Smirnov, P<0,05) .....	104
Çizelge 4.3. MCF-7 hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonların inkübasyon sürelerine göre karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test, P<0,05) .....	107
Çizelge 4.4. SVCT hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonların inkübasyon sürelerine göre karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test, P<0,05) .....	108
Çizelge 4.5. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test, P<0,05) .....	109
Çizelge 4.6. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test, P<0,05) .....	110
Çizelge 4.7. MCF-7 hücre hattında maddelerin saatlere göre tüm konsantrasyonlar arasında karşılaştırılması (Kruskal Wallis, P<0,05) .....	111
Çizelge 4.8. SVCT hücre hattında maddelerin saatlere göre tüm konsantrasyonlar arasında karşılaştırılması (Kruskal Wallis, P<0,05) .....	111
Çizelge 4.9. MCF-7 hücre hattı üzerinde bassiatinin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05).....	112
Çizelge 4.10. MCF-7 hücre hattı üzerinde tamoksifenin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05).....	113
Çizelge 4.11. MCF-7 hücre hattı üzerinde kombine maddenin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05) .....	114
Çizelge 4.12. SVCT hücre hattı üzerinde bassiatinin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05).....	115
Çizelge 4.13. SVCT hücre hattı üzerinde tamoksifenin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05).....	116
Çizelge 4.14. SVCT hücre hattı üzerinde kombine maddenin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05) .....	117

Çizelge 4.15. Bassiatinin konsantrasyonlarına göre MCF-7 ve SVCT hücre hatlarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U, $P<0,05$ ) .....	118
Çizelge 4.16. Tamoksifenin konsantrasyonlarına göre MCF-7 ve SVCT hücre hatlarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U, $P<0,05$ ) .....	119
Çizelge 4.17. Kombine maddenin konsantrasyonlarına göre MCF-7 ve SVCT hücre hatlarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U, $P<0,05$ ).....	120
Çizelge 4.18. Bassiatin, tamoksifen ve kombine maddeye göre MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatlarının tüm konsantrasyonlar açısından karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test, $P<0,05$ ).....	121

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 2.1. Bassiatin'in (3R,6R) moleküler yapısı .....	26
Şekil 3.1. <i>Beauveria bassiana</i> 'nın SEM (solda) ve ışık mikroskopundaki (sağda) görüntüsü (Fotoğraf: Erkay Özgör –Evren Çubukçu) .....	28
Şekil 3.2. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> 'un SEM (solda) ve ışık mikroskopundaki (sağda) görüntüsü (Fotoğraf: Erkay Özgör – Evren Çubukçu) .....	28
Şekil 3.3. <i>Fusarium oxysporum</i> 'un SEM (solda) ve ışık mikroskopundaki (sağda) görüntüsü (Fotoğraf: Erkay Özgör – Evren Çubukçu) .....	28
Şekil 3.4. SDAY besiyerinde üretilen fungus türleri (Fotoğraf: Erkay Özgör).....	29
Şekil 3.5. Bassiatinin $H^1$ NMR spektrumu ( $CDCl_3$ , 400 MHz) [174].....	32
Şekil 3.6. Bassiatinin saflaştırılabilmesi için $CHCl_3$ :MeOH (36:4)(Sağda) ve n-hekzan: etanol (37:3)(Solda) solventleri ile yapılan ince tabaka kromatografisi (Fotoğraf: Erkay Özgör).....	35
Şekil 3.7. $CHCl_3$ :MeOH (36:4) solventinin TLC sırasında sürtünmeye neden olup olmadığını incelemek için yapılan negatif kontrollü ince tabaka kromatografisi (Fotoğraf: Erkay Özgör) .....	36
Şekil 3.8. Kolon kromatografisinde kullanılacak solventin tespit edilmesi için farklı oranlarda hazırlanan solventlerle yapılan ince tabaka kromatografisi. Soldan sağa ilk dört uygulama $CHCl_3$ :MeOH'un farklı oranları, son dört uygulama ise n-hekzan: etanol'un farklı oranlarıdır (Fotoğraf: Erkay Özgör).....	36
Şekil 3.9. Bassiatinin tek bir bant şeklinde elde edildiği ince tabaka kromatografisi (Fotoğraf: Erkay Özgör) .....	37
Şekil 3.10. Bassiatinin toplandığı tüpün UV altında görüntülenmesi (Fotoğraf: Erkay Özgör).....	38
Şekil 3.11. MCF-7 hücre hattının 24 saatlik inkübasyon görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	39
Şekil 3.12. SVCT hücrelerinin pasaj yapıldıktan sonra süspanse haldeki görünümü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	40
Şekil 3.13. SVCT hücrelerinin 24 saat inkübasyondan sonraki görünümü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör).....	41
Şekil 3.14. MDA-MB-231 hücre hattının 24 saatlik inkübasyon görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör).....	42
Şekil 3.15. SK-BR-3 hücre hattının 24 saatlik inkübasyon görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	42
Şekil 3.16. Hücre hatları üzerindeki sitotoksite çalışmaları için tasarlanan farklı konsantrasyonların uygulanış biçiminin gösterilmesi .....	45
Şekil 4.1. Deney için seçilen fungus türlerinin 2 farklı üretim metodunda üretiminden sonra elde edilen kültür sıvıları (Fotoğraf: Erkay Özgör).....	50
Şekil 4.2. <i>Beauveria bassiana</i> kalıntısının $H^1$ NMR spektrumu (DMSO: $\delta_H$ 2.5 ve 4.0) ...	51

Şekil 4.3. <i>Beauveria bassiana</i> kalıntısının H <sup>1</sup> NMR spektrumu (0-5 ppm arası) .....	51
Şekil 4.4. <i>Beauveria bassiana</i> kalıntısının H <sup>1</sup> NMR spektrumu (7-10 ppm arası) .....	52
Şekil 4.5. <i>Beauveria bassiana</i> kalıntısının C <sup>13</sup> NMR spektrumu (DMSO:δ <sub>C</sub> 39.52).....	52
Şekil 4.6. <i>Beauveria bassiana</i> kalıntısının C <sup>13</sup> NMR spektrumu (10-100 ppm arası) .....	53
Şekil 4.7. <i>Fusarium oxysporum</i> kalıntısının H <sup>1</sup> NMR spektrumu.....	54
Şekil 4.8. <i>Fusarium oxysporum</i> kalıntısının H <sup>1</sup> NMR spektrumu (4-6 ppm arası).....	54
Şekil 4.9. Preparatif HPLC çalışması sırasında bassiatinin bulunduğu pik aralığının gösterilmesi.....	55
Şekil 4.10. 75 mM Bassiatin konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	57
Şekil 4.11. 0,25 mM Bassiatin konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör).....	58
Şekil 4.12. 75 mM Tamoksifen konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	59
Şekil 4.13. 0,25 mM Tamoksifen konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör).....	60
Şekil 4.14. 75 mM kombine madde konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör).....	61
Şekil 4.15. 0,25 mM kombine madde konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör).....	62
Şekil 4.16. MCF-7 hücrelerinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	63
Şekil 4.17. 75 mM Bassiatin konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	64
Şekil 4.18. 0,25 mM Bassiatin konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	65
Şekil 4.19. 75 mM Tamoksifen konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	66
Şekil 4.20. 0,25 mM Tamoksifen konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör).....	67



Şekil 4.21. 75 mM kombine madde konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör).....	68
Şekil 4.22. 0,25 mM kombine madde konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör).....	69
Şekil 4.23. SVCT hücrelerinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör) .....	70
Şekil 4.24. MCF-7 Hücre hattı üzerinde Bassiatinin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin ile muamele edilmiştir. ....	71
Şekil 4.25. MCF-7 Hücre hattı üzerinde Tamoksifenin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan tamoksifen ile muamele edilmiştir. ....	71
Şekil 4.26. MCF-7 Hücre hattı üzerinde Kombine maddenin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan kombine madde ile muamele edilmiştir. ....	72
Şekil 4.27. SVCT Hücre hattı üzerinde Bassiatinin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin ile muamele edilmiştir. ....	72
Şekil 4.28. SVCT Hücre hattı üzerinde Tamoksifenin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan tamoksifen ile muamele edilmiştir. ....	73
Şekil 4.29. SVCT Hücre hattı üzerinde Kombine maddenin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan kombine madde ile muamele edilmiştir. ....	73
Şekil 4.30. MCF-7 Hücre hattı üzerinde 24 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması.....	74
Şekil 4.31. MCF-7 Hücre hattı üzerinde 48 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması.....	74
Şekil 4.32. MCF-7 Hücre hattı üzerinde 72 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.33. SVCT Hücre hattı üzerinde 24 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.34. SVCT Hücre hattı üzerinde 48 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması.....	76
Şekil 4.35. SVCT Hücre hattı üzerinde 72 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması.....	76
Şekil 4.36. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 24 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.....	77

Şekil 4.37. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 48 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.....	77
Şekil 4.38. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.....	78
Şekil 4.39. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 24 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.....	78
Şekil 4.40. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 48 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.....	79
Şekil 4.41. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0.25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.....	79
Şekil 4.42. Bassiatinin konsantrasyonlarına göre 24 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.43. Bassiatinin konsantrasyonlarına göre 48 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.44. Bassiatinin konsantrasyonlarına göre 72 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	81
Şekil 4.45. Tamoksifenin konsantrasyonlarına göre 24 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	81
Şekil 4.46. Tamoksifenin konsantrasyonlarına göre 48 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	82
Şekil 4.47. Tamoksifenin konsantrasyonlarına göre 72 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	82
Şekil 4.48. Kombine maddenin konsantrasyonlarına göre 24 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.49. Kombine maddenin konsantrasyonlarına göre 48 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.50. Kombine maddenin konsantrasyonlarına göre 72 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	84
Şekil 4.51. MCF-7 ve SVCT Hücre hatlarının 24 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması.....	84
Şekil 4.52. MCF-7 ve SVCT Hücre hatlarının 48 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması.....	85

Şekil 4.53. MCF-7 ve SVCT Hücre hatlarının 72 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması.....	85
Şekil 4.54. Bassiatinin üç farklı konsantrasyonuna göre 24 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	86
Şekil 4.55. Bassiatinin üç farklı konsantrasyonuna göre 48 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	86
Şekil 4.56. Bassiatinin üç farklı konsantrasyonuna göre 72 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	87
Şekil 4.57. Tamoksifenin üç farklı konsantrasyonuna göre 24 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	87
Şekil 4.58. Tamoksifenin üç farklı konsantrasyonuna göre 48 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	88
Şekil 4.59. Tamoksifenin üç farklı konsantrasyonuna göre 72 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması.....	88
Şekil 4.60. Kombine maddenin üç farklı konsantrasyonuna göre 24 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması....	89
Şekil 4.61. Kombine maddenin üç farklı konsantrasyonuna göre 48 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması....	89
Şekil 4.62. Kombine maddenin üç farklı konsantrasyonuna göre 72 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması....	90
Şekil 4.63. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin 24 saat inkübasyonu sonrası hücre döngüsünün değerlendirmesi.....	90
Şekil 4.64. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin 48 saat inkübasyonu sonrası hücre döngüsünün değerlendirmesi.....	91
Şekil 4.65. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin 24 saat inkübasyonu sonrası hücre döngüsünün değerlendirmesi.....	91
Şekil 4.66. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin 48 saat inkübasyonu sonrası hücre döngüsünün değerlendirmesi.....	92
Şekil 4.67. MCF-7 hücrelerinin bassiatin ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	92
Şekil 4.68. MCF-7 hücrelerinin tamoksifen ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	93
Şekil 4.69. MCF-7 hücrelerinin kombine madde ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	93
Şekil 4.70. MCF-7 kontrol hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı.....	94
Şekil 4.71. MCF-7 hücrelerinin bassiatin ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	94
Şekil 4.72. MCF-7 hücrelerinin tamoksifen ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	95

Şekil 4.73. MCF-7 hücrelerinin kombine madde ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	95
Şekil 4.74. MCF-7 kontrol hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı.....	96
Şekil 4.75. SVCT hücrelerinin bassiatin ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	96
Şekil 4.76. SVCT hücrelerinin tamoksifen ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	97
Şekil 4.77. SVCT hücrelerinin kombine madde ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	97
Şekil 4.78. SVCT kontrol hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı.....	98
Şekil 4.79. SVCT hücrelerinin bassiatin ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	98
Şekil 4.80. SVCT hücrelerinin tamoksifen ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	99
Şekil 4.81. SVCT hücrelerinin kombine madde ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı .....	99
Şekil 4.82. SVCT kontrol hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı.....	100
Şekil 4. 83. Bassiatin, Tamoksifen ve Kombine maddenin MCF-7 ve SVCT hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası ER alfa ile ilişkisinin karşılaştırılması.....	101
Şekil 4. 84. Bassiatin, Tamoksifen ve Kombine maddenin MCF-7 ve SVCT hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası EGFR ile ilişkisinin karşılaştırılması.....	101
Şekil 4. 85. Bassiatin, Tamoksifen ve Kombine maddenin MCF-7 ve SVCT hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası VEGFR ile ilişkisinin karşılaştırılması.....	102
Şekil 4.86. MCF-7 hücre hattı üzerinde bassiatin ile gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği.....	103
Şekil 4.87. MCF-7 hücre hattı üzerinde tamoksifen ile gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği.....	103
Şekil 4.88. MCF-7 hücre hattı üzerinde kombine madde ile gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği.....	104
Şekil 4.89. SVCT hücre hattı üzerinde bassiatin ile gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği.....	105
Şekil 4.90. SVCT hücre hattı üzerinde tamoksifen ile gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği.....	105
Şekil 4.91. SVCT hücre hattı üzerinde kombine madde ile gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği.....	106

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

atm	Atmosfer
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
$\text{Å}$	Angstrom
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta

### Kısaltmalar

Aİ	Aromataz İnhibitörleri
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12
DCIS	Duktal Karsinoma in situ
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EGFR	Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal bovine serum
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
HRT	Hormon Replasman Tedavisi
LCIS	Lobüler Karsinoma in situ
LHRH	Luteinizan Hormon Salgılatıcı Hormon
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OKS	Oral Kontraseptif
PI	Propidium İodide
ppm	Dakikadaki partikül sayısı

PR	Progesteron Reseptörü
rpm	Dakikadaki Dönüş Hızı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SERMs	Seçici Östrojen Reseptör Modülatör İlaçlar
UV	Ultraviyole
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
WHO	World Health Organisation

# 1. GİRİŞ

Son yıllarda artan kanser vakalarının tedavisine yönelik alternatif yöntemler geliştirilmekle birlikte, genel olarak radyoterapi, kemoterapi, hormonoterapi, immün terapi ve gen tedavileri gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde en çok tercih edilen kanser tedavi yöntemi ise kemoterapidir. Her ne kadar radyoterapi ile bölgesel kanser olgularının yok edilmesi hedeflense de, mutlaka kemoterapi veya hormonoterapi adı altında bazı maddelerin tamamlayıcı olarak kullanımı söz konusudur [1].

Meme kanseri, Türkiye’de ve dünyada kadınlarda en yaygın görülen ve aynı zamanda da en sık ölüme neden olan kanser türüdür. Bir kadın için, meme kanserine yakalanma riski %7.8 iken mortalitesi ise %2.3’ dür [2]. Bu nedenle, meme kanseri için erken tanı ve kanserin doğru yollarla etkin tedavisi çok önemli hale gelmiştir.

Funguslardan elde edilen ürünler günümüzde endüstriyel alandan sağlık sektörüne kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle funguslardan elde edilen maddeler ile mikrobiyal ve metabolik hastalıkların etkin tedavisi mümkün olduğundan bunlardan birçok hastalığın tedavisine ilişkin maddelerin üretilmesi için çalışılmaktadır.

Fungal bir ürün olan Bassiatin, bazı entomopatojen funguslar tarafından üretilen ve yeni keşfedilen bir madde olup, bugüne kadar çok az çalışmada kullanılmıştır. MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile yapılan çalışmada; bassiatinin anti-kanser etkisi olduğu belirtilse de meme kanserinin tedavisinde kullanılabilirliğine ilişkin yeterince çalışma yapılmamıştır [3]. Bu çalışmanın hipotezi; MCF-7 hücre hattı üzerinde antiöstrojenik etki gösterdiği tespit edilen bassiatinin, hem meme kanserine karşı kullanılan etkin ajanlara göre aktivitesini belirlemek hem de östrojen reseptörü dışında farklı reseptörleri ve farklı odakları etkileyerek meme kanseri hücre hatlarının inhibisyonunu sağladığını tespit etmektir.

Bu çalışmada, MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı ile SVCT normal meme epitel hücre hattında, bassiatinin sitotoksik özelliği, apoptozis durumu, hücre siklusu analizi ve bazı reseptörlerle (ER  $\alpha$ , EGFR, VEGFR ) olan ilişkileri araştırıldı. Ayrıca, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 meme kanseri hücre hatları ile yapılan sitotoksikite çalışmaları ile de reseptör özellikleri açısından bassiatinin etkinliği değerlendirildi. Böylece meme kanserinde yeni bir ürün ile tedavi yaklaşımlarının araştırılması planlandı. Araştırmaların doğru ilerlemesi için pozitif kontrol olarak, meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen etken maddesi seçildi. Bassiatin hem tek başına hem de tamoksifenle kombine edilerek kullanıldı.

Çalışmamızda, bassiatinin MCF-7 hücre hattında sitotoksik etkiye sahip olduğu SVCT hücre hattına ise toksik etki yapmadığı tespit edildi. Kombine maddenin sitotoksik etkiyi artırdığı saptandı. Hücre siklusu analizlerinde bassiatinin erken inkübasyon sürelerinde hücre döngüsünde G0/G1 ve G2/M fazlarında duraklamaya neden olduğu tespit edildi. Ancak apoptozu yeterince indüklemediği görüldü. ER  $\alpha$ , EGFR ve VEGFR üzerine maddelerin etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda, bassiatinin MCF-7 hücre hattında reseptörleri inhibe ettiği gözlemlendi. Bu durum SVCT hücre hattında gözlenmedi. Kontrol olarak kullanılan tamoksifenin, reseptörlere aynı şekilde etki ettiği gözlenmiş, ancak bassiatinin etkinliği daha fazla bulunmuştur.

Sonuç olarak bu bulgulara dayanarak, bassiatinin tamoksifenle kombine edildiğinde meme kanseri hücre hatları üzerinde etkin bir madde olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmanın ilerleyen zamanda meme kanseri olgusu bulunan insanlarda tedaviye yönelik bir madde olarak kullanılabileceği ve farklı çalışmalara destek sağlayacağı düşünülmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Yaygın tanımı "kontrolsüz hücre bölünmesi" olan kanser, çevresel olarak karşılaşılan kimyasal, fiziksel veya biyolojik etkenlere maruz kalınması nedeniyle ya da hücrede kendiliğinden ortaya çıkarak, normal hücrenin genetik materyalinin değişime uğraması sonucunda oluşan bir hastalıktır [4]. Tüm kanser hücrelerinde anormal büyüme ve kontrolsüz bölünme özelliği yanı sıra, çoğalan kanser hücrelerinin kan, lenf ya da vücut boşlukları yoluyla, primer lokasyonlarından vücudun diğer bölümlerine yayılma ve metastaz (istila etme) özelliği de bulunmaktadır. Normal hücreler; hormonlar, enzimler ve diğer uyarılar etkisinde, zamanında ve uygun bir şekilde ifade edilen genler tarafından denetlenerek büyür, bölünür, yaşlanır ve ölürlür. Fakat kanser hücrelerinde bu genler ya uygun olmayan şekillerde ifade edilir ya da mutasyona uğrarlar [5,6].

Kanser hücrelerinde gerek yapısal anomaliler ve değişiklikler gerekse işlevsel farklılıklar oluşmakta ve hücreler normalde yaptıkları işlevleri yapamaz duruma gelmektedir. Bazen de aksine yeni fonksiyonlar ve görevler üstlenmektedir [7]. Kan, lenf ve vücut boşlukları yoluyla yayılarak diğer doku ve organlara taşınan bu hücreler, kontakt inhibisyon yeteneğini kaybeder, birbirine yapışmaz, hücrelerden gelen sinyallere yanıt vermez, farklılaşmaz ve hücreyi gerektiğinde ölüme sürükleyen apoptoza uğramazlar [8].

Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşerek aşırı ifade edilmesi ve hücre döngüsü düzenleyicileri, hücrelerde mutasyonların ve tümör oluşumunun meydana gelmesinde rol oynayan faktörlerdir [9]. Hücrelerde sırasıyla G0 (Dinlenme fazı), G1, S, G2, M (Bölünme fazı) fazlarından oluşan bir hücresel döngü vardır. Bunun yanı sıra, hücre döngüsü sırasında hücrenin kontrol ettiği G1/S, G2/M ve M olmak üzere, üç farklı hasar kontrol noktası vardır. G1/S hasar kontrol noktasında hücre kendi yapısını takip eder ve DNA' sının hasar görüp görmediğine karar verir. Eğer hücre uygun boyut ve yapıya ulaşmamış veya DNA'sı hasarlı ise, hücre döngüsünde diğer aşamalara geçilmez ve koşullar düzelene kadar döngü durur. Eğer hücre ve DNA yapısı istenilen durumda ise, hücre G1/S kontrol noktasını geçer ve S fazına ilerler [10]. G2/M hasar kontrol noktasında ise genotoksik strese yanıt olarak hücre mitotik bölünmeye girmeden hemen önce G2 fazının durmasıyla oluşur [11]. Bu noktada oluşacak herhangi bir sıkıntı hücre döngüsünün durmasına ve hücre bölünmesinin engellenmesine neden olur. Döngüde rolü olan pek çok onkogen, transkripsiyon faktörü ve tümör baskılayan gen, G1 ve G2 hasar kontrol noktalarındaki hatalarla ilişkilidir [12].

Kanser hücrelerinde hücre büyümesi ve bölünmesi üzerindeki genetik kontrol kaybedilmekte ve çok hücreli bir yığın, benign olarak adlandırılan iyi huylu tümör oluşumu görülebilmektedir. Bu gibi durumlarda oluşan tümör yapısı çok tehlikeli olmayıp ameliyatla alındıktan sonra ciddi bir hasar görülmemektedir. Fakat tümör yapısında bulunan kanserli hücreler; bu yapıdan kurtulabilme, kan ve lenf dolaşımına girebilme, diğer dokulara yayılabilmeye ve yeni tümör oluşturabilme yeteneğine sahipse, malign olarak adlandırılan kötü huylu bir tümör oluşumu meydana gelmektedir. Malign tümör yapıları ise tehlikeli olup, tedavi süreci sıkıntılı ve zordur [10,13].

### **2.1.1. Kanser Patofizyolojisi ve Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler**

Hücreler bölünüp çoğaldığı ve ölüme sürüklendiği süre boyunca çevresel kaynaklı çeşitli kanserojenlere maruz kalabilmektedir. Bunlar biyolojik (virütik, bakteriyel, fungal ve paraziter ajanlar), fiziksel (iyonize radyasyon, UV ve diğer ışınlar) ve kimyasal (selenyum, anilin, asbest ve alkol) temelli kanserojenlerdir. Bu gibi kanserojenler hücrelerin DNA'sında bir dizi değişikliğe yol açmaktadır. Mutasyon olarak tanımlanan bu değişiklikler, birkaç baz çiftinde meydana gelebildiği gibi kromozom yapısında önemli ve geri dönüşmez değişiklikleri de içerebilmektedir [10].

Normal hücrelerin kanserli hücreye transformasyonu olarak bilinen karsinogenez, çok faktörlü ve birçok mekanizmanın rol oynadığı bir olay olmakla birlikte, bu dönüşüm mekanizmaları halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Karsinogeneze neden olan mekanizmalar arasında; nokta mutasyonları, insersiyon ve delesyonlar, translokasyonlar, gen amplifikasyonları, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin (antionkogen) inaktivasyonu gibi mekanizmalar yer almaktadır. Kanser oluşumuna etki eden faktörler varlığında, protoonkogenler ile antionkogenler arasında var olan dengenin bozulması, hücrelerdeki DNA dizilerinde baz değişikliklerine ve kansere engel olan proteinlerin sentezinin baskılanmasına sebep olmaktadır. DNA dizilerinde meydana gelen değişiklikler, protoonkogenlerin kansere neden olan onkogenlere dönüşmesine, normalde tümör oluşumunu engelleyen proteinleri üreten tümör baskılayıcı genlerin ise inaktive olmasına neden olmaktadır. Bu durum kanser gelişimiyle sonuçlanmaktadır [14].

Proto-onkogenler olarak bilinen normal hücre genlerinin dönüşümüyle oluşan onkogenler, hücrenin gerektiği durumlarda çoğalması için gereken genler olup hücreyi sürekli bölünmeye yönlendirmektedir. Bu genler, tümör hücrelerinde sıklıkla mutasyona uğramakta veya yüksek oranlarda ifade edilmektedir [15]. Proto-onkogenlere örnek olarak RAS, MYC, TRK ve ERK genleri verilebilir [16]. Onkogenler tarafından kodlanarak oluşan ve

tümörojenik hücre büyümesi ile bağlantısı olan proteinler ise onkoproteinler olarak bilinmektedir [17]. Büyüme faktörleri, reseptör tirozin kinazlar, sitoplazmik tirozin ve serin/treonin kinazlar, düzenleyici GTPazlar, hücre döngüsü proteinleri ve transkripsiyon faktörleri; onkoproteinlerdir [18]. Bunlardan transkripsiyon faktörleri MYC geni tarafından sıklıkla kodlanmaktadır. Kromozom translokasyonu ile kromozomun bir bölgesi koparak, yer değiştiren bir arttırıcı (enhancer) sekansın yanlılıkla MYC geni etrafına yerleşmesiyle sürekli uyarılan gen bölgesi tarafından, transkripsiyon faktörleri aşırı miktarda üretilir. Bu durum hücre proliferasyonunu sürekli indükler ve Burkitt's lenfoma, meme kanseri, pankreas kanseri, retinoblastoma ve küçük hücreli akciğer kanserine neden olur [19].

Tümör baskılayıcı genler ise, hücrelerin aşırı çoğalmasını önlemek için onkogenleri dengede tutan genlerdir. Onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genler genellikle "çift vuruş (two-hit) hipotezini" izler. Belirli bir proteini kodlayan her iki alel de bir etki ortaya çıkmadan önce etkilenmiş olmalıdır. Eğer gen için sadece bir alel zarar görmüşse, ikincisi hala doğru proteini üretebilir. Başka bir deyişle, mutant tümör baskılayıcı alelleri genellikle resesif, mutant onkogen alelleri ise tipik olarak dominanttır [14]. Tümör baskılayıcı genler arasında TP53 (p53), Rb (Retinoblastoma), p16, p21, APC, ST14 ve ING gibi antionkogenler bulunmaktadır [20,21]. Bulunan ilk tümör baskılayıcı proteini, insan retinoblastomundaki Retinoblastoma proteini (pRb) idi; Ancak, yapılan son çalışmalar pRb'nin bir tümör sağkalım faktörü olduğunu da işaret etmiştir [22]. Tümör baskılayıcı genler arasında en çok çalışılan ve farklı işlevleri keşfedilen p53 geni ise insanların 17. kromozomunda yer almaktadır. Bu genin ifade ettiği protein, genomda mutasyon olmasını önler ve genomun stabil kalmasını sağlar [23]. p53 proteininin işlevsel olabilmesi için tetramer bağ yapısı halinde bulunması gerekir [24]. Normalde DNA hasarı ile aktifleşen p53 geni, hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak; ya DNA tamir proteinlerini harekete geçirir ya da DNA tamir edilemeyecek boyutta hasara uğramışsa, apoptozu başlatır [25]. p53 tümör baskılayıcı proteini ve onun işlevleriyle bağlantılı gen şebekesinde olası bir bozukluk durumunda p53 geninde işlev kaybı olur ve bu durum tümörojenik hücrelerin baskılanmasını ortadan kaldırır [26]. Zaten kanser olgusu bulunan kişilerde en sık mutasyonu görülen protein p53 proteindir. Meme kanseri gibi çeşitli vakalarda p53 geninde nokta mutasyonlar veya alel kaybı olduğu görülmüştür [27].

Gerek onkogenlerin bir mutasyon sonucu aşırı şekilde ifade edilmesi, gerekse tümör baskılayıcı genlerin mutasyon sonucu işlevlerini yitirmesi ile hücre çoğalma kontrolünün

yitirilmesi ve durdurulamaması sonucunda, kanser gelişimi meydana gelmektedir [14]. Kanser oluşumuna neden olan mutasyonların etkeni olarak pek çok faktörün rol oynadığı bilinmektedir. Kanserin başlıca nedeni olarak %90-95 oranında çevresel faktörler gösteriliyorsa da, %5-10 oranında genetik faktörlerin de rol aldığı bilinmektedir [28]. Birçok kanser türünün nedeninin kanıtlanması genelde mümkün değildir. Çünkü çeşitli nedenler için spesifik bir ipucu yoktur. Örneğin, tütün kullanan bir kişi akciğer kanseri geliştirirse muhtemelen tütün kullanımından kaynaklanmaktadır. Ancak hava kirliliği veya radyasyon sonucunda akciğer kanseri olma olasılığı da bulunmaktadır. Gebeliklerde ve organ transplantasyonlarında ortaya çıkan nadir aktarımlar hariç, kanser genellikle bulaşıcı bir hastalık değildir [29].

#### **2.1.1.1. Çevresel Faktörler**

Kanser araştırmacıları tarafından kullanılan çevresel terimi, genetiğe bağlı kalıtsal bir durum olmayan, sadece kirliliği değil yaşam tarzı, ekonomik ve davranışsal faktörler gibi herhangi bir nedeni ifade etmektedir [30]. Kanser nedenli ölümlere katkıda bulunan yaygın çevresel faktörler arasında tütün kullanımı, diyet/obezite, enfeksiyonlar, radyasyon, stres, fiziksel aktivite eksikliği ve çevresel kirlenmeler bulunmaktadır [28].

Belirli süre maruz kalınması durumunda bazı kanser türleriyle ilişkilendirilen maddelere kimyasal karsinojenler denmektedir. İçerisinde birçok kimyasal karsinojen bulunduran sigaranın dumanı, akciğer kanseri vakalarının %90'ından sorumlu tutulmaktadır [31]. Ayrıca, ağız boşluğu, gırtlak, baş, boyun, karın, mesane, böbrek, özofagus ve pankreasta da kansere neden olduğu bilinmektedir [7,32]. Tütün dumanı nitrozaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar da dahil olmak üzere ellinin üzerinden bilinen karsinojenleri içerir [33]. Dünya genelinde tütün kullanımından dolayı yılda yaklaşık 6 milyon kişi ölürken, ülkemizde ölümlerin % 23'ü tütüne bağlı hastalıklar nedeniyle olmaktadır [34]. Uzun süreli ve yoğun alkol tüketiminin insan sağlığına çok farklı yönlerde zararlı olduğu bilinmekte ve farklı kanser türlerine yol açarak, kansere bağlı ölümlerin önemli bir nedeni olarak da değerlendirilmektedir [35]. Aşırı alkol tüketiminin ağız, yutak, özofagus ve karaciğer kanserleri riskini arttırdığı tespit edilmiştir [7]. Mesleki çalışma alanları nedeniyle asbest, katran ve kömürün yanma ürünleri, benzen, vinil klorür, naftilaminler, selenyum ve krom gibi maddelere maruz kalan insanlarda kanser oluşumu görülebilmektedir. İşle ilgili madde maruziyetinden kaynaklanan kanser olguları, tüm kanser vakalarının % 2-20 kadarını

oluşturmaktadır [36]. Özellikle asbeste maruz kalan insanlarda akciğer zarının (plevra) malign tümörü olan mezotelyoma görülmektedir [34].

Diyet, obezite ve fiziksel aktivite eksikliği, kansere bağlı ölümlerin %30-35'i ile bağlantılıdır [37]. Diyet ve obezite kansere neden olmasının haricinde kanser tedavisine karşı verilen yanıtın azalmasına da yol açmaktadır [38,39]. Sindirim sistemi kanserleri kişinin diyeti ile ilişkili olduğundan beslenme alışkanlıklarının gözden geçirilmesi durumunda obezite ile mücadele edilerek kanser vakalarında düşüş gözlenecektir. Düşük yağlı ve yüksek lifli gıdaların temelinde oluşturulacak diyet doğrultusunda kolon, endometriyum, postmenopozal meme kanseri, böbrek, özefagus, pankreas, safra kesesi, karaciğer ve hematolojik kanser olgularının azalacağı düşünülmektedir [40]. Ayrıca, fiziksel hareketsizliğin yalnızca vücut ağırlığına değil, bağışıklık sistemi ve endokrin sistemi üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle, kanser riskini arttırdığı düşünülmektedir. Bu nedenle düzenli egzersiz yapma alışkanlığı edinilmesi gerekmektedir [37].

Enfeksiyonlar, %18 oranında kansere bağlı ölümlere neden olmaktadır. Bu oran gelişmemiş ülkelerde %25'lere kadar çıkarken gelişmiş ülkelerde %10'lara düşmektedir [28]. Yaygın enfeksiyon ajanı olarak virüsler görülse de bazı bakteri, fungus ve parazitlerin de kanser vakaları ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. İnsanlarda papillomavirüsün serviks kanserine, Epstein-Barr virüsünün Burkitt's lenfomaya, Hepatit B ve Hepatit C virüslerinin ise karaciğer kanserine yol açtığı gösterilmiştir [41]. *Helicobacter pylori*, mide kanseri riskini artırdığı bilinen bakteriyel enfeksiyon kaynağıdır [42]. Kansere bağlı paraziter enfeksiyonlar arasında *Schistosoma haematobium* (mesanenin skuamoz hücreli karsinoması) ve karaciğer kelebekleri *Opisthorchis viverrini* ve *Clonorchis sinensis* (kolanjiyokarsinoma) sayılabilir [43].

İyonize radyasyon ve ultraviyole ışınlar, invaziv (istilacı) kanser vakalarının %10'undan sorumludur [37]. İnvaziv olmayan kanser vakalarında da çoğunlukla güneşten gelen ultraviyole ışınlar neden olmaktadır. Açık tenli insanlar, uzun süreli açık havada çalışanlar ve herhangi bir koruyucu kullanmadan güneş ışığına maruz kalanlarda deri kanserleri ultraviyole ışınlar nedeniyle daha sık görülmektedir. İyonize radyasyonun deri kanseri dışında, lösemi gibi çeşitli kanser vakalarına yol açtığı bildirilmektedir [7]. İyonize radyasyon, sigara gibi diğer kansere neden olan ajanlar ile beraber etki ettiğinde daha güçlü bir kanser kaynağı haline gelmektedir [44]. Bunun yanı sıra, cep telefonları, elektrik iletim cihazları ve diğer benzer kaynaklardan gelen iyonize olmayan radyo frekans radyasyonu,

Dünya Sağlık Örgütünün Uluslararası Kanser Araştırması Ajansı tarafından muhtemel bir kanserojen olarak tanımlanmıştır [45].

### **2.1.1.2. Kalıtsal Faktörler**

Kanserlerin büyük çoğunluğu kalıtsal değildir. Kalıtsal kanserler öncelikle kalıtsal bir genetik defektten kaynaklanmaktadır. Dünya nüfusunun % 0.3'ünden azı, kanser riski üzerinde büyük bir etkiye sahip olan ve % 3-10'undan daha az kansere neden olan bir genetik mutasyon taşıyıcısıdır. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde olabilen bazı kalıtsal mutasyonlar meme kanseri ve yumurtalık kanseri riskini % 75'e kadar çıkarmaktadır [46]. Kolorektal kanser vakası bulunan kişilerin yaklaşık % 3'ü Kalıtsal nonpolifozisli kolorektal kanserine (HNPCC veya Lynch sendromu) sahiptir [47]. Genellikle çocuklarda görülen retinoblastom olarak bilinen göz kanseri olgusu gibi bazı kanser türlerinde de, kalıtsal geçiş söz konusudur [7].

Gerek çevresel gerekse genetik temelli faktörler değerlendirildiği zaman, kanserin tek bir nedene değil birçok sebebe bağlı olarak gelişen bir hastalık olduğu görülmektedir. Bu durumun yaşanılan bölge, sosyoekonomik koşul, cinsiyet ve mesleki çalışma alanlarına göre değişkenlik gösterdiği de bildirilmektedir [34,48]. Her ne sebeple olursa olsun dünya genelinde milyonlarca insan kanser türlerinden birine yakalanmaktadır. Dünya genelinde ölümlerin yaklaşık% 13'ünün kanser temelli olduğu tespit edilmiştir [45]. Kanser nedeniyle olan ölümler içerisinde en yaygın görülen akciğer kanseri (1.4 milyon ölüm), mide kanseri (740.000 ölüm), karaciğer kanseri (700.000 ölüm), kolorektal kanser (610.000 ölüm) ve meme kanseridir (460.000 ölüm) [45].

## **2.2. Meme Kanseri**

Dünya çapında kadınlarda en yaygın görülen invaziv kanser türü meme kanseridir ve dünya genelinde kadınların yaklaşık %12'si bu hastalıktan etkilenmektedir [49]. Meme kanseri, kadınlarda invaziv kanserlerin % 22,9'unu, tüm kadın kanserlerinin % 16'sını oluşturmaktadır. 2012 yılında kadınlarda teşhis edilen kanserlerin % 25,2'sini oluşturduğu ve 0.5 milyon kişinin meme kanseri nedeniyle öldüğü tespit edilmiştir. Bu durum meme kanserini en yaygın kadın kanseri haline getirmiştir [45]. Hayat boyunca her 10 kadından birinin meme kanserine yakalanma olasılığı ve meme kanserine yakalanan her 3 kadından birinin ise meme kanseri yüzünden hayatını kaybetme riskinin olduğu düşünülmektedir [50]. Dünya genelinde en yaygın görülen kanser türü akciğer kanseri olsa da 2012 yılı Dünya

Sağlık Örgütüne bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının raporunda %12.8 ile kadınlarda ikinci en yaygın görülen kanser olarak belirtilmiştir [45].

İnsanlarda meme kanserinin görülme sıklığı ve ölüm oranı; yaşanılan bölgeye, sosyoekonomik ve kültürel duruma, etnik kökene ve ırka bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Dünya genelinde 100.000 kadın ile yapılan yaş-ayarlı meme kanseri insidans oranları incelendiğinde; meme kanseri görülme sıklığı, Doğu Asya ile Sahra altı Afrika gibi daha az gelişmiş ülkelerde en düşük, Batı Avrupa ve Kuzey Amerika gibi daha gelişmiş ülkelerde ise en yüksek olduğu bulunmuştur. Rapora göre, meme kanserinin dünyada ortalama insidansı 100.000 kadında 38-40 iken, Avrupa'da bu oran 66-67, ülkemizde ise ortalama 45 civarındadır. Gelişmiş ülkelerdeki modern ve batılı yaşam tarzının bu artışta etkili olduğu düşünülmektedir [45]. Buna karşın, 1990'lı yılların başından bu yana mortalite oranları bilimsel olarak gelişmiş ülkelerde düşüş göstermiştir; bu da ileri düzeyde kanseri belirleme ve erken tanı (nüfusa dayalı tarama yoluyla) ile daha etkili tedavi rejimlerinin kombinasyonunun bir sonucudur [51].

Ülkemiz kadınlarında da en yaygın görülen ve en çok ölüme neden olan kanser türü meme kanseridir. Ülkemizde kanser vakalarına yönelik düzenli kayıt ve geri bildirim olmamasının yanı sıra maliyetli bir program olduğundan ulusal veri tabanı oluşturma açısından güçlük çekilmektedir. 1991-1999 yılları arasında Türkiye'de kadınlarda bildirilen meme kanseri durumları incelendiğinde tüm kanserler arasında ortalama %24'ünü oluşturduğu bulunmuştur. 1999 yılında Türkiye'de kadınlarda görülen ölümlerin %13,7'sinin meme kanseri yüzünden olduğu belirtilmiştir. 2013 yılında Türkiye'de her 4 kanserli kadın hastasından birinin meme kanseri olduğu, geçmiş yıllara göre meme kanseri insidansının arttığı ve bir yıl içinde toplam 17.531 kadına meme kanseri teşhisi konduğu belirtilmiştir [34].

### **2.2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri**

Meme kanseri olan kadınların % 66'sında bilinen hiçbir risk faktörünün bulunmadığı saptanmıştır [52]. Öte yandan birçok risk faktörünün de meme kanserini tetiklediği bulunmuştur. Meme kanserinin etiyojisi; nulliparite (doğum yapmama), 30 yaşından sonra ilk doğum ve hormonal öykü gibi endokrin ve üreme faktörlerini, alkollü içki tüketimi, oral kontraseptiflerin kullanımı, menopoz (hormon replasmanı) tedavisi ve iyonize radyasyona maruz kalma gibi çevresel faktörleri, yüksek kalorili diyetler ve egzersiz eksikliği gibi yaşam

tarzı faktörlerini içeren birçok etkene dayanmaktadır. Ayrıca, aile geçmişi ve bazı genetik özellikler de meme kanseri risk faktörü olarak görülmektedir [45].

### **2.2.1.1. Genel Faktörler**

Meme kanseri için birincil risk faktörleri kadın olmak ve yaşlılıktır. Her ne kadar erkeklerde meme kanseri görülse de kadınlarda meme kanseri insidansı ve mortalitesi ilk sırada yer almaktadır [53]. Meme kanserinin yaklaşık % 1'i erkeklerde görülmektedir. Erkeklerde görülme nedeni ise genelde aile hikayesinde meme kanseri bulunan kadınların olmasıdır [54].

Meme kanserinin görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Hastaların % 75'ine menopoz sonrası (postmenopozal) dönemde kanser tanısı konmaktadır. Meme kanseri oluşma riski, 25 yaşında 1/19608, 55 yaşında 1/33, 75 yaşında 1/11, 80 yaşında 1/8'dir [55]. Ancak akciğer kanseri ile karşılaştırıldığı zaman genç yaşta görülme sıklığı nispeten daha yüksektir [56].

Meme kanseri insidansının yaşanılan coğrafik bölgeye göre değiştiği bilinmektedir. Uzakdoğu ile Avrupa ülkeleri arasında meme kanseri görülme sıklığı birbirinden farklıdır. Meme kanseri Avrupa kökenli kadınlarda Afrika ve Asya kökenli kadınlara göre daha sıklıkla görülmektedir. Ancak küreselleşen dünyada birçok insanın göç ederek farklı ülkelere yerleşmesi bu farkın azalmasına neden olmuştur [56].

Özellikle menopoz süreci öncesi bir kadında meme kanseri teşhis ve tedavisi yapıldıysa ileride diğer meme dokusunda da görülme olasılığı artmaktadır. Daha önce meme kanseri geçiren ve tedavi alan kadınlarda meme kanseri gelişme olasılığının, meme kanseri teşhisi konulmamış olanlara göre, 3-4 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir [57].

Bazı kadınlarda memenin benign hastalıkları meme kanseri gelişme olasılığını artırmaktadır. Meme dokusunda normal hücrelere nazaran normal olmayan hücrelerin varlığı dokunun bozulmasına neden olmaktadır. Bazı normal olmayan hücre tiplerinin varlığı [Atipik hiperplazi, LCIS (Lobüler Karsinoma in situ)] meme kanseri riskini artırmaktadır. Atipik hiperplazili memeye sahip kadınlarda meme kanseri oluşma riski dört ile beş kat daha fazladır [58]. LCIS ise invaziv meme kanseri oluşumu için %30'luk bir risk oluşturmaktadır [59].

### **2.2.1.2. Endokrin ve Üreme Faktörleri**

Kadınlarda meme kanserinin yaygın şekilde görülmesinin nedenlerinden biri de kadınların hormonal durumu ve hayatları boyunca değişiklik gösteren üreme yapılarıdır. Doğurganlık



özelliğini kullanmayarak hiç çocuk sahibi olmayan veya ilk doğumlarını geç yaşta yapan kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir [60,61]. Doğurmayan veya ilk doğumunu 30 yaşından sonra yapanlar kadınlarda, ilk gebeliği 20 yaşından önce olanlara göre risk 2-3 kez daha fazladır. 35 yaşından sonra ilk doğumunu yapan kadınların ise en çok riske sahip olduğu bildirilmiştir [62].

Menstruasyon öyküsü de meme kanseri oluşumu üzerinde etkilidir. Erken menarş olarak bilinen 12 yaşından önce ilk adet görülmeleri ve 55 yaşından sonra görülen geç menopoza süreci kadınlarda meme kanseri riskini artırmaktadır [63,64]. Erken yaşta başlayan menstrual döngü, üreme sisteminin uzun süre östrojene maruz kalmasına neden olmaktadır. Bu durumdan dolayı erken menarşın meme kanseri riskini arttırdığı düşünülmektedir [65]. Geç yaşta menopoza geçiren kadınlarda erken menopoza giren kadınlara göre iki kat meme kanseri gelişme riski olduğu düşünülmektedir [63].

Her ne kadar emzirme ile meme kanseri arasında kesin bir ilişki bulunmasa da bazı çalışmalar emzirmeyen kadınlarda meme kanseri riskinin arttığını belirtmektedir [66]. 30 ülkeden 47 epidemiyolojik çalışmanın derlenmesiyle oluşan çalışmada emziren kadınlarda meme kanseri görülme oranının daha düşük olduğu tespit edilmiştir [67].

Üreme sistemi ile bağlantılı hormonların fazla ya da eksik salgılanması, bu hormonları salgılayan yapılardaki bozukluklar ve hormonal dengesizlikler kadınlarda birçok farklı hastalığa neden olabilmektedir. Buna benzer rahatsızlık geçiren kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı, hormonal bozukluk ile ilgili geçmişi olmayan kadınlara göre daha fazladır [68]. Ayrıca, önemli bir hormonal rahatsızlık olan Diabetes mellitus (Şeker hastalığı)'un varlığının da meme kanseri oluşma riskini artırabileceği değerlendirilmektedir [69]. Lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıklara sahip kadınların meme kanseri olma riski de artmaktadır [70].

### **2.2.1.3. Çevresel Faktörler**

Meme kanseri oluşmasını tetikleyen çevresel faktörlerin ilki yoğun alkol tüketimidir. Sık ve çok alkol tüketen kadınlarda meme kanseri insidansı artmaktadır [71,72]. Kuper ve arkadaşlarının [73] yaptığı bir çalışmada, yüksek oranda alkol tüketiminin meme kanseri riskini %15 artırabileceği değerlendirilmiştir. Ancak alkol ile meme kanseri bağlantısının kesin olmadığı ve bu bağlantıda diğer faktörlerin de etkili olabileceği düşünülmektedir [56].

Sigara kullanımının, birçok hastalığın yanı sıra meme kanseri için de bir risk oluşturabileceği değerlendirilmektedir. Hatta uzun süreli sigara kullanımında bu riskin %35 oranında artabileceği belirtilmiştir [74,75]. Ancak sigara tüketiminin meme kanseri oluşumunda önemli bir etkisi olduğu düşünülmemektedir [76].

Meme kanserinde en iyi saptanan risk faktörü uzun süre radyasyona maruz kalınmasıdır [58]. Gerek mesleki koşullar nedeniyle gerekse savaş koşullarında iyonize radyasyona maruz kalmış kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı gözlenmiş ve ilerleyen yaşlarda radyasyona maruz kalınmasının meme kanserine tutulma olasılığını daha da yükselttiği belirtilmiştir [56,77,78]. Her ne kadar meme kanserinin erken teşhisi için belirli aralıklarla kadınların yaptırdığı ve birçok ülkede önemli kanser tarama yöntemi olan mamografi, az doz da olsa radyasyon yaymakta ve sürekli mamografik incelemeler nedeniyle kümülatif etki yaparak kansere neden olabilmektedir [79]. Radyasyon dışında organoklorin ve organofosfat gibi pestisitlere ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar, bifeniller ve organik çözücüler gibi kimyasallara maruz kalma durumu da meme kanseri oluşumunu tetikleyen etkenlerdendir [80,81].

Uzun süreli oral kontraseptif (OKS, gebelik önleyici ilaç) kullanımı ve menopoza giren kadınlarda hormon replasman tedavisi (HRT), meme kanseri risk faktörleri olarak değerlendirilmektedir [82,83]. Hormonal doğum kontrol yöntemi olan OKS kullanım süresi ile meme kanseri gelişme olasılığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamasına rağmen bazı çalışmalarda 45 yaş altı kadınlarda uzun süreli OKS alımının menopoz öncesi (premenopozal) meme kanseri gelişme riskinde önemli bir artışa neden olduğu belirtilmiştir [82,84,85]. Ancak meme kanserine genetik yatkınlığı olan veya aile geçmişinde meme kanseri olan kişilerde OKS kullanımının meme kanseri riskini arttırdığı görülmemiştir [86,87]. Menopoza girmiş kadınlarda HRT riski, hastanın durumu ve kullanılan ilaçlara göre değişmektedir. Östrojen desteği sağlayan ilaçların tek başına ve kısa süreli kullanımının risk yaratmadığı görülmüştür. Uzun süreli östrojen kullanımı ise riski artırmakta ve kombine halde östrojen-progesteron bulunan ilaçların kullanımı meme kanseri gelişme olasılığını yükseltmektedir [83]. Ayrıca, yapılan çalışmalarda hormon tedavisinin duktalden daha çok lobüler ve tübüler kanserde risk artışına sebep olduğu belirtilmiştir [88].

#### **2.2.1.4. Hayat Tarzına Bağlı Faktörler**

Çevresel ve genetiğe bağlı faktörlerin meme kanseri etkeni olarak görülmesinin yanı sıra yaşam tercihlerimizin de meme kanserini tetiklediği bilinmektedir. Beslenme sırasında

yaptığımız seçimler sadece meme kanserinin değil birçok hastalığın etkeni olabilmektedir. Yağ miktarı yüksek olan gıdalarla beslenme eğilimi meme kanseri oluşumunu tetiklemekte ve diyetteki hayvansal temelli yağların % 10'dan fazla olması halinde meme kanseri riski artmaktadır. Buna karşın yağ miktarı düşük ve lifçe zengin gıdalarla beslenme şekli bağırsaktan östrojenin emilimini önleyerek meme kanseri oluşumunu engellemektedir [89,90]. Ancak genel kanı küçük yaşlarda diyetin meme kanseri oluşumunda risk teşkil edebileceği, ilerleyen yaşlarda beslenme şeklinin değişiminin önleyici olmadığı yönündedir [58]. Ayrıca, beslenme sırasında yetersiz iyot alımının da meme kanseri gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir [91].

Kadınlarda fazla kilo ve obezite özellikle postmenopozal dönemde olduğu zaman meme kanser riskini artırmaktadır [92]. Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) 72.000 kadınla yaptığı araştırmada, menopoz sonrası kilo alan kadınların, 20'li yaşlarda kilo alan kadınlara göre meme kanseri gelişim riskinin iki kat arttığı gösterilmiştir [93]. Bunun dışında obeziteye bağlı yüksek kolesterol seviyesinin de meme kanserini tetiklediği düşünülmektedir [94].

Fiziksel aktivite eksikliği ve durgun hayat tarzı meme kanseri risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Fiziksel aktivite eksikliğinin tüm olguların %10'unda etkili olduğu bilinmektedir [95]. Hatta mesleki veya yaşam tarzına bağlı olarak uzun süre oturan ve hareketsiz kalan kişilerde meme kanserine bağlı mortalite yüksektir [96]. Yapılan çalışmalar fiziksel aktivitenin insan vücudunda biyolojik mekanizmalarla ilişkisini anlama yönünde sürdürülmüş ve postmenopozal, inaktif ve sağlıklı kadınlar üzerinde metabolik yollar değerlendirildiğinde düzenli egzersizin, meme kanseri riskini artırmada bağımsız olarak etkisi bulunan endojen östrojen, adipozite, insülin direnci, leptin ve inflamasyonu azalttığı tespit edilmiştir [97].

#### **2.2.1.5. Genetik Faktörler**

Değişmeyen risk faktörleri olarak da değerlendirilen genetik faktörler, meme kanserine genetik yatkınlık ve aile geçmişi gibi genler tarafından yönlendirilen risk unsurlarıdır. Meme kanseri vakalarının %5-10'u kalıtsal nedenli ailesel meme kanserlerini kapsamaktadır [98]. 50 yaşından önce meme kanseri olan kız kardeş, anne ve kız gibi birinci derece akrabası olan kadınlarda meme kanseri gelişme riski aile geçmişinde meme kanseri olmayan kadınlara göre iki kat fazladır [99]. Eğer daha erken yaşta veya menopoz öncesinde meme kanserine yakalanan yakın akraba varsa o zaman meme kanserine yakalanma riski daha da artmaktadır [56]. Ailesel geçmişi olan kadınların çoğunda 17. kromozoma yerleşmiş olan BRCA1 ve 13.

kromozoma yerleşmiş olan BRCA2 genlerindeki mutasyonlar sıklıkla rapor edilmiştir [62,100]. Bu genlerin boyutu büyük olduğundan herhangi bir pozisyonda oluşacak mutasyonlar meme kanseri riski oluşturabilmektedir. Kalıtsal aktarım ile aileden genetik yatkınlığın olabildiği gibi diğer faktörlerin etkisiyle bu genlerde mutasyonlar görülebilmektedir [101].

BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki değişiklikler, germ hücre soyu mutasyonları ile kalıtılmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlara sahip kadınların hayatlarının bir döneminde meme kanseri gelişme riski %50-80 arasında değişmektedir [98]. Bu genler dışında diğer önemli mutasyonlar ATM, p53 (Li-Fraumeni sendromu), PTEN (Cowden sendromu), STK11 (Peutz-Jeghers sendromu), CHEK2, PALB2 ve BRIP1 genlerinde görülebilir ve bu mutasyonlar kalıtsal meme kanserine yol açabilir [102,103]. Normalde tümör baskılayıcı genler olarak görev yapmalarına karşın mutasyon sonucu meme kanseri oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Ancak erken ortaya çıkan meme kanseri vakalarının ailesel geçmişe bağlı olanlarının çoğunda BRCA1 ve BRCA2 genleri önem taşımaktadır [62,100].

### **2.2.2. Meme Kanserinin Semptomları**

Meme kanserinde genellikle ilk fark edilen semptom, meme dokusundan farklı olarak hissedilen bir yumrunun varlığıdır. Meme kanserine yakalanan kadınların birçoğu kendilerinde bu yumruyu hissederek kanser tanısına katkı koymaktadır [104,105]. Fakat yumru oluşumu olmadan farklı belirtiler görülebilmektedir. Bu belirtiler; meme dokusunun kalınlaşması, bir memenin diğerine göre boyutunun farklılaşması, meme ucundaki değişiklikler, meme derisinde ve meme ucunda çukurlaşma, meme derisinin tahriş olmuş görüntüsü, meme ucundan sıvı sekresyonu, meme ve koltukaltında sürekli ağrı ve koltukaltında şişmedir [106]. Ağrı kesin bir belirti olmasa da göz ardı edilmemesi gereken bir durumdur [107].

İnflamatuar meme kanseri, meme kanserinin özel bir türüdür ve farklı semptomlar göstermektedir. Meme inflamasyonu en önemli belirteci olup ağrı, kaşıntı, şişme, meme ucunun dönmesi, yanma, kızarıklık ve derinin portakal kabuğu görüntüsünü alması gibi belirtilerle de desteklenmektedir [104,105]. Meme dokusunda herhangi bir yumrunun bulunmaması nedeniyle bazı zamanlarda geç teşhis edilebilmektedir.

Meme kanserinin farklı semptomlara sahip diğer türü, memede Paget hastalığıdır. Bu sendrom meme ucunun dönmesi, egzama benzeri deri değişimleri, meme ucunun solması veya hafif pullanması ile karakterizedir. Bunun yanı sıra yanma, kızarıklık, kaşıntı ve meme

ucundan sıvı sekresyonu gibi semptomlar da görülebilir. Paget hastalığı olan kadınların bazılarında meme dokusunda yumru da görülmüştür [108].

Meme kanserinin farklı odaklara giderek metastaz yapması durumunda ise gittiği yere göre belirtiler göstermektedir. Metastazın genel olarak gerçekleştiği yapılar kemik, akciğer, karaciğer ve beyin olduğundan kemik ve eklem ağrıları, ateş, açıklanamayan kilo kaybı, yorgunluk, nefes darlığı, dalgınlık ve iştahsızlık gibi belirtiler metastazik meme kanserinin belirteci olabilmektedir [109]. Fakat bu belirtiler diğer metastazik kanser türlerinde de görülebildiği gibi birçok hastalığın göstergesi de olabilmektedir [110].

### **2.2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması**

Meme kanseri tek tip bir hastalık değildir ve hem klinik hem de morfolojik olarak heterojendir. Mevcut WHO Meme Tümörleri Sınıflandırılması yayınında [111], 20'den fazla farklı alt türü tanımlanmaktadır.

Çoğu meme kanseri türü epitel hücrelerinden köken alarak karsinomaya dönüşmektedir. Bu tümörler in situ ve invaziv lezyonlara bölünmektedir. İn situ karsinomalar, malignant epitel hücrelerinin memenin duktal/lobüler yapısına hapsedildiği preinvaziv lezyonlardır ve kanalları ve lobülleri çevreleyen bazal membran, kanser hücreleri tarafından penetrasyona uğramadığı sürece bozulmamıştır. Preinvazif lezyonlar Duktal Karsinoma İn Situ (DCIS) ve Lobüler Karsinoma İn Situ (LCIS) olmak üzere iki alt bölüme ayrılır. Süt bezlerinde oluşan kanser LCIS, süt kanallarında oluşan kanser ise DCIS olarak adlandırılır. DCIS ve LCIS arasındaki ayırım, sadece mikroskopik kökenli bölgelerin (kanallar ve lobüller) değil, hücrelerin mimari ve sitolojik özelliklerinin bir farklılığının sonucudur. DCIS ve LCIS, aynı zamanda hastalığın ilerleyişi ile ilgili riskler konusunda meme içindeki dağılımlarında da farklılık göstermektedir [112].

"Özel olmayan tip" olarak tanımlanan ve invaziv duktal karsinoma olarak da bilinen invaziv karsinoma, invaziv meme kanserinin en geniş alt grubunu oluşturmaktadır. Bu adlandırma, "özel alt tipleri" karakterize eden belirli morfolojik özellikler ile kolayca sınıflandırılmayan tümörleri içeren heterojen bir grubu tanımlamaktadır. Özel alt tiplerin en bilinenleri; lobüler karsinoma, tübüler karsinoma, müsinöz karsinoma, medüller ve apokrin özellikli karsinoma, mikro papiller ve papiller karsinomalar ve metaplastik karsinomalar.

Meme kanserinin sınıflandırılmasında derecelendirme sistemi kullanılmaktadır. Derecelendirme, meme kanseri hücrelerinin görünümünü normal meme dokusunun görünümüyle karşılaştırır. Göğüs gibi bir organdaki normal hücreler farklılaşmakta ve bu

organın bir parçası olarak işlevlerini yansıtan belirli şekil ve formları almaktadır. Kanserli hücreler bu farklılaşmayı kaybederler. Kanserde normal olarak süt kanallarını oluşturmak için düzgün bir şekilde hizalanacak hücreler dağınık hale gelir. Hücre bölünmesi kontrolsüz hale gelir. Hücre çekirdeği daha az üniform hale gelir. Mevcut derecelendirme sistemi tümörün üç parametresini değerlendirir: (i) mimari farklılaşma derecesi (tübül oluşumu), (ii) nükleer pleomorfizm (nükleer derece) ve (iii) proliferasyon (mitotik sayım / indeks). Bu parametreler kullanılarak derecelendirme yapılmaktadır. Derecelendirme sisteminde; Grad 1, iyi farklılaşmış yani normal sağlıklı hücrelere çok benzeyen; Grad 2 orta dereceli farklılaşmış ve Grad 3 kötü farklılaşmış, çıktığı organın hücre yapısına hiç benzemeyen tümörleri belirtmektedir [113].

Meme kanserinin evrelendirilmesi ise patoloji raporuna ve diğer muayene ve radyolojik tetkiklere dayanmaktadır. TNM sistemine göre evrelendirilir. TNM sistemi; tümörün boyutunu (T), tümörün koltuk altı lenf düğümlerine yayılıp yayılmadığını (N) ve tümörün metastatik hale gelip gelmediğini (M) belirtir. Bu evreler aşağıdaki gibi tanımlanmıştır;

**Evre 0:** ‘in-situ’ olarak ta adlandırılan bu evre, duktal karsinoma in situ (DCIS) veya lobüler karsinoma in situ (LCIS) olan ve bu sınırlan içerisinde kalan kanser türünü ifade etmektedir. In situ karsinom, Kanalların veya bezlerin ötesine yayılmamıştır.

**Evre 1:** meme kanserinin yayılma potansiyeline sahip evresidir. Bu evrede tümör 2 cm’den küçüktür ve iyi sınırlanmıştır. Lenf bezlerine yayılma söz konusu değildir.

**Evre 2:** bu evre ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan ilki Evre2A’da ya memede tümör yok ama koltuk altı lenf bezlerine yayılmıştır ya da tümör 2cm’e kadardır ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmıştır. Ayrıca 2-5 cm arasında olup koltuk altı lenf bezlerine yayılmadığı durum da söz konusudur. Evre 2B’de ise ya tümör 2-5 cm arasında ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmış ya da 5 cm’den büyük olup lenf bezlerinde bulunmamaktadır.

**Evre 3:** kanserin ilerlemiş aşamasıdır. 3 alt bölümü bulunmaktadır. Evre3A’da tümör memede 5 cm’den büyük olabilir veya olmayabilir. Ancak çevre dokulara yayılmıştır. Evre 3B’de tümör farklı boyutlarda olup meme dokusuna yakın dokulara (Göğüs duvarı ve bu bölgedeki deri ile kaslar) ve lenf düğümlerine yayılımı görülmektedir. Evre 3C’de ise Tümör köprücük kemiği altındaki veya üstündeki ve boyun kısmındaki lenflere yayılmıştır. Memeye komşu dokulara geçiş de söz konusudur.

**Evre 4:** tümörün uzak dokulara metastazı görülmektedir. Kanser vücuttaki kemiklere, akciğerlere, karaciğer veya beyin gibi uzak organlara yayılmıştır [110].

Histolojik sınıflandırma ayrıca östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu, progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu ve insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER-2) proteininin aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonu gibi moleküler değişiklikler ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [113]. Bu reseptörler meme kanseri hücrelerinin yüzeylerinde, sitoplazmalarında ve çekirdeğinde bulunabilmektedir. Hormonlar gibi kimyasal haberciler, reseptörlere bağlanmakta ve bu hücre değişikliklerine neden olmaktadır. Bu üç reseptör tipinden (östrojen reseptörleri, progesteron reseptörleri veya HER-2) hiçbirine sahip olmayan hücrelere, üçlü negatif denir. Ancak androjen reseptörü ve prolaktin reseptörü gibi diğer hormonlar için alıcıları sıklıkla ifade etmektedir. Bu reseptörlerin varlığına göre de tedavi şekli değişmektedir [114].

#### **2.2.4. Meme Kanserinde Tedavi**

Meme kanseri tedavisinde erken tanının çok önemli olduğu bilinse de meme kanseri teşhisi yapılan kişilerde hastalığın etkin tedavisi de son derece önemlidir. Meme kanserinin tedavisinde birçok tedavi yöntemi önerilse de dünyanın birçok ülkesinde temel tedavi seçenekleri sınırlıdır. Temel olarak meme kanseri tedavi yöntemleri; cerrahi müdahale, ilaç tedavisi (Kemoterapi, Hormonoterapi, Hedefe yönelik tedavi) ve radyoterapiyi kapsamaktadır [115]. Tedavi yönteminin seçimi, kanserin evresi ve hastanın yaşı gibi birçok faktöre bağlı olarak yapılmaktadır. Tedavi seçiminde hastalığın prognozu ve tekrarlama riski de değerlendirilmektedir.

Meme kanserinin evresi belirlendikten sonra tedavi yöntemi seçilmektedir. 1. Evre kanserler ve DCIS durumu iyi bir prognoza sahiptir ve genellikle memenin bir parçasının alınması ile bazı durumlarda kemoterapi veya radyoterapi destekli tedavi uygulanır [116]. 2. ve 3. Evre kanserler ilerleyen kötü bir prognoza sahiptir ve tekrarlama riski yüksektir. Tedavisinde memenin bir kısmının veya hepsinin alınması, radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır. 4. Evre kanserler ise tedavi edilmesi zor olanlardır ve tüm tedavi yöntemlerinin kombinasyonu uygulanmaktadır [117].

##### **2.2.4.1. Cerrahi Müdahale**

Cerrahi müdahale, tipik olarak çevre dokusuyla beraber tümörün fiziksel olarak uzaklaştırılmasıdır. Cerrahi müdahale çeşitleri memenin korunduğu ameliyatlardan tüm memenin alındığı ameliyatlara kadar çeşitlilik göstermektedir [118]. Ameliyat sırasında kanserin durumunu değerlendirmek için bir ya da daha fazla lenf düğümü biyopsiye tabi tutulabilmektedir. Ailesel geçmişinde meme kanserine yakalananların olduğu kişiler veya

BRAC1 ve BRCA2 genlerinde mutasyonun tespit edildiği kadınlar yüksek riske sahip olduğundan her iki memenin de tamamen alınması (bilateral proflaktik mastektomi), önleyici müdahale olarak yapılmaktadır [113]. Bu işlemin yapıldığı kişilerde meme kanseri gelişimi %95 oranında azalmaktadır [119].

Meme kanserine karşı standart cerrahi müdahaleler üç şekilde olmaktadır; tüm memenin alındığı mastektomi, memenin bir çeyreğinin alındığı quadrantektomi ve memenin küçük bir parçasının alındığı lumpektomi. Tümörün durumu ve evresi cerrahi müdahale şeklinde etkili olmaktadır [120].

#### **2.2.4.2. Radyoterapi**

Radyoterapi genellikle cerrahi müdahale sonrası tümör yatağının olduğu bölgeye cerrahi müdahaleden kaçan mikroskobik tümörleri yok etmek için yapılmaktadır. Buna ilaveten tümör mikroçevresi için de yararlı bir etkisi olabilmektedir [121,122]. Bunun dışında radyasyon cerrahi müdahale sırasında da verilerek etkili bir tedavi yaklaşımı sağlanmaktadır. Radyasyon uygun dozda verildiği zaman meme kanserine tekrar yakalanma riski %50-66 arasında azalmaktadır [123]. Cerrahi müdahale yapılmış hastalarda radyoterapi uygulamasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

#### **2.2.4.3. İlaç Tedavisi**

Primer cerrahi tedavi sonrasında belirlenebilir tümör lezyonu olmayan, ancak olası mikrometastazlar nedeni ile nüks riski bulunan hastalarda küratif amaçla uygulanan tedaviye Adjuvant terapi adı verilmektedir. Cerrahi müdahale öncesinde uygulanan ilaç tedavisine ise Neo-adjuvant terapi denilmektedir. Erken evre meme kanserinde adjuvant terapi uygulanırken ileri evre meme kanseri vakalarında neo-adjuvant terapi prensibi benimsenmiştir. Adjuvant meme kanseri tedavisinde üç ana grup bulunmaktadır; Kemoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve hormonoterapi. Kanserin durumuna göre bu gruplardan biri veya hepsi aynı anda kullanılabilir.

Kemoterapi sıklıkla tüm meme kanseri evrelerinde (Evre 1-4) kullanılmaktadır. Meme kanserinin tekrarlama riskini %25, ölüm riskini ise %15 azalttığı bildirilmektedir [124]. Meme kanserinin kemoterapisinde taksanlar, antrasiklinler, antimetabolitler ve alkilleyici ajanlar gibi çeşitli kemoterapötikler kullanılmaktadır [125]. En etkili kemoterapi planı doksorubisin ve epirubisin gibi antrasiklinleri içeren bir tedavi şeklidir [126]. Tek başına kullanılan kemoterapötiklerin çoğu ile vakaların % 25-30'unda yanıt alınmaktadır. En etkili tekli ajanlar ise doksorubisin ve dosetaksoldur [127]. Kemoterapide tek ajan kullanımına



göre kombine ilaç kullanımının daha iyi sonuç verdiği görüldüğünden kombine halde sıklıkla 3-6 aylık bir periyotta tedavi uygulanması önerilmektedir [99]. En yaygın rejimlerden biri olan 'AC', siklofosfamid ile doksorubisinin (Adriyamisin) kombinasyonudur. Bazen bu kombinasyona dozetaksol eklenmektedir (CAT rejimi). Diğer yaygın bilinen kemoterapi rejimi ise Siklofosfamid, metotreksat ve 5-Florourasil (CMF) kombinasyonudur. Bu kombinasyon ile bir yıldan uzun bir süreyle % 60 civarında yanıt beklenmektedir. Kemoterapide ajanlar DNA ya da diğer mekanizmalarda hasara neden olarak hızlı büyüyen ve/veya hızla replike olan kanser hücrelerinin yok edilmesi yönünde çalışır. Buna rağmen, bu ajanlar hızla büyüyen normal hücrelere de zarar vererek önemli yan etkilere neden olmaktadır. Doksorubisinin kalp kasına zarar vermesi en tehlikeli komplikasyonlardandır.

Hedefe yönelik tedaviler, meme kanserinin moleküler alttiplerine göre bazı meme kanseri hücrelerinde aktifleşen bir hücre reseptörü olarak bilinen HER-2 varlığında tercih edilmektedir. Kanser hücrelerinin yüzeyinde HER-2 bulunan hastalar daha agresif bir hastalığa sahiptir ve tedavisinde hedefe yönelik bir tedavi uygulanmaktadır. HER-2, epitelyal büyüme faktörü reseptör ailesine ait bir transmembran reseptör tirozin kinazdır. Bu reseptör, normal koşullarda hücrenin bölünmesine neden olan bir büyüme faktörü tarafından uyarılmakta, ancak büyüme faktörünün yokluğunda hücre normal olarak büyümeyi durdurmaktadır. İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde HER-2 reseptörü sürekli uyarılmaktadır. Böylece hücre, agresif bir kanser formu üreterek durmadan bölünmektedir. HER-2'ye karşı bir monoklonal antikor olan Trastuzumab (Herceptin), 1-3. evre HER-2 pozitif meme kanserlerinin 5 yıllık hastalıksız sağ kalımını yaklaşık %87'e yükseltmiştir [128]. Trastuzumab, reseptörü aşırı ifade eden meme kanseri hücrelerinde HER-2'ye bağlandığında, trastuzumab büyüme faktörlerinin reseptörlere bağlanmasını ve bunları uyarmasını engelleyerek kanser hücrelerinin büyümesini etkili bir şekilde engeller. Böylece meme kanserinde HER-2'nin aşırı ekspresyonu önlenerek hastalığın tekrarlanması ve kötü prognoz durumu indirgenir [129]. Bununla birlikte, Trastuzumab çok pahalıdır ve kullanımı ciddi yan etkilere neden olabilmektedir (hastaların yaklaşık %2'sinde önemli kalp hasarları görülmektedir) [130]. Trastuzumab dışında yeni hedefe yönelik tedaviler düşünülmekte ve tekli veya kombine kullanım şekilleri değerlendirilmektedir. Bunlardan lapatinib tirozin kinaz inhibitörü, Everolimus ise m-Tor (rapamisinin mekanik hedefi) inhibitörü olarak tedavide kullanılmaktadır. Ayrıca, anjiyogenez inhibitörleri, poly (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) inhibitörleri, insülin-benzeri büyüme faktörü 1 reseptör (IGF-1R) inhibitörleri,

proteazom inhibitörleri ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) inhibitörleri de hedefe yönelik tedavide kullanım için değerlendirilmektedir [131].

Hormonal tedavi (Hormonoterapi), hormonal reseptörler olarak bilinen östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitifliği saptanan hastalarda %60-70 cevap elde edilebilen bir tedavi yöntemidir [132]. Bazı meme kanseri hücreleri östrojen ve progesteron varlığında büyümeye devam etmektedir. Hücre yüzeyinde ER ve PR varlığı tespit edilerek hormon tedavisi uygulanmakta ve yanıt alınmaktadır [133,134]. Hem adjuvant hem de neo-adjuvant tedavide kullanılmaktadır. Meme kanserinin en yaygın görülen tipi ER ve PR pozitif meme kanserleridir ve meme kanseri vakalarının % 75'ni oluşturmaktadır [135]. Bu nedenle hormonoterapi meme kanserinde öncelikli tedavilerden biridir. Tamoksifen (seçici östrojen reseptör modülatör ilaçlar (SERMs)), Lüteinizan hormon salgılatıcı hormon (LHRH) analogları ve aromataz inhibitörleri (AI) en sık kullanılan hormonoterapi ajanlarıdır. ER + meme kanseri vakalarında tamoksifen yaygın olarak kullanılarak reseptörleri bloke ederek östrojenin etki etmesini önlemektedir. Tamoksifen kullanımı yaklaşık 15 senedir önerilmektedir [136]. Tamoksifene alternatif olarak raloksifen de kullanılabilir [137]. Tamoksifenin büyük oranda meme kanseri gelişimini indirdiği tespit edilmiştir. Bir diğer önemli hormonoterapi ajanı aromataz inhibitörleridir. Aromataz, östrojen biyosentezinin son basamağında görev alan bir enzim kompleksidir. Bu enzimin inhibe edilmesi ile östrojen üretimi durdurulmaktadır [138]. Anastrozol, meme kanseri tedavisinde kullanılan önemli bir aromataz inhibitörüdür [45]. Postmenapozal kadınlarda androjenin östrojene dönüşmesini engelleyen aromataz inhibitörlerinin kullanımı, premenapozal hastalarda ise tamoksifen ve gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogları kullanımı, ER ve/veya PR pozitif meme kanserine sahip hastalarda günümüzde önerilen tedavi yaklaşımlarıdır [59].

Günümüzde kanserli hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre proliferasyonunun engellenmesinde kullanılan ajanların önemi son derece büyüktür. Ancak bu ajanların gerek pahalı ürünler olması, gerekse birçok yan etkiye sahip olması, bilim dünyasını yeni ve daha etkili alternatif bir ürünün bulunması için teşvik etmektedir. Ayrıca hücrelerin bu ajanlara karşı direnç geliştirmeye başlaması çoğu kez tedaviyi imkansız kılmaktadır. Bitkilerde elde edilen doğal ürünler, mikroorganizmaların ürettiği ürünler ve sucul organizmalar potansiyel anti kanser ajanlar olarak değerlendirilmektedir. Özellikle fungal ürünlerin kanser tedavisine yönelik değerlendirilmesi ile yeni anti kanser ajanlar geliştirilmektedir [139,140].

### 2.3. Funguslar

Son yıllarda canlıların sınıflandırılmasında kullanılan 3'lü domain sisteminde Eukarya içerisinde yer alan fungi, dünya genelinde karasal ve sucul ortamlarda yaygın olarak bulunmasına karşın çöller, derin deniz sedimentleri ve yüksek tuz konsantrasyonu içeren bölgelerde de görülebilmektedir [141,142]. Karasal ortamlarda bulunan fungi insan, hayvan ve bitkilerin paraziti veya patojeni, bitki endofiti, arthropodların ve bitki köklerinin simbiyontu ve toprak mikrobiyotasının bileşenleri olarak rapor edilmektedir [143,144]. Etrafımızdaki çevresel olayların birçoğundan funguslar sorumludur. Organik maddelerin parçalanması; endüstriyel fermantasyon (şarap, bira, peynir, ekmek), antibiyotik üretimi, organik asit ve vitamin üretimi gibi yararlı olanlar yanı sıra, çeşitli bitki, hayvan ve insan hastalıklarından da funguslar sorumlu olabilmektedir.

Araştırmalar sonucunda elde edilen fungal fosiller değerlendirildiği zaman, evrimsel süreç içerisinde fungusların 0.5 ile 1.5 milyar yıl önce evrimleşerek ortaya çıktığı tahmin edilmektedir [145,146,147,148]. Uzun yıllar bitkiler alemi içinde ele alınan funguslar, yıllar boyunca keşfedilen özellikleri ve moleküler çalışmalar sonucunda günümüzde ayrı bir sınıflandırma grubu altında incelenmektedir. Yeryüzünde 1.5 ile 5.1 milyon fungus türünün olduğu düşünülse de, günümüzde resmi olarak taksonomistler tarafından tanımlanan yaklaşık 100.000 fungus türü bulunmaktadır [149,150,151,152]. Tanımlanan türlerin içerisinde en yaygın olanlarının, 100'ün üzerinde cinse dahil olup böcekler üzerinde zararlı etkiler gösteren entomopatojen funguslar olduğu düşünülmektedir [153].

Funguslar, genel olarak hücre duvarlarında kitin içeren heterotrofik ökaryotik canlılar olarak bilinmektedir. Ancak hücre duvarında selüloz olan veya hücre duvarı olmayan türleri de mevcuttur. Funguslar inorganik karbonu fikse edemedikleri için organik bileşikleri absorbe etmek zorundadırlar. Çevreye sindirim enzimlerini salarak organik maddelerin parçalanması ve çözünen maddelerin yapıya katılmasıyla büyüyüp gelişirler. Bunu ise saprofit karakterli canlı veya hayvan, bitki ve diğer mantarların parazitleri olarak gerçekleştirirler. Buna ek olarak; funguslar, yosunlarla beraber likenleri, bitki kökleriyle endomikoriza veya ektomikorizaları oluşturan mutualistik birlikler kurabilmektedir [154].

Funguslar tipik olarak hif olarak adlandırılan, bölümlendirilmiş dallı bir yapıya sahiptir. Hifler septalı veya septasız (sönotitik) olabilmektedir. Septalı olanlarda septada bulunan porlar sayesinde hif boyunca sitoplazma, bazı organeler ve bazen de nükleusun geçmesi mümkündür [155]. Bir hif kümesi ise topluca miselyum olarak bilinmektedir. Fungi

içerisinde yer alan mayalar (yeast) ise tek hücreli organizmalar olup tomurcuklanarak aseksüel olarak bölünmektedir. Çevresel koşullara bağlı olarak, birçok toprak mikrofungusu dimorfik olarak adlandırılan, hem hifal hem de maya benzeri büyüme biçimlerini gösterebilmektedir. Özel bir mantar şekli olan sklerotiyum ise, olumsuz çevresel koşullara dirençli olduğu düşünülen hiflerden oluşan yoğun, sıklıkla küresel bir yapıdan ibarettir [143]. Mikroskletrotiya olarak adlandırılan sklerotiyanın küçük formu birçok toprak mikrofunguslarında rapor edilmiştir [156,157,158].

Funguslar seksüel ya da aseksüel olarak üreyebilmektedirler. Bilimsel literatüre bakıldığı zaman bu iki üreme formu için farklı terimler kullanılmaktadır. Bunlar; teleomorf ve anamorf, perfekt ve imperfekt, mayosporik ve mitosporik olarak adlandırılabilir. Seksüel üreme, iki nükleusun birleşmesini ve ardından mayozu içeren üreme tipidir. Bunun sonucunda yeni gen kombinasyonunu içeren nesil ortaya çıkmaktadır. Fungusların sınıflandırılmasında seksüel üreme şekilleri önemli rol oynamaktadır. Seksüel üreme şekli bilinmeyenler Deuteromisetlere (Fungi Imperfecti) dahil edilmektedir. Aseksüel üreme ise, miselyal fragmentasyonu, tomurcuklanma, sporangiyospor ve konidiya olarak bilinen üreme sporlarının üretimi ile meydana gelmektedir. Konidiya, mitotik bölünme sonucunda oluşmaktadır ve hiflerin üzerinde veya hiflerin ucunda olan konidyojen hücrelerin üzerinde şekillenmektedir. Sporangiyospor, sporangiyum adı verilen bir kese içinde oluşmaktadır. Paraseksüel rekombinasyon ise, iki farklı tip nükleusa sahip (heterokaryon) hifte bu nükleusların birleşmesi ve seksüel üremeyi içermeyen bir rekombinant tip üreten mitotik crossing over'ı içermektedir. Paraseksüel döngü, *in vitro* kültürde üretilen funguslarda görülmektedir. Ancak doğal popülasyonlarda hangi sıklıkla meydana geldiği belli değildir [143,159]. Konidiya ve konidyoforların şekli ve düzeni fungusların tanımlanmasında kullanılmaktadır [160]. Ancak son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar morfolojik olarak benzer olan fungusların farklı familyalara dahil olabileceğini göstermiştir [154].

Funguslar çok eski tarihlerden beri insanlar tarafından birçok alanda kullanılmaktadır. Bunun en temel örneği doğadan toplanan veya kültürel biçimde üretilen mantar türlerinin yemek olarak tüketilmesidir. Hatta bazı ülkelerde mantar yetiştiriciliği, endüstri halini almıştır. Gıda sektöründe yaygın olarak kullanılan mayalar ise fırıncılık ve fermentasyon endüstrisinin temelini oluşturmaktadır. Bira üretimi, ekme yapımı ve şarabın oluşturulmasında mayaların gerekliliği çok eski zamanlardan beri bilinmektedir [161]. Bununla beraber, birçok fungus türü penisilin, siklosporin, fusidik asit gibi farmakolojik olarak çok önemli antibiyotiklerin üretiminde kullanılmaktadır. Riboflavin, biyotin, tiamin

gibi vitaminlerin, metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılan kortizon gibi önemli ilaçların, sitrik asit gibi asitliği düzenleyen gıda katkı maddelerinin, amilaz, proteaz gibi enzimlerin ve bazı hormonların endüstriyel olarak üretiminde de başlıca kullanılan mikroorganizmalar funguslardır [162]. Ayrıca, rokfor ve gorgonzola gibi bazı peynirlerin hazırlanmasında da funguslardan faydalanılmaktadır. Bunların dışında, tarım alanlarında ve seralarda birçok zarara neden olan böceklerin kontrolünde de fungusların kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır [163].

Günümüzde birçok fungus türü, böceklerin kontrolünde biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılmaktadır. Özellikle toprakta bulunan ve insan sağlığı açısından sorun teşkil etmeyen türlerin kullanılması son derece önemlidir. Funguslar içerisinde yaklaşık 1000 entomopatojen fungus türü yer almaktadır. Bu türler zararlı böceklerle mücadelede önemli bir yere sahiptir [164]. Sistemik olarak değerlendirildiğinde entomopatojen fungusların; Laboulbeniomyces, Blastocladiomycota, Eurotiomycetes, Entomophthoromycotina, Pucciniomycetes, Dothideomycetes, Sordariomycetes ve Kickxellomycotina grupları içerisinde yer aldığı görülmektedir. Entomopatojen fungus olarak kullanılan en yaygın türler ise; *Beauveria spp.*, *Fusarium spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Hirsutella spp.*, *Verticillium spp.* ve *Metarhizium spp.*'dir. Bu türlerin bağlı olduğu cinsler, Ascomycetes grubunda olup, parazitik nematodlar gibi zararlı canlıların kontrolünde de kullanılmaktadır. Entomopatojen fungi etkileyeceği böcekleri, sindirim sistemi, solunum delikleri ve integument yüzeyinden enfekte edebildiğinden dolayı birçok böcek türünü etkileyebilmektedir [165]. Entomopatojen fungusların yaşam döngüsünde eşeysiz olarak üreyen enfektif sporlar, böceğe ya besin alımıyla sindirim sisteminden girer ya da özgül olmayan bir tutunma ile kütikülasına tutunur. Kütikülaya tutunan veya bağırsağa geçen sporlar çimlenmeye başlar ve hifler oluşturarak böceğin bünyesinde büyür. Bu sırada kütikül yüzeyini delip böceğin vücuduna girmek için kitinaz, proteaz ve lipaz gibi enzimler salgılar. Hemolenfe geçen funguslar, filamentöz yapı sergileyerek böceğin tüm vücuduna yayılır, organları istila eder ve böceğin ölümüne yol açarlar. Böcek öldükten sonra sporlanarak farklı konaklara geçiş yaparlar [166,167,168,169].

### **2.3.1. Fungal Metabolitler**

Organizmalar biyolojik aktivitelerinin bir parçası olarak karbonhidratlar, proteinler, nükleotitler ve aminoasitler gibi normal büyüme ve gelişimini tamamlayabilmeleri için elzem olduğu düşünülen kimyasal bileşikler üretmektedir. Bu bileşikler primer metabolitler olarak bilinmektedir. Büyüme ve gelişme için gerekli olmayan diğer bileşikler ise sekonder

metabolitler olarak adlandırılmaktadır [170]. Bazı fungal sekonder metabolitler insanlarda medikal özelliklere sahipken (Penisilin ve sefalosporin gibi) diğerleri toksik özellikte (Ergot alkaloidleri, aflatoksin ve okratoksin gibi) olabilmektedir [171]. *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* ve *Fusarium oxysporum* başta olmak üzere birçok entomopatojen fungus türünün ise böceklerin ölümüne neden olan çeşitli metabolitleri ürettiği ortaya konmuştur. Bu maddelerden bazıları; Beauvericin, Bassiacridin, Lateritin, Oosperin, Quercetinase ve Bassiatin'dir (Çizelge 2.1.). *Beauveria* cinsine bağlı türlerin farklı bazı siklopepsipeptitleri ürettiği rapor edilmiştir. Siklopepsipeptitler, sodyum ve potasyum iyonlarıyla seçici etkileşim nedeniyle iyonofor antibiyotikler gibi davranmaktadır [172]. Yaygın olarak bilinen siklopepsipeptit Beauvericin iken Beauverolide, Bassianolide ve Bassiatin gibi metabolitler de siklopepsipeptit yapıya sahiptir. Bassiatin, yeni keşfedilen maddelerden biridir ve tıbbi bir bileşik olarak kullanılabilecek potansiyelinin olduğu düşünülmektedir [173,174,175].

Çizelge 2.1. Funguslardan elde edilen toksik ve farmasötik olarak aktif bileşikler

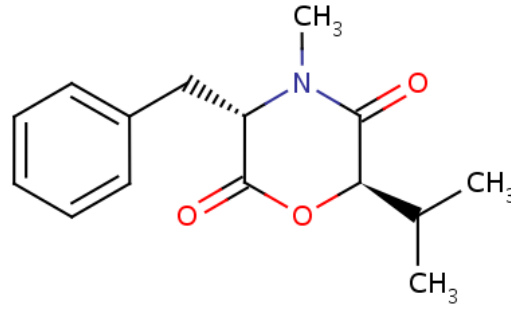
Bileşik	Kaynak	İşlevi
Swainsone	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Metastaz ve tümör gelişimini önler.
Cytochalasin C	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Sitokinleri inhibe eder.
Bassiatin	<i>Beauveria spp.</i> <i>Fusarium spp.</i>	Damar içinde trombosit birikimini engeller + Antiöstrojenik
Viridiofungins	<i>Trichoderma viride</i>	Squalene sentetaz aktivitesini inhibe eder
Zearalenone	<i>Fusarium spp.</i>	Östrojenik
Cyclosporin	<i>Tolypocladium</i>	İmmünosupresan
Beauverisin	<i>Beauveria spp.</i> <i>Paecilomyces spp.</i> <i>Fusarium spp.</i>	İyonofor; hücre zarı geçirgenliğini artırarak hücre ve organel fonksiyonları zarar görür.
Bassianolid	<i>Beauveria bassiana</i>	İyonofor
Siklosporin A	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Verticillium spp.</i> <i>Fusarium spp.</i>	Böcek savunma hücrelerine baskı yapabilir.
Oosporsin	<i>Beauveria bassiana</i>	Antimikrobiyal
Bassiacridin	<i>Beauveria bassiana</i>	Özellikle çekirgelerde kitin bağlayıcı toksik bir protein
Destruxin	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Aschersonia sp.</i>	İnsektisidal; böcek kas membranlarındaki kalsiyum kanallarını açar.

### 2.3.1.1. Bassiatinin Kimyasal Yapısı ve Etkileri

Bassiatin, morfolin temelli bir madde olup açık ismi (3R,6R)-3-benzyl-4-methyl-6-(propan-2-yl) morpholine-2,5-dione'dur (Şekil 2.1.). Moleküler ağırlığı 261.3 gr/mol ve moleküler formülü C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> olan bassiatin, +4°C'de uzun süre stabil kalabilmektedir. Bassiatinin stereoizomeri olan Lateritin (3S,6R), Asetil-CoA:Kolesterol Açıltranferazın inhibitörü olarak değerlendirilmiştir [173]. Lateritin *Gibberella lateritium* tarafından üretilse de karışık fungal kültürlerden de elde edilmiştir. Ayrıca, insan kanser hücrelerinin büyümesini inhibe edici ve antimikrobiyal etkileri olduğu bilinmektedir [176]. Bassiatinin metasiklik trimeri ise Beauverisin olarak bilinen fungal üründür. Beauverisin, yapısında üç tane bassiatin içeren siklik heksadepsipeptittir. Birçok böcek grubu üzerinde insektisidal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [177,178,179]. Ayrıca, bazı gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler ile candida türleri üzerinde antibakteriyel ve antifungal etkiye neden olduğu da tespit edilmiştir [180,181,182]. Beauverisinin intraselüler elektrolit konsantrasyonunu düzenlediği bilinmektedir [183]. Bu etkisinden dolayı ekstraselüler kalsiyumun insan akut lenfoblastik lösemi hücrelerine girişini artırarak sitokrom c'nin salınımına ve kaspaz 3 aktivasyonu ile hücrelerin apoptoza sürüklenmesine neden olmaktadır [184]. Aynı şekilde, Bcl-2 ailesini inhibe ederek küçük hücreli olmayan insan akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyici antitümör etkisini göstermektedir [183]. Bunların dışında beauverisinin prostat kanseri ve meme kanseri hücrelerinin farklı dokulara yayılmasını engelleyici etkisi olabileceği değerlendirilmiştir [185].

Bassiatin, ilk olarak Kagamizono ve arkadaşları [174] tarafından 1995 yılında *Beauveria bassiana*'dan elde edilmiştir. Üretim aşamaları ve benzer bileşiklerin sentez işlemi belirlenmiştir. Yapılan çalışmada; Bassiatin, tavşanlarda platelet aggregasyon inhibitörü olarak denenmiş ve başarılı bulunmuştur. Kagamizono ve arkadaşları [174], bassiatinin sentezlenmesinde iki yaklaşım öne sürmüştür. Bunlardan biri laktonizasyon yaklaşımı olarak bilinirken diğeri laktamizasyon aşamasıdır. Her iki yaklaşım da bassiatinin hazırlanmasında başarılı iken, önemli metabolik basamaklarda yeterli verim elde edilememektedir. Hughes and Sleebs [186], bassiatinin sentezlenmesinde önemli adımın, hidroksiasit asiklik öncüllerinin Mitsunobu siklizasyonları olduğunu bulmuştur. Hidroksiasit öncülleri, engellenmiş alkol yapısındaki substratlar olarak bilinmektedir. Etkili konsantrasyona bağlı olarak aynı hidroksiasit öncüllerinin Mitsunobu reaksiyonunda farklı davrandığının bulunması ile, verimli bir şekilde bassiatinin sentezlenebileceği bulunmuştur.

Günümüze kadar bassiatin çok az çalışmada kullanılmıştır. Bassiatinin kullanıldığı son çalışmalar, MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde antitümör etkisinin değerlendirilmesi şeklindedir. Bu hücre hattında bassiatinin antiöstrojenik bir madde olarak etki gösterdiği görülmüştür [3]. Ayrıca, MCF-7 hücrelerinde hayatta kalma ile ilişkili ERK ve Akt sinyal yollarının bassiatin tarafından aktive olduğu bulunmuştur. ERK'nin aktive olması ile MCF-7 hücre hattının apoptoza sürüklendiği düşünülmektedir [187].



Şekil 2.1. Bassiatin'in (3R,6R) moleküler yapısı



### 3. MATERYAL – METOT

#### 3.1. Bassiatin Üretimi için Fungus Türlerinin Seçilmesi

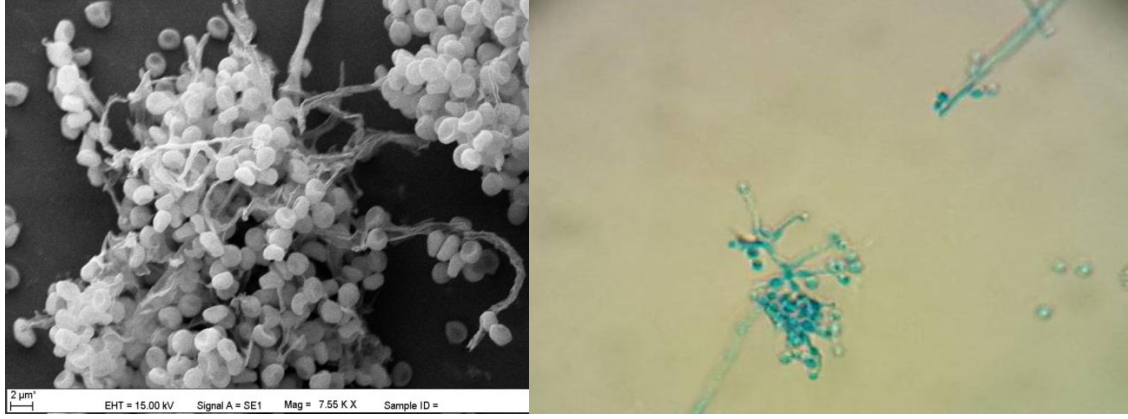
Bassiatin üretimi için; daha önceden Türkiye topraklarından izole edilen fungus türlerinden Real-Time PCR amplifikasyon çalışmaları ile tür tayini yapılmış ve bu türler içerisinde bassiatin üretimi için uygun olabilecek 3 entomopatojen fungus türü seçilmiştir. Bu çalışma için seçilen türler, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* (*Isaria fumosorosea*) ve *Fusarium oxysporum*'dur. Seçilen türlerin gen bankasında en çok benzediği kısmı 18S rRNA - ITS 1 - 5.8S rRNA - ITS 2 - kısmi 28S rRNA dizileri, NCBI Blast programı kullanılarak benzerlik yüzdeleri ile birlikte tespit edilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Bassiatin üretimi için seçilen fungus türlerinin gen bankası benzerlik durumuna göre tür tespiti

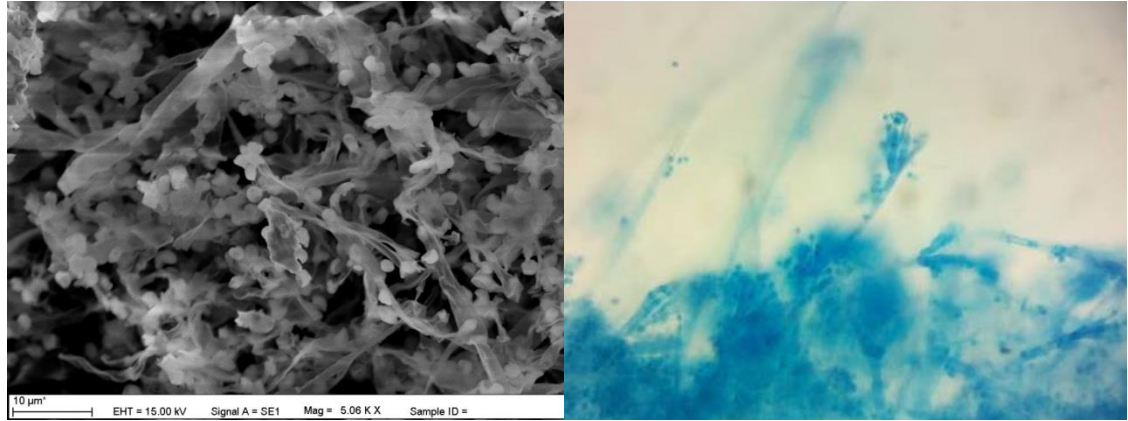
Numune bilgisi		Gen bankasında en çok benzediği DNA dizi bilgisi		
Kod	Numune adı	Tür adı	Benzerlik	Gen bankası ulaşım no
1	Bolu-Abant	<i>Beauveria bassiana</i>	548/553(99%)	KM205065.1
2	Burdur-Bucak	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	580/594(98%)	BV211295.1
3	Kocaeli-İzmit	<i>Fusarium oxysporum</i>	578/591(98%)	FJ985672.1

Seçilen üç fungus türü Hacettepe Üniversitesi Maden Mühendisliği Bölümünde yer alan Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Zeiss Evo 50) ile görüntülendi ve morfolojik olarak farklılıkları karşılaştırıldı. Her fungus türünden lam üzerine hazırlanan kuru preparatlar, SEM öncesi altın ile kaplandı ve görüntüleme için uygun hale getirildi (Şekil 3.1., Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.).

Fungus türlerini karşılaştırmak için; her türün ticari laktofenol pamuk mavisi (Merck) kullanılarak preparatları hazırlandı ve ışık mikroskobu (Leica) altında görüntülendi (Şekil 3.1., Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.). Preparat hazırlarken, bir öze yardımıyla fungus türleri lam üzerine alındı ve %70'lik alkol damlatıldı. Alkol uçurulduktan sonra preparat, laktofenol pamuk mavisi ile 2 dakika muamele edildi. Daha sonra üzerine lamel kapatılıp incelendi.



Şekil 3.1. *Beauveria bassiana*'nın SEM (solda) ve ışık mikroskopundaki (sağda) görüntüsü (Fotoğraf: ErKay Özgör – Evren Çubukçu)



Şekil 3.2. *Paecilomyces fumosoroseus*'un SEM (solda) ve ışık mikroskopundaki (sağda) görüntüsü (Fotoğraf: ErKay Özgör – Evren Çubukçu)



Şekil 3.3. *Fusarium oxysporum*'un SEM (solda) ve ışık mikroskopundaki (sağda) görüntüsü (Fotoğraf: ErKay Özgör – Evren Çubukçu)

### 3.2. Bassiatin'in Elde Edilmesi

#### 3.2.1. Fungus Türlerinin Kültürasyonu ve Bassiatin Üretim Çalışmaları

Seçilen fungus türlerini çalışmaya hazır hale getirmek için özel bir katı besiyeri (SDAY) kullanılarak üretimi sağlanmıştır. SDAY besiyeri, fungus türlerinin hızla üreyerek yüksek miktarda spor üretmesini sağlamak için seçilmiştir. SDAY besiyerinin içeriği aşağıdaki gibidir;

SDAY besiyeri içeriği:

- 56 gr kullanıma hazır sabouraud dekstroz agar katı besiyeri (Merck)
- 10 gr kullanıma hazır granüle maya ekstraktı (Merck)
- 1000 ml distile su

Besiyeri hazırlandıktan sonra agarın erimesi için 95°C'lik sıcak su banyosunda yarım saat bekletildi. Ardından 120°C'de 1 atm basınç koşullarında 15 dakika otoklavda steril edildi. Sterilizasyon sonrası steril tüplere besiyerleri konularak yatık bir şekilde donması için bekletildi. Besiyerleri ekim için hazır olunca, seçilen fungus türleri ile ekim yapılarak 14 gün 28°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen fungus kültürleri çalışma için uygun hale geldi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. SDAY besiyerinde üretilen fungus türleri (Fotoğraf: ErKay Özgör)

Bu aşamada sıvı besiyerleri kullanılarak bassiatin üretimi yapıldı. Sıvı besiyerlerine katı fungus kültürlerinden ekim yaparken bir standartizasyon oluşturmak için McFarland yöntemi kullanıldı.

McFarland yöntemi; bakteri, fungus ve maya türleri ile yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Özellikle antimikrobiyal çalışmalar ve üretilen bir ürünün miktar tayininde standart koşullar oluşturularak doğru bir şekilde karşılaştırmalar gerçekleştirilmektedir. McFarland standardı doğrultusunda hazırlanan tüplerdeki bulanıklığa göre sıvı solüsyonlar içerisindeki mikroorganizmanın miktarı, bu yöntemle belirlenmektedir. Çizelge 3.2.'de, her bir standart tüp için gerekli baryum klorür ve sülfürik asit miktarı ile buna karşılık gelen mikroorganizma hücre yoğunluğu verilmektedir. Ayrıca spektrofotometre kullanılarak 600 nm'de yapılan ölçümlerle hücresel yoğunluk karşılaştırılabilmektedir.

Çizelge 3.2. McFarland standartlarının hazırlanışı ve hücre yoğunlukları ile karşılaştırılması

<b>McFarland Standard No.</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>%1.0 Baryum klorür (ml)</b>	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
<b>%1.0 Sülfürik asit (ml)</b>	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
<b>Yaklaşık hücre yoğunluğu (<math>1 \times 10^8</math> CFU/ml)</b>	1.5	3	6	9	12
<b>% Transmittans*</b>	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
<b>Absorbans*</b>	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

\*600 nm dalga boyunda

Çalışma kapsamında üretilen fungus kültürleri, McFarland standardı oluşturularak kullanıldı. Bu çalışmada, McFarland Standart No. 2'ye göre her bir fungus türü için ayrı ayrı fungal spor solüsyonları hazırlandı. Bu amaçla, 15 ml'lik steril falcon tüplere 10 ml steril distile su eklendi ve fungus kültürlerinden öze yardımıyla örnekler alınarak 2 No'lu standarda göre solüsyon ayarlandı. McFarland tablosuna göre  $6 \times 10^8$  fungus sporu/ml'lik solüsyonlar elde edildiği görülse de bu miktarın doğruluğu, spektrofotometre cihazında (Aelab UV-VIS) absorbansın belirlenmesi ile doğrulandı. Böylece bassiatin üretimi için gerekli fungus solüsyonları hazır hale getirildi.

Çalışmada kullanılacak 3 fungus türünden bassiatin üretim çalışmaları yapılacağından bu çalışmaya uygun 2 farklı sıvı besi ortamına ekim yapıldı. Bunun için; her iki sıvı besiyeri de aşağıda belirtildiği gibi hazırlanarak, 110°C, 1 atm basınç altında 15 dk. olmak üzere otoklavda steril edildi ve 250 ml'lik steril erlenlere 150 ml olacak şekilde dağıtıldı. Her bir erlene 1 ml fungus solüsyonu eklendi.

- **1. Besiyeri:** 6.5 pH ve 28 °C'nin altında, 0.3% maya ekstraktı, 0.3% malt ekstraktı, 0.5% pepton, 2% glukoz, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0.05% NH<sub>4</sub>Cl içeren 150 ml'lik 6 erlenmayer içerisinde sıvı besiyerlerinde çalkalanarak 9 gün inkübasyona bırakıldı [3].
- **2. Besiyeri:** 7 pH ve 26 °C sıcaklıkta, %2 glukoz, %0.2 maya ekstraktı, %0.5 polipepton, %0.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %0.05 MgSO<sub>4</sub> içeren 150 ml'lik 6 erlenmayer içerisinde sıvı besiyerlerinde çalkalanarak 5 gün inkübasyona bırakıldı [174].

### **3.2.2. Kültürlerin Ekstraksiyon ve Elüsyon Aşamaları**

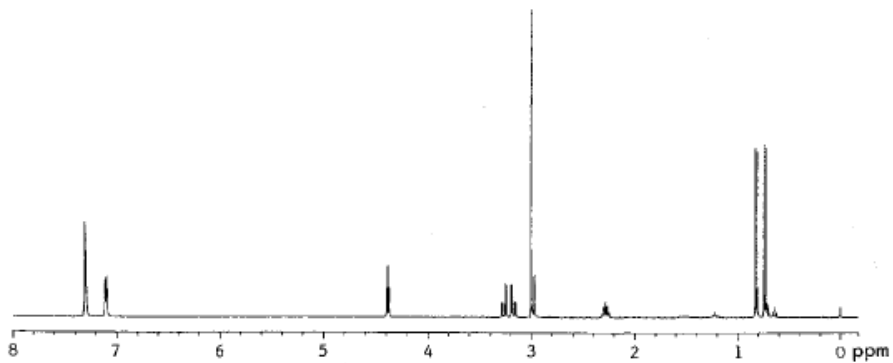
Üretim sonrası elde edilen kültür sıvıları ile ekstraksiyon aşamasına geçildi. Ekstraksiyonda yaygın olarak kullanılan etil asetat (EtOAc) tercih edildi. Bu aşamada ilk olarak her bir erlende bulunan kültür sıvısı, buhner hunisi yardımıyla steril Whatman No.1 kalitatif filtre kağıdı ile filtre edildi ve aynı miktarlardaki etil asetat ile (150 ml) muamele edildi. Daha sonra bu karışım ayırma hunisi kullanılarak ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyon sırasında kültür sıvısında bulunan maddeler etil asetata geçtiğinden dolayı etil asetat, ayrı steril cam balonlarda toplandı. Her fungus türü için hazırlanıp aynı besiyerinde üretilen kültür sıvıları bu işlem sonunda birleştirildi. Kültür sıvılarından elde edilen EtOAc ekstraktları indirgenmiş basınç altında Rotary evaporatör (Heidolph Laborota 4000) ile uçuruldu. Balonun dip kısmında, içerisinde bassiatinin de bulunduğu organik bileşikler içeren bir kalıntı (rezidü) olduğundan evaporasyon sonrası elde edilen kalıntıdan, ayırım ile bassiatinin ayrılması gerekmektedir. Bu amaçla, her bir rezidü minimal miktarlarda kloroform (CHCl<sub>3</sub>) ile çözdürüldü ve ayırım için hazırlandı. Ham rezidü miktarının az olmasından dolayı küçük bir kolon seçilerek içerisine az miktarda Sephadex (G-25, Superfine) konuldu. Sonra, elde edilen rezidü kolona eklenerek süzülmesi için 24 saat bekletildi. 24 saat sonra sephadex'in bazı maddeleri tutarak kolonu doldurduğu tespit edildi. Daha sonra sephadex'den bu maddelerin ayrılmasını sağlamak için 50:50 oranında CHCl<sub>3</sub>-MeOH (Metanol) karışımı kolona eklenerek 24 saat bekletildi ve madde elüsyona uğratıldı.

### 3.2.3. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi ile Bassiatin'in Analizi

Nükleer manyetik rezonans (NMR), atom çekirdeklerinin manyetik özelliklerine dayanan bir fiziksel durumdur. Tek sayılı nükleon içeren tüm atom çekirdekleri ve çift sayılı olan bazı diğer atom çekirdeklerinin bir manyetik momentumu vardır. En yaygın kullanılan çekirdekler hidrojen-1 ve karbon-13'dür, ancak çoğu başka elementlerin bazı izotopları da gözlemlenebilir. NMR, bir manyetik çekirdeği incelemek için onun manyetik momentini dışardan uygulanan kuvvetli bir manyetik alan ile aynı doğrultuya hizalar, daha sonra momentlerin yönlenmesi bir elektromanyetik dalganın etkisiyle bozulmaktadır.

Manyetik alan tarafından yönlendirilmiş olan çekirdeğin momentinin yer alabileceği iki enerji seviyesi vardır, biri manyetik alanla aynı yönde olan düşük enerjili seviye, diğeri manyetik alanın ters yönünde olan, yüksek enerjili seviyedir. Bu iki seviye arasındaki enerji farkına karşılık gelen frekansta bir foton soğurulursa moment anlık yön değiştirir, dolayısıyla o frekansta bir rezonans gözlemlenmektedir. Bu rezonans, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ve manyetik rezonans görüntüleme de kullanılır. NMR spektroskopisi bir molekül hakkında fiziksel, kimyasal ve yapısal bilgi edinmek için kullanılan başlıca tekniklerden biridir. Biyolojik moleküllerin bir çözelti içerisindeki üç boyutlu kimyasal yapıları hakkında ayrıntılı bilgi veren tek yöntemdir.

Bassiatinin  $H^1$  NMR ve  $C^{13}$  NMR spektrumları, Kagamizono ve arkadaşları [174] tarafından değerlendirilmiş ve çizelge halinde spektrum değerleri belirtilmiştir (Şekil 3.5.) (Çizelge 3.3.).



Şekil 3.5. Bassiatinin  $H^1$  NMR spektrumu ( $CDCl_3$ , 400 MHz) [174]

Çizelge 3.3. Bassiatinin C<sup>13</sup> NMR ve H<sup>1</sup> NMR kimyasal değişim spektrum değerleri

	$\delta^{\text{C}}$	$\delta^{\text{H}}$
<b>C-2</b>	167.3	-
<b>C-3</b>	62.8	4.38
<b>C-5</b>	165.5	-
<b>C-6</b>	81.3	2.98
<b>C-7</b>	29.7	2.29
<b>C-8</b>	18.6	0.82
<b>C-9</b>	15.1	0.74
<b>C-10</b>	37.1	3.26
		3.17
<b>C-11</b>	134.1	-
<b>C-12, 16</b>	129.8	7.09~7.13
<b>C-13, 15</b>	129.2	7.27~7.33
<b>C-14</b>	128.2	7.27~7.33
<b>N –CH<sub>3</sub></b>	32.4	3.00

Bassiatin'in moleküler yapısında 19 proton bulunmaktadır. H<sup>1</sup> NMR spektroskopisinde her protonun bağlı olduğu gruba göre pik yaptığı değer değişmektedir. Buna göre;

- 2 metil protonu :  $\delta_{\text{H}}$  0.82 (3H) ve  $\delta_{\text{H}}$  0.74 (3H)
- Bir N-metil protonu :  $\delta_{\text{H}}$  3.00 (3H)
- 3 methin protonu :  $\delta_{\text{H}}$  4.38 (1H),  $\delta_{\text{H}}$  2.98 (1H) ve  $\delta_{\text{H}}$  2.29 (1H)
- Bir çift metilen protonu:  $\delta_{\text{H}}$  3.26 (1H) ve  $\delta_{\text{H}}$  3.17 (1H)
- 5 aromatik proton :  $\delta_{\text{H}}$  7.27 ~ 7.33 (3H) ve  $\delta_{\text{H}}$  7.09 ~ 7.13 (2H)

spektrumunda gözlenmektedir.

Üretim çalışmaları sonunda elde edilen kalıntı örnekleri, NMR spektroskopisi için Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü NMR laboratuvarına götürüldü. NMR Laboratuvarında Pulse NMR Spektrometre cihazı (Bruker mq 20 Minispec) ile analizler

yapıldı. Kalıntılar Dimetil Sülfoksit (DMSO) kullanılarak çözdürüldü ve cihaz tarafından analiz edilerek hem proton hem de karbon spektrumları elde edildi.

### **3.2.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Bassiatinin Kromatografik Saflaştırma Durumunun İncelenmesi**

Kromatografi, bir karışımın içinde bulunan bileşenleri, bunlara seçimsel ilgi gösteren iki ya da daha çok sistemler arasında farklı ilerleyişlerine bakarak tanımak, gerektiğinde niceliklerini belirlemek amacıyla yapılan ve ayırma işlemine dayanan analitik yöntemdir. Kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın olan bileşiklerden oluşan karışımları damıtma ve ayırmsal kristallendirme ile birbirinden ayırmak zor olabilir. Bu tür maddeler için çeşitli kromatografi yöntemleri kullanılarak başarılı ayrımlar yapılabilir.

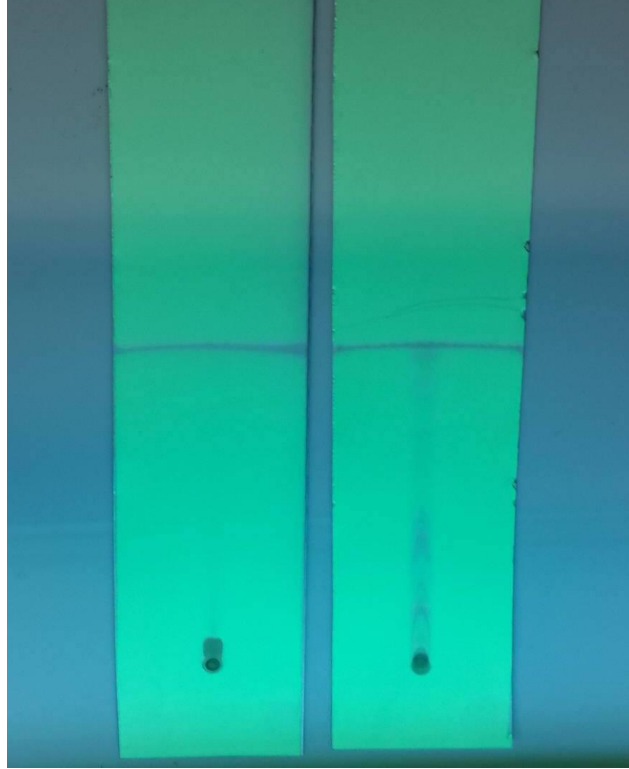
Klasik kromatografi, bir karışımın gözenekli bir ortamda, hareketli bir çözücü etkisiyle, karışım bileşenlerinin farklı hareketleri sonucu birbirinden ayrılması olgusuna dayanır. Hareket eden faza hareketli faz, bahsedilen gözenekli ortama ise adsorban veya sabit faz denir.

Kromatografi farklı şekillerde gerçekleştirilebilir. İnce tabaka ve Kolon kromatografileri; Adsorpsiyon Kromatografisi temelinde olup hareketli fazda bulunan moleküllerin katı bir yüzeye yapışması ve ayırım yapılması şeklinde yürütülür.

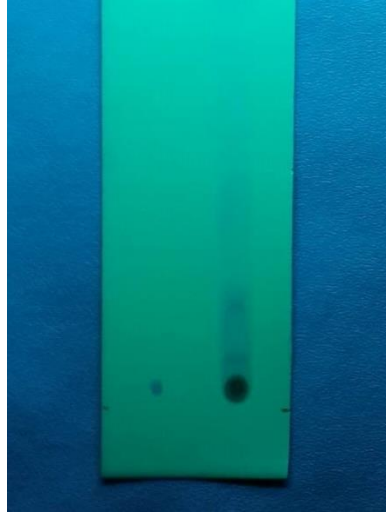
Bassiatinin ayrı bir bant oluşturma durumu ince tabaka kromatografisi ile incelendi. Bu bağlamda, TLC Silika jel F<sub>254</sub> (Merck) alüminyum yapraklar kullanıldı. Kagamizono ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [174], içinde bassiatinin de bulunduğu kalıntıdan beauvericini ayırmak için TLC kullanılmış ve bunun için CHCl<sub>3</sub>:MeOH (36:4) solventi kullanılmıştır. Ancak daha sonra bassiatini ayırmak için n-hekzan:etanol (37:3) solventi, HPLC’de kullanılmıştır. Her iki solventin bassiatin ayırımında uygunluğunu araştırmak için ayrı ayrı TLC yapıldı. TLC sırasında 10 µL madde, Hamilton şırıngası kullanılarak alüminyum yaprağın bir ucuna yüklendi. Maddenin yüklendiği yerler solvente değmeyecek şekilde tanklara yerleştirildi ve ağzı hava almayacak şekilde kapatıldı. Her bir solvent için ayrı tank kullanıldı. Maddenin ilerlemesini incelemek için solvent, tüm yaprak boyunca yürütüldü. TLC çalışması sonunda yapılan UV görüntülemelerde, CHCl<sub>3</sub>:MeOH (36:4) solventinde maddenin ilerlediği, n-hekzan:etanol (37:3) solventinde ilerleme olmadığı görüldü (Şekil 3.6.). Kullanılan CHCl<sub>3</sub>:MeOH solventinin ilerleme esnasında sürtünmeye neden olup olmadığını görmek için ise madde olmadan negatif kontrol olarak maddenin yanına yükleme yapılarak TLC gerçekleştirildi. Solventin herhangi bir sürtünmeye neden olmadığı görüldü (Şekil 3.7.). CHCl<sub>3</sub>:MeOH (36:4) solventinin kullanıldığı ince tabaka



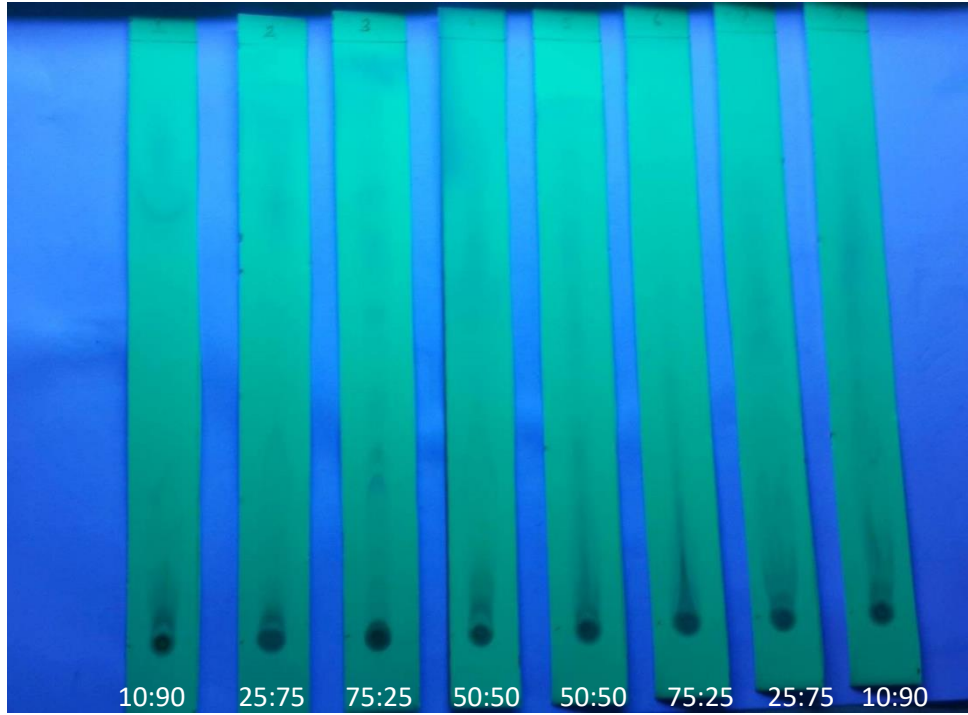
kromatografisinde sürtünme olmasına rağmen herhangi bir bantlaşma görülmemiştir. Bu nedenle değişik oranlarda hazırlanmış  $\text{CHCl}_3$ :MeOH ve n-hekzan:etanol solventleri kullanılarak 10 farklı ince tabaka kromatografi çalışması yapıldı (Şekil 3.8.). Yapılan çalışmalar sonucunda, UV altında  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (65:35) solventi kullanılan kromatografide hem bassiatin ayrı olarak tek bir bant halinde görüldü, hem de kolon kromatografisi için gereken uzaklıkta bantın ilerlemesi gerçekleşti (Şekil 3.9.). Dolayısıyla  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (65:35) solventi kullanılarak kolon kromatografisi yapılmasına karar verildi.



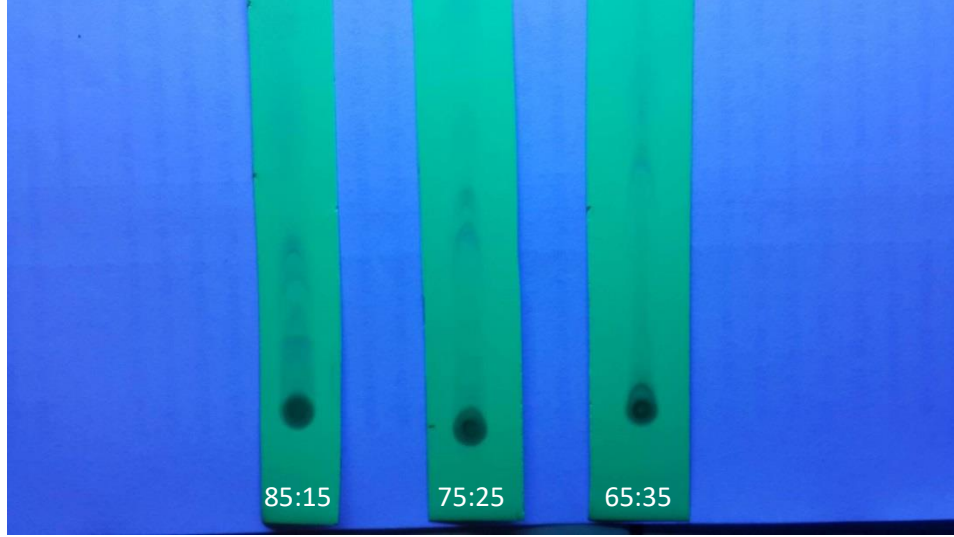
Şekil 3.6. Bassiatinin saflaştırılabilmesi için  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (36:4)(Sağda) ve n-hekzan:etanol (37:3)(Solda) solventleri ile yapılan ince tabaka kromatografisi (Fotoğraf: Erkay Özgör)



Şekil 3.7.  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (36:4) solventinin TLC sırasında sürtünmeye neden olup olmadığını incelemek için yapılan negatif kontrollü ince tabaka kromatografisi (Fotoğraf: Erkay Özgör)



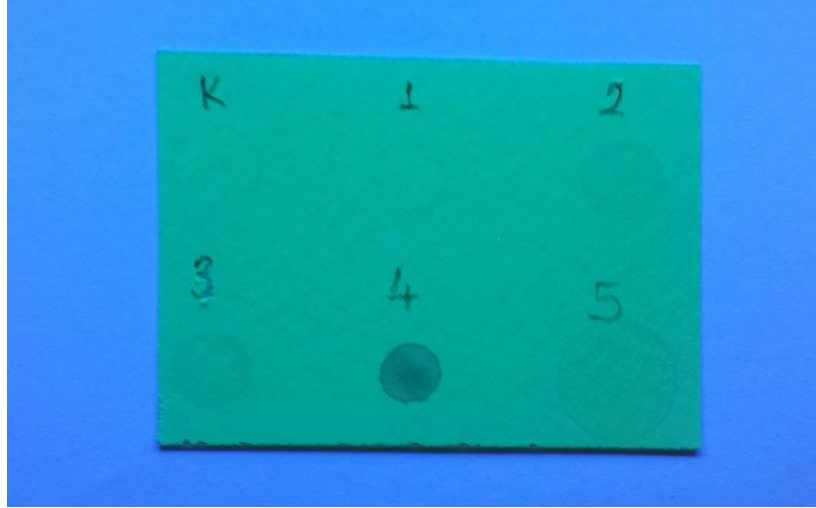
Şekil 3.8. Kolon kromatografisinde kullanılacak solventin tespit edilmesi için farklı oranlarda hazırlanan solventlerle yapılan ince tabaka kromatografisi. Soldan sağa ilk dört uygulama  $\text{CHCl}_3$ :MeOH'un farklı oranları, son dört uygulama ise n-hekzan: etanol'un farklı oranlarıdır (Fotoğraf: Erkay Özgör)



Şekil 3.9. Bassiatinin tek bir bant şeklinde elde edildiği ince tabaka kromatografisi (Fotoğraf: Erkay Özgör)

### 3.2.5. Kolon Kromatografisi Çalışmaları

Kolon kromatografisi ile bassiatinin saflaştırılmasına devam edildi. Kolon kromatografisinde, hareketli faz olarak ince tabaka kromatografisinde  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (65:35) solvent karışımı tespit edilmişti. Sabit faz olarak bassiatinin tutunacağı materyal Silika jel 60 A° (0,015-0,040 mm, Merck) olarak seçildi. Kolon kromatografisinde silika jel,  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (65:35) solventi ile karıştırılarak macun kıvamına getirilmektedir. Daha sonra bu karışım, sephadex ile yapılan elüsyonda kullanılan kolona yüklendi. Kolona biraz solvent eklenip yapının stabilizasyonu sağlandı. Kromatografi için hazır olan kolona, içinde bassiatinin bulunduğu kalıntı eklenerek ilerlemesi incelendi. İlerlemenin sonunda bassiatinin kalın bir bant halinde kolonda ayrıldığı görüldü. Bantın önünde ve arkasında diğer maddeler sürüntü halinde dağıldı. Bassiatinin ayrı bir tüpte toplanması için, kolona  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (65:35) solventi yavaş yavaş eklendi ve kolondan çıkan ürünler ayrı ayrı eppendorf tüplerde toplandı. Bassiatinin elde edildiğini göstermek için, üzeri selüloz kaplı kromatografi yaprağından bir parça kesilerek her tüpten yükleme yapıldı. Kontrol olarak  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (65:35) solventi kullanıldı. UV altında yapılan görüntülemeye 4 numaralı tüpte bassiatinin daha saf bir şekilde elde edildiği görüldü (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Bassiatinin toplandığı tüpün UV altında görüntülenmesi (Fotoğraf: Erkay Özgör)

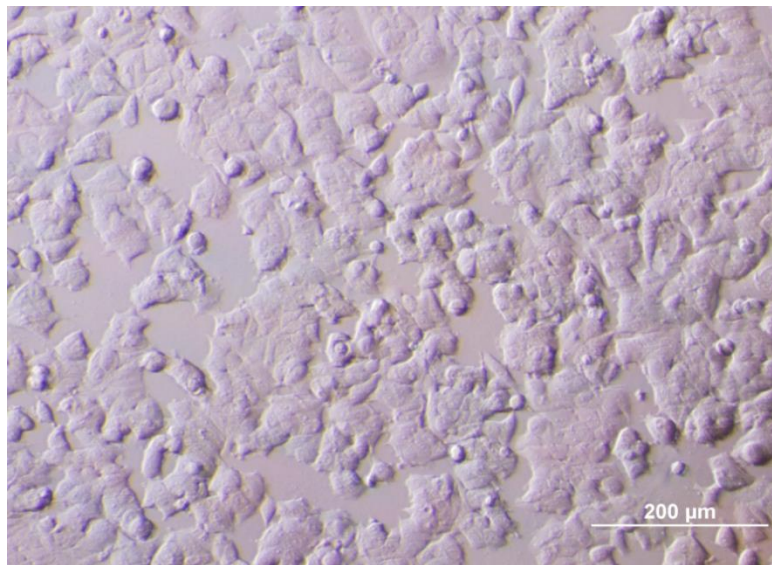
### 3.2.6. Bassiatinin Preparatif HPLC ile Saf Olarak Elde Edilmesi

Kolon kromatografisinden elde edilen madde, Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Fizikokimya Laboratuvarında bulunan Preparatif HPLC cihazı kullanılarak incelendi ve bassiatinin saf halde verimli bir şekilde elde edilmesi için çalışmalar yürütüldü. Bu kapsamda, Kromasil 100-5-C18 (4.0 × 100 mm) kolonu satın alındı. Bu kolon, önceki çalışmalarda Bassiatinin saflaştırılması için kullanılan kolon türüdür. Kolondan maddeyi elde etmek için Metanol:Su karışımı (80:20) bir solvent hazırlandı. Çalışmada kullanılacak Preparatif HPLC (Agilent Technologies, 1260 Infinity), maddeyi tespit edip toplanmasına imkan veren bir sistemdir. Kolon, solvent kullanılarak şartlandıktan sonra 100 µL madde cihaza yüklendi. Cihazda 98 bar basınçta 4ml/dakikada solvent yürütüldü. Cihaza yüklendikten sonra tespit kısmından geçen madde 4 farklı pik verdi. Üçüncü pikin olduğu kısım en yoğun maddenin elde edildiği kısım olduğundan toplayıcı kısımda toplandı. Böylece Bassiatin saf olarak elde edildi.

### 3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında meme kanseri epitel hücre hattı olarak MCF-7, sağlıklı meme epitel hücresi olarak ise SVCT hücre hatları seçilmiştir. Sitotoksiste çalışmaları sırasında MCF-7 kanser hücre hattı ile diğer meme kanser hatlarını reseptör özellikleri açısından karşılaştırmak için MDA-MB-231 ve SK-BR-3 meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattı ER + (Estrogen Receptor +), MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hattı ise ER - özelliktedir. Ayrıca, MDA-MB-231 hücre hattı PR - (Progesterone Receptor -), HER2- (Herceptin 2 -) iken SK-BR-3 hücre hattı ise PR -, HER2 + özelliktedir. Sitotoksiste çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre bu özellikler üzerinden değerlendirme yapılacaktır.

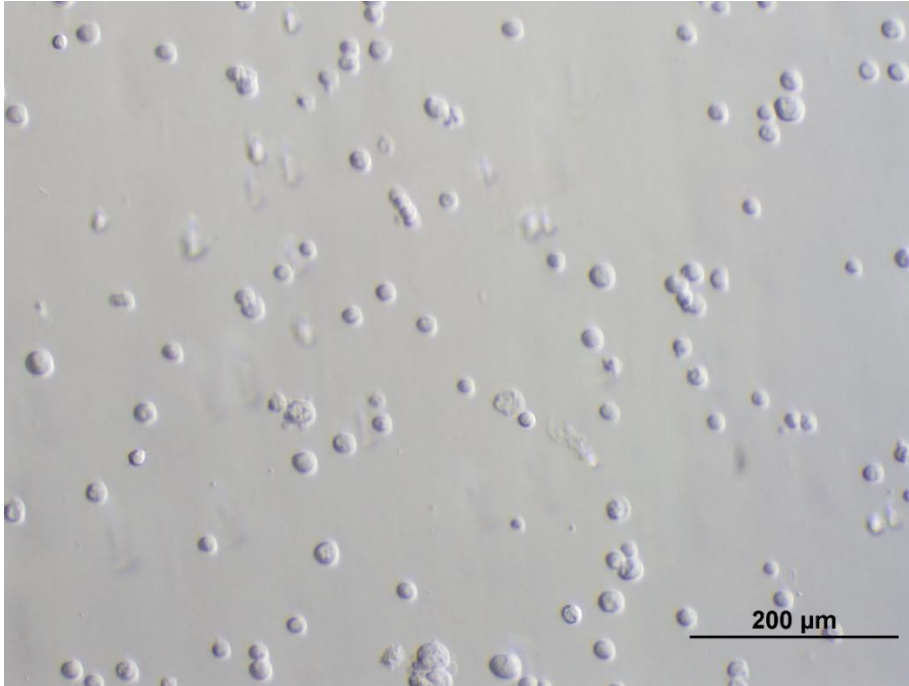
Çalışmada kullanılacak MCF-7 kanser hücre hattı, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Hücre ve Virüs Bankası Bölümünden temin edilmiştir. Hücre Kültürü Koleksiyonu (HÜKÜK) Hücre kültürü kullanım protokolü ve bilgi formu, MCF-7 hücre hattı ile beraber verilmiştir. Hücre kültürü kullanım protokolü de göz önüne alınarak hücrelerin üretimi ve stoklanması gerçekleştirilmiştir. Şap Enstitüsü'nden üreyen kültür halinde 25 cm<sup>3</sup> hacimli flasklarla alınan MCF-7 hücre hattı, hemen hücre kültürü laboratuvarına getirildi. Kısa süre %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda bekletildikten sonra, hücrelerin tripsinizasyon yöntemi ile pasajları yapıldı. Bunun için kültür kabındaki besi ortamı uzaklaştırıldı ve serumun tripsin üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırmak için kabın yüzeyi %0.25 tripsin-10m EDTA çözeltisi ile yıkandı. Yıkama işlemi sonunda kültür kabının yüzeyini kapatacak miktarda tripsin (25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına 0.5 ml) ortama eklenip hücrelerin yüzeyden ayrılması için 37°C'de 5 dakika süreyle inkübatörde beklendi. Bu sürenin sonunda, hücreler kültür kabı yüzeyinden tamamen ayrılarak besi ortamı ile 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Daha sonra bu tüpler 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek pelet kısmı besi ortamı ile süspansiyon haline getirildi. Hücreler 4'e bölünüp yeni besiyeri ile süspanse edilerek standart koşullarda (% 5 CO<sub>2</sub>, 37°C) inkübe edildi. MCF-7 hücre hattı için kullanılan besi ortamı; DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + %10 FBS + penisilin + streptomisin içermektedir. Hücreler 24 saat inkübasyondan sonra inverted mikroskop (Olympus, 1 × 70, Japan) altında görüntülendi (Şekil 3.11.). Hücre kültürleri yeterli yoğunluğa ulaştığı zaman, çalışmaya başlayana kadar -196°C'deki sıvı azot ortamında muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.



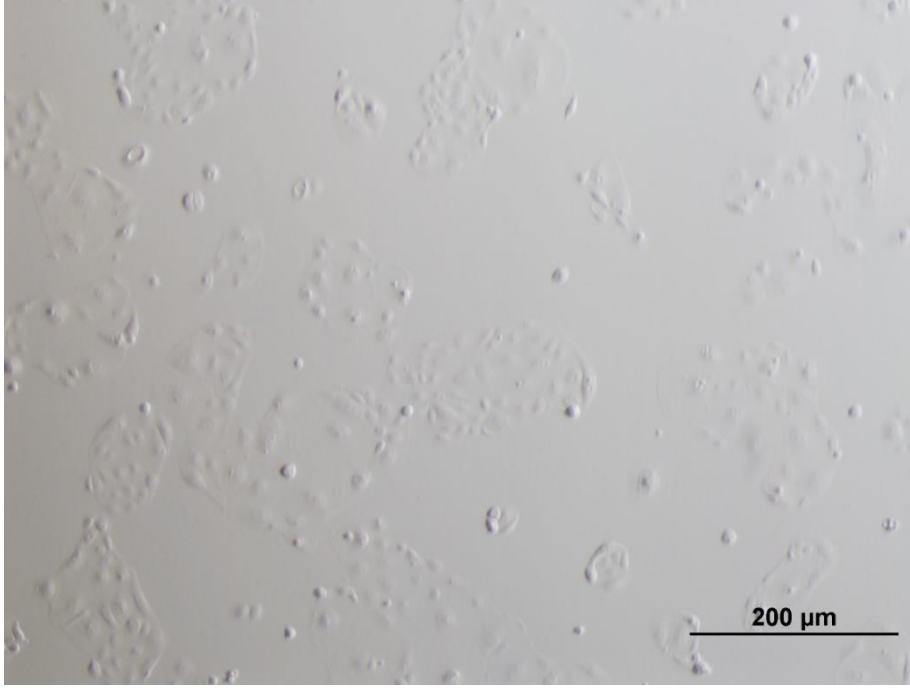
Şekil 3.11. MCF-7 hücre hattının 24 saatlik inkübasyon görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör)

SVCT hücre hattı, ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures)'tan satın alınmıştır. SVCT hücre hattı, insan meme epitel hücrelerinden oluşturulmuştur. GDO durumu, Genetiği değiştirilmiş organizmalar sınıf 1 olarak belirtilmektedir. Bunun dışında, Keratin 7,8 ve 18 ekspresyonu bakımından pozitifdir. Hücreler konfluent olduğu zaman kubbe şeklinde yapı oluşturmaktadır.

SVCT hücre hattı özel bir besi ortamına ihtiyaç duymaktadır. Besi ortamı; DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + % 10 Fetal Bovin Serum (FBS) + 2mM Glutamin + 5µg/ml Hidrokortizon + 10µg/ml İnsülin + penisilin + streptomisin içermektedir. Besi ortamı, hücre hattı elimize ulaşmadan hazırlanmış ve hücre hattı geldiğinde hemen üretime başlanmıştır. Bir kryovial tüp (2 ml) şeklinde kuru buz içerisinde elimize ulaşan SVCT hücre hattının protokolünde belirtildiği gibi 2-4x10,000 hücre/cm<sup>2</sup> olarak şekilde 3 tane 25 cm<sup>2</sup> kültür kabına ekim yapılmıştır (Şekil 3.12.). Hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşması için gün aşırı besi yeri değişimi yapılmıştır (Şekil 3.13.). Yoğunlaşan hücreler, tripsinizasyon yöntemi ile toplanmış ve tüplere aktarılarak uygun besi ortamı içerisinde dondurularak saklanmıştır.

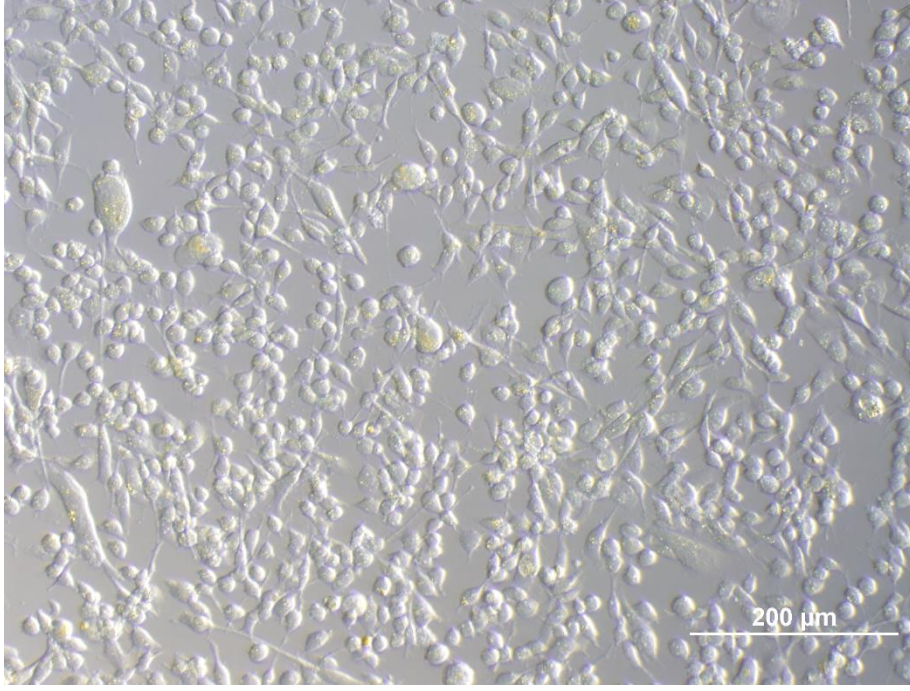


Şekil 3.12. SVCT hücrelerinin pasaj yapıldıktan sonra süspanse haldeki görünümü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör)

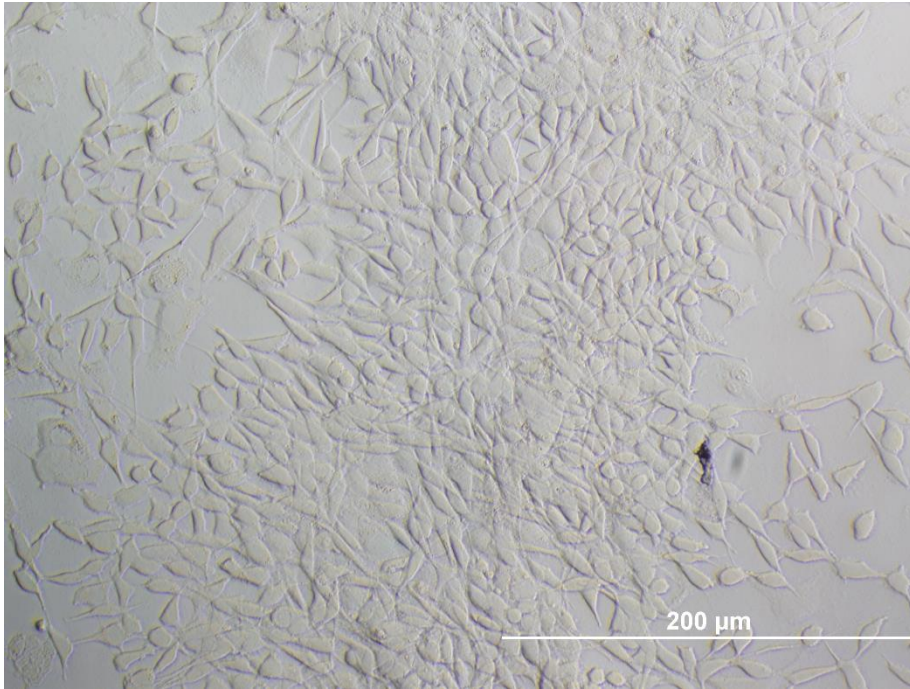


Şekil 3.13. SVCT hücrelerinin 24 saat inkübasyondan sonraki görünümü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)

Bassiatinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkisinin reseptörlerine bağlı olup olmadığı, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları kullanılarak değerlendirilmiştir. MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nden temin edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattı, MCF-7 için de kullanılan DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) + %10 FBS + penisilin ve streptomisini içeren besi ortamında çoğaltılarak stoklanmıştır (Şekil 3.14.). SK-BR-3 hücre hattı ise farklı bir besi ortamına ihtiyaç duymaktadır. SK-BR-3 hücre hattının besi ortamı için McCoy's 5A besi ortamı kullanılmıştır. Bu besiyerinin içerisine %10 FBS, penisilin ve streptomisin eklenmesi gerekmektedir (Şekil 3.15). Her iki hücre hattı da yeterli miktarlarda çoğaltılarak cryotüplere konulmuş ve -196°C'deki sıvı azot ortamında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.14. MDA-MB-231 hücre hattının 24 saatlik inkübasyon görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)



Şekil 3.15. SK-BR-3 hücre hattının 24 saatlik inkübasyon görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)

### 3.4. Hücre Canlılığı Testleri

Sitotoksosite çalışmaları, hücreler üzerinde maddelerin toksik olma özelliğinin incelendiği çalışmalardır. Günümüzde maddelerin hücreler üzerindeki toksik etkisi genellikle MTT tayini ile yapılmaktadır. MTT tayini, hücrelerin metabolik aktivitesini değerlendiren kolorimetrik bir yöntemdir. NAD(P)H-bağımlı hücre oksidoredüktaz enzimleri, belirli



koşullar altında canlı hücre sayısını yansıtmaktadır. Bu enzimler, bir tetrazolyum boya olan MTT'yi [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromit] mor bir renge sahip olan çözünmeyen formazana indirgeme yeteneğine sahiptir. Hücreler, toksisitesi incelenecek maddelerle muamele edildikten sonra MTT tayini yapılarak değerlendirilmektedir.

Tez çalışması kapsamında; elde edilen bassiatinin ve halihazırda meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen etken maddesinin MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki toksisitesi incelenmiş ve toksik dozlar belirlenmiştir. MCF-7 ve SVCT üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmalarından belirlenen toksik dozlar doğrultusunda MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları ile sitotoksosite çalışmaları yapılarak hücre hatları karşılaştırılmıştır. Bunun yanı sıra, günümüzde kanser tedavilerinde kombine ilaç tedavisi yaygınlaştığından 1:1 oranlarında hazırlanan Bassiatin ve Tamoksifen karışımı kombine maddenin de hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda, çalışma öncesinde istenilen miktarda üretilen hücre hatları, kültür kaplarından tripsinizasyon ile toplanıp santrifüj edilmiştir. Pelet kısım kullanılarak hücre süspansiyonu hazırlanmış ve süspansiyonundaki hücre sayısını belirlemek için hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için; 900 µL hücre süspansiyonu eppendorf tüpe aktarılarak üzerine 100 µL ticari Tripan mavisi (%0,5 w/v, Biochrom) eklenmiştir. Daha sonra Neubauer Lamı kullanılarak canlı hücre sayımı yapılmıştır.  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olarak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapılmıştır. 24 saat sonra kuyucuklardaki besiyerleri toplanarak üzerine bassiatin, tamoksifen ve kombine maddeleri eklenmiştir. Çalışmada kullanılacak her bir madde için farklı 96 kuyucuklu kültür kabı kullanılmıştır. Ayrıca 24, 48 ve 72 saatlerde MTT tayini yapılacağından her gün için de farklı kültür kapları hazırlanmıştır. Her madde için 15 farklı konsantrasyon hazırlanmış ve 6 tekrarlı sitotoksosite çalışmasında kullanılmıştır (Çizelge 3.4.). 96 kuyucuklu kültür kaplarında kalan 6 kuyucuk ise kontrol olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.16.).

Çizelge 3.4. Sitotoksosite testinde kullanılan maddelerin (Bassiatin, Tamoksifen ve Kombine madde) konsantrasyonları

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>Miktar (mg/mL)</b>
75	1,5
37,5	0,75
25	0,5
18,75	0,375
12,5	0,25
7,5	0,15
6,25	0,125
5	0,1
3,75	0,075
3	0,06
2,5	0,05
2	0,04
1,25	0,025
0,5	0,01
0,25	0,005

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	75						3,75					
B	37,5						3					
C	25						2,5					
D	18,75						2					
E	12,5						1,25					
F	7,5						0,5					
G	6,25						0,25					
H	5						K					

Copyright © 2009 Edita Aksamitbene

Şekil 3.16. Hücre hatları üzerindeki sitotoksosite çalışmaları için tasarlanan farklı konsantrasyonların uygulanış biçiminin gösterilmesi

Hücrelerdeki maddelere bağlı inhibisyonun floresan boyama ile görüntülenmesi için aynı konsantrasyonlarda kuyucuklar hazırlanıp her gün görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme için, Acridine Orange/Propidium Iodide (AO/PI) floresan boya karışımı (1:1) kullanılmıştır. Bu amaçla, görüntülenecek kuyucuklardaki sıvı ortam toplanarak kuyular PBS ile yıkanmıştır. Sonra üzerine 100 µL AO/PI eklenerek 20 saniye beklenmiştir. Boya toplandıktan sonra 10 saniye PBS ile yıkanan kuyucuklar görüntülenme için floresan mikroskobuna yerleştirilmiştir.

MTT analizinin yapılması amacıyla 500 mg MTT, 100 ml PBS içinde çözülerek stok MTT hazırlanmıştır. Her bir kuyucuk için 1:10 oranında MTT:Serum içermeyen besi ortamı olacak şekilde MTT çözeltisi hazırlanmıştır. Aşağıdaki yöntem uygulanarak MTT analizi yapılmıştır;

1. Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldı.
2. Her bir kuyuya 200 µL MTT:Besi ortamı çözeltisinden eklendi, 4 saat %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C koşullarında karanlıkta inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda MTT:Besi ortamı çözeltisi uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa içerisinde 0,05 N HCl bulunan 100 µL izopropil alkol eklendi. 570 nm'ye ayarlanmış ELISA cihazı (Biotek, µQuant) ile okuma yapıldı. Elde edilen veriler istatistiksel çalışmalarda kullanılmıştır.

### **3.5. Apoptotik Hücrelerin Propidium Iodide (PI) Floresan Boyası İle Tespiti ve Hücre Siklusu Analizi**

MCF-7 ve SVCT hücre hatlarının apoptozis durumu ve hücre siklusu analizi çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Akım Sitometri laboratuvarında yürütülmüştür. Apoptoz, PI floresan boyası kullanılarak tespit edilmiştir. Apoptozu ölçmek için, 24 ve 48 saatlik 37,5 mM bassiatin, tamoksifen ve kombine madde inkübasyonu sonrası  $1.5 \times 10^6$ /ml hücre üzerine 1 ml PBS ilave edilmiş, daha sonra hücrelerin üzerine 2 ml %99 saflıkta etanol damla damla vorteksenerek ilave edilmiş ve böylece hücreler sabitlenmiştir. Bir gece + 4°C'lik dolapta inkübasyon sonrası hücreler iki kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 70 µl RNase ve 100 µl PI ilave edilmiştir. 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildikten sonra akım sitometri cihazında (Beckman Coulter EPICS XLMCL, USA) 10.000 hücre sayılarak geç apoptozis ve hücre siklusu analizi yapılmıştır. Geç apoptozis için DNA fragmentasyonunu gösteren subG1 piki değerlendirilmiştir. Hücre siklusu değerlendirilmesinin de çalışmaya katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Hücre siklusu analizi ise G0/G1, Sentez ve G2/M oranları iki değişkenli histogramlardan Multicycle yazılım programı (Phoenix system, USA) kullanılarak hesaplandı [3,188]

### **3.6. Bassiatin'in ER, EGFR ve VEGFR Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi**

Bassiatin'in MCF-7 hücre hattında meme kanseri hücrelerinin gelişip büyümesini etkileyen faktörler olan Östrojen alfa ( $\alpha$ ), Epitelyal büyüme faktörü (EGF) ve Vasküler endotelyal büyüme faktörlerinin (VEGF) bağlandığı reseptörlerle etkileşimleri araştırılmış ve bu reseptörlerin kantitatif tayini ile hücrelerdeki miktarları karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Hücresel ekstraktlar, ticari kantitatif immünoassay kitleri kullanılarak ER alfa, EGFR ve VEGFR analizi için yapılmıştır. ER ailesi 2, EGFR ailesi 4, VEGFR ailesi ise 2 reseptörden oluşmaktadır. Östrojen reseptörleri  $Er\alpha$  ve  $Er\beta$  olup bu çalışmada  $Er\alpha$ 'nın ölçümü yapılmıştır. Daha önceki çalışmalar  $Er\alpha$  reseptörü ile yürütülerek doğru sonuçlara ulaşılmış ve özellikle meme kanseri hücrelerinde etkin rol oynadığı bilinen reseptör,  $Er\alpha$  olduğu için böyle bir tercih yapılmıştır [3]. EGFR (ErbB1), HER-2/neu (ErbB2), Her-3 (ErbB3) ve HER-4 (ErbB4), EGFR ailesinin reseptörleridir. ErbB2 gen amplifikasyonunun MCF-7 hücrelerinde bulunmaması ve EGF'nin en çok etkilediği reseptör olması nedeniyle EGFR (ErbB1) reseptörü çalışmalarda tercih edilmiştir [189]. VEGFR ise 1 ve 2 olmak üzere iki reseptöre sahiptir. Bu reseptörlerden en çok çalışılan VEGFR 2 olduğu için, bu reseptörle çalışmalar yürütülmüştür [190].

ER alpha'nın kantitatif olarak ölçümünde, satın alınan ELISA kitinin protokolüne uygun olarak (Abcam 128499) çalışma yürütülmüştür. Bu aşamada nükleer ekstrakt kullanılmıştır. Nükleer ekstraktı hazırlamak için ilk önce hücreler soğuk PBS/PIB (Fosfataz inhibitör tamponu) ile yıkandı ve 15 ml'lik bir tüpe transfer edilerek 4°C, 300 × g 'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelet kısmı 1 ml Hipotonik tamponu (HB) kullanılarak bir önceki işlem sırasından geçirildi ve son elde edilen pelet 10 µl lizis tamponu ile yeniden süspanse edilerek santrifüj edildi (14000 × g, 10dk). Bu işlemle elde edilen süpernatant, nükleer ekstraktı oluşturmaktadır. Nükleer ekstraktı oluşturma aşamasında hem deney kontrolü olan muamele edilmeyen hücreler kullanılmış hem de bassiatin, tamoksifen ve kombine maddeyle ayrı ayrı muamele edilen hücrelerin nükleer ekstraktları elde edilmiştir. ELISA testine geçildiği zaman, yine üreticinin protokolü baz alınarak ER Alpha ölçümü yapılmıştır. Bu aşamada deneye hazır kit içerisinde tedarik edilen mikropklara, içinde 50 µg nükleer ekstraktı bulunan dilüsyon tamponu eklendi ve her bir nükleer ekstraktı için örnek kuyuları hazırlandı. Üretici firmanın kitinde bulunan MCF-7 nükleer ekstraktı, pozitif kontrol olarak kontrol kuyularına eklendi. Oda sıcaklığında çalkalamalı platformda 1 saatlik inkübasyondan sonra her kuyucuk 3 kez 1 × yıkama tamponu ile yıkandı ve üzerlerine primer antikorlar eklendi (50 µl Erα antikor). Yine çalkalamalı platformda 1 saatlik inkübasyondan sonra her kuyucuk 3 kez 1 × yıkama tamponu ile yıkanarak 50 µl HRP-konjuge antikorlar ile muamele edildi. Bir önceki işlem tekrar uygulanarak 100 µl ilerleme solüsyonu ile kolorimetrik reaksiyon incelendi. Daha sonra 100 µl duraklama solüsyonu ile işlem sonlandı. Bu aşamada asidin varlığı mavi rengin sarıya dönmesi ile belirlenmektedir. Absorbansı okumak için ELISA cihazı kullanılarak 450 nm'de ölçüm yapıldı. Bu kit kullanılarak yapılan doğrulama çalışmalarında üretici firmanın elde ettiği sonuçlar referans olarak değerlendirildi.

EGFR ve VEGFR'nin kantitatif olarak belirlemede de ticari ELISA kitleri kullanılmıştır (Abcam 192148 ve Abcam 193764). Her ikisinin de hücre ekstraktı hazırlama ve ELISA deney protokolü aynıdır. EGFR ve VEGFR için hücre ekstraktı hazırlamada, tutunan hücrelerden direkt lizis yolu tercih edilmiştir. Buna göre; tüm deney grupları (bassiatin, tamoksifen ve kombine madde muamele edilmiş) ve kontrol hücre kültürlerinden besi ortamı uzaklaştırılarak tutunan hücreler, 2 kez PBS ile yıkandı. Hücrelere, soğuk 1 × hücre ekstraksiyon tamponu eklendi ve mikrofüj tüpüne sıyrılarak 15 dakika buzda bekletildi. 4°C, 18000 × g'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı (Hücre ekstraktı) deney için kullanıma hazır olmuştur. Her hücre ekstraktından 50µl, kit içerisinde verilen kullanıma hazır mikropklarda belirlenen kuyulara konuldu. Her kuyucuğa ise 50µl antipodi karışımı

eklendi. 1 saat oda sıcaklığında 400 rpm hızında çalkalamalı platformda inkübe edildi ve her kuyucuk yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa 100 µl TMB substratı eklenerek 10 dakika karanlık ortamda 400 rpm'lik çalkalamalı platformda bekletildi. Her kuyucuğa eklenen 100 µl'lik durdurma solüsyonu ile deney sonlandırıldı ve 450 nm'de optik dansite değerleri elde edildi. Tüm ELISA çalışmalarından elde edilen verilerin karşılaştırılması, grafikler üzerinden yapıldı.

### **3.7. İstatistiksel Çalışmalar**

MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde Bassiatin, Tamoksifen ve kombine maddelerin etkilerinin değerlendirilmesi istatistiksel çalışmalarla gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları ile MCF-7 ve SVCT hücre hatlarının karşılaştırılmasında da istatistiksel çalışmalar yapılmıştır. İstatistiksel testler, genellikle “parametrik testler” ve “parametrik olmayan testler” olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Çalışmalardan elde edilen verilerin bu testlerden hangisine uygun olduğunu belirlemek için normallik testi yapılmaktadır. Eğer veriler normal dağılıma sahip ise parametrik testler, veriler normal dağılıma sahip değil ise parametrik olmayan testler ile karşılaştırmalar yapılmaktadır. Çalışmalardan elde edilen verilerin bu testlerden hangisine uygun olduğunu belirlemek için normallik testi yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda veriler normal dağılıma sahip olmadığından parametrik olmayan testlerle karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar için SPSS 13,0 Yazılım programı kullanılmıştır. Gerek hücre hatları arasındaki karşılaştırmalarda gerekse zaman ve madde konsantrasyonları karşılaştırmalarında, çoklu karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis testi kullanılırken ikili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Fungus Türlerinin Bassiatin Üretimi Açısından Değerlendirilmesi

Bassiatin üretimi için seçilen *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* ve *Fusarium oxysporum*, 2 farklı üretim ortamında inkübasyona bırakılmış ve üretim sıvıları elde edilmiştir (Şekil 4.1.). İnkübasyon sonrası üç fungus türünün de her iki besiyerinde ürediği gözlenmiştir. Üretim sıvıları kullanılarak filtrasyon, ekstraksiyon, evaporasyon ve elüsyon (Sephadex G25 ile) aşamaları sonunda kalıntılar elde edilmiştir. Türlerden elde edilen kalıntılar değerlendirilecek olursa;

- *Paecilomyces fumosoroseus*, her iki üretim ortamında da üremesine rağmen bu üreme hem geç evrelerde gerçekleşmiş hem de yoğunluk olarak çok az miktarlarda olmuştur. Elüsyon aşamasından sonra da herhangi bir kalıntı elde edilmediğinden *Paecilomyces fumosoroseus*'un bassiatin üretimi için uygun bir tür olmadığına karar verilmiştir.
- *Fusarium oxysporum*, her iki üretim ortamında üremesine karşın 2. besiyeri üretim sıvısından elüsyon sonunda herhangi bir kalıntı elde edilmemiştir. 1. besiyeri üretim sıvısından elüsyon sonucunda kalıntı elde edilmiş ve NMR spektroskopisi için +4°C'de stoklanmıştır.
- *Beauveria bassiana*, her iki üretim ortamında da üremiştir. Fakat 2. besiyeri üretim sıvısından elüsyon sonunda çok az miktarda kalıntı elde edilmiştir. 1. besiyeri üretim sıvısından elüsyon sonunda yoğun miktarda kalıntı elde edilmiştir. *Beauveria bassiana*'nın 1. besiyeri ile üretiminden elde edilen kalıntı diğer kalıntılara göre en fazladır. Elde edilen kalıntılar, NMR spektroskopisi için +4°C'de stoklanmıştır.



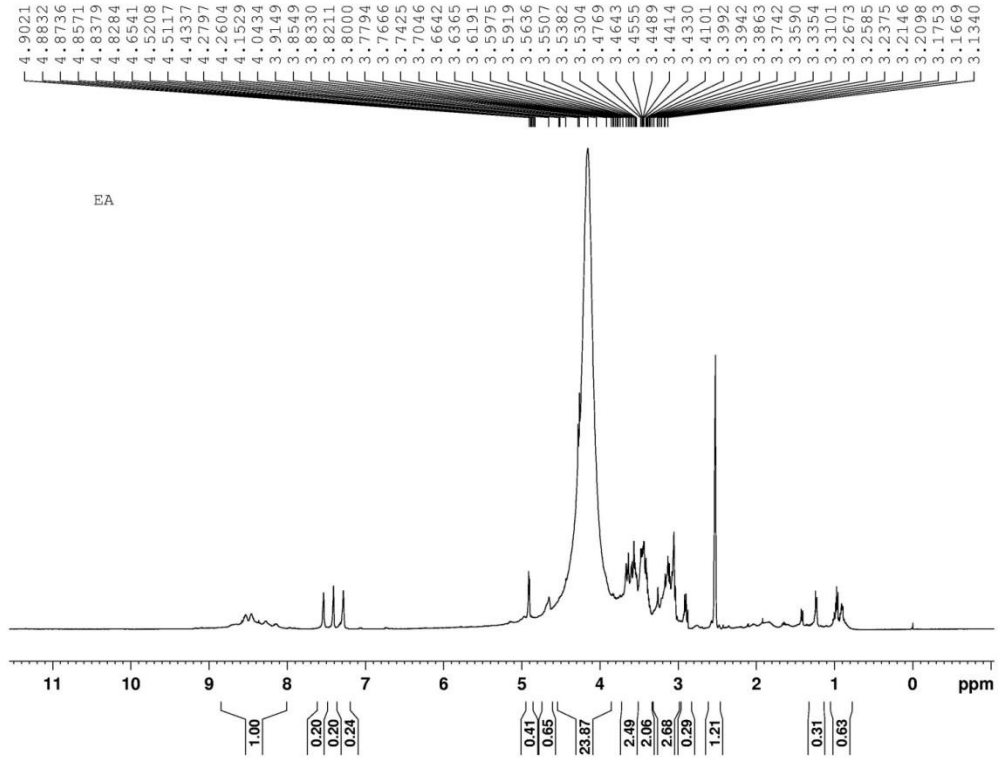
Şekil 4.1. Deney için seçilen fungus türlerinin 2 farklı üretim metodunda üretiminden sonra elde edilen kültür sıvıları (Fotoğraf: Erkay Özgör)

Elde edilen kalıntılar stoklanmadan önce tartılmıştır. *Beauveria bassiana*'nın 1. besiyeri ile üretiminden elde edilen kalıntı 6,8 mg, *Beauveria bassiana*'nın 2. besiyeri ile üretiminden elde edilen kalıntı 1,5 mg ve *Fusarium oxysporum*'un 1. besiyeri ile üretiminden elde edilen kalıntı 4,2 mg olarak bulunmuştur.

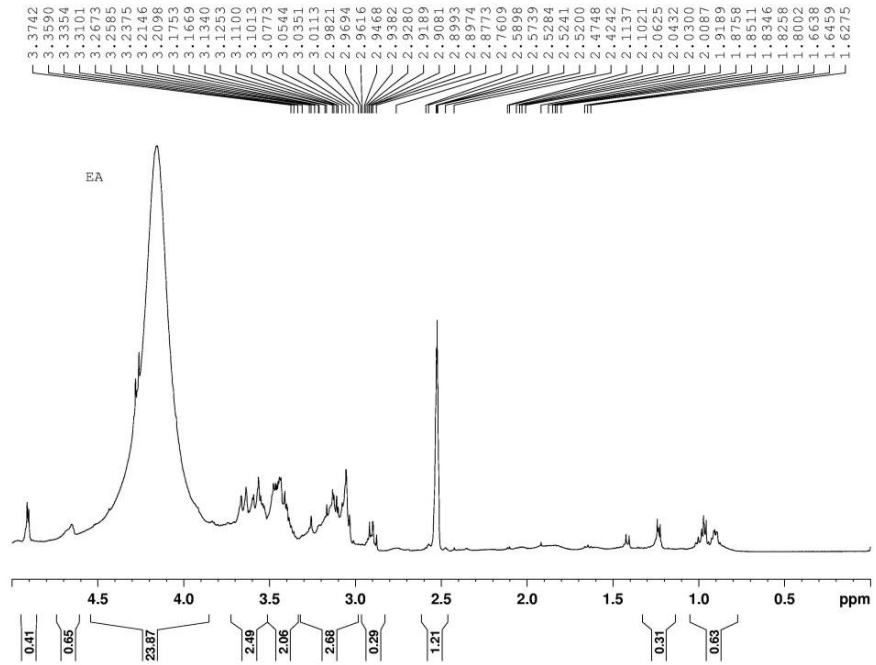
#### 4.2. Üretim Maddelerinin NMR Spektroskopisi İle Değerlendirilmesi

NMR Laboratuvarında Pulse NMR Spektrometre cihazı ile yürütülen çalışmalarda kalıntıların hem proton hem de karbon spektrumları elde edilmiştir. *Beauveria bassiana*'nın 2. besiyeri ile üretiminden elde edilen kalıntı DMSO ile çözdürülüp analiz edildikten sonra DMSO'ya ait spektrum piki ve birkaç farklı maddeye ait pikler dışında herhangi bir pik görülmediğinden dolayı bu kalıntı çalışma dışı bırakılmıştır. Çalışma sonunda; *Beauveria bassiana*'nın 1. besiyeri ile üretiminden elde edilen kalıntının  $H^1$  NMR ve  $C^{13}$  NMR spektrumları değerlendirilmiştir (Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.). *Beauveria bassiana*'nın hem proton hem de karbon spektrumları incelendiği zaman Bassiatinin elde edildiği görülebilmektedir. Her ne kadar saf olarak elde edilmemiş olsa da,  $H^1$  NMR sonuçları bassiatinin neredeyse saf olarak bulunduğunu ortaya koymuştur.  $H^1$  NMR sonuçları, kalıntı içerisindeki diğer maddelerin küçük ve basit yapıları ürünler olduğu için kolaylıkla ayırım yapılarak bassiatinin saf elde edilebileceğini göstermektedir.

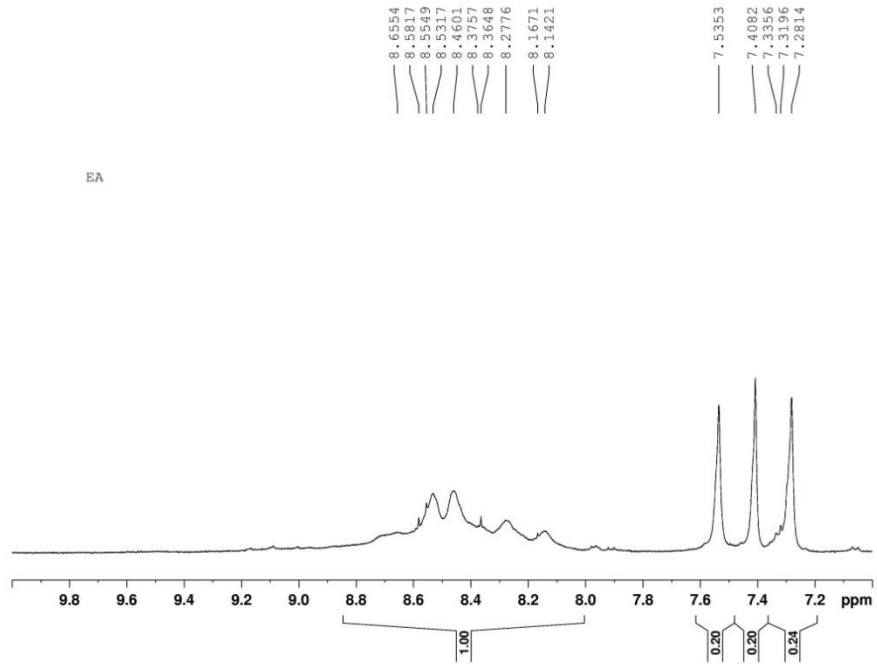




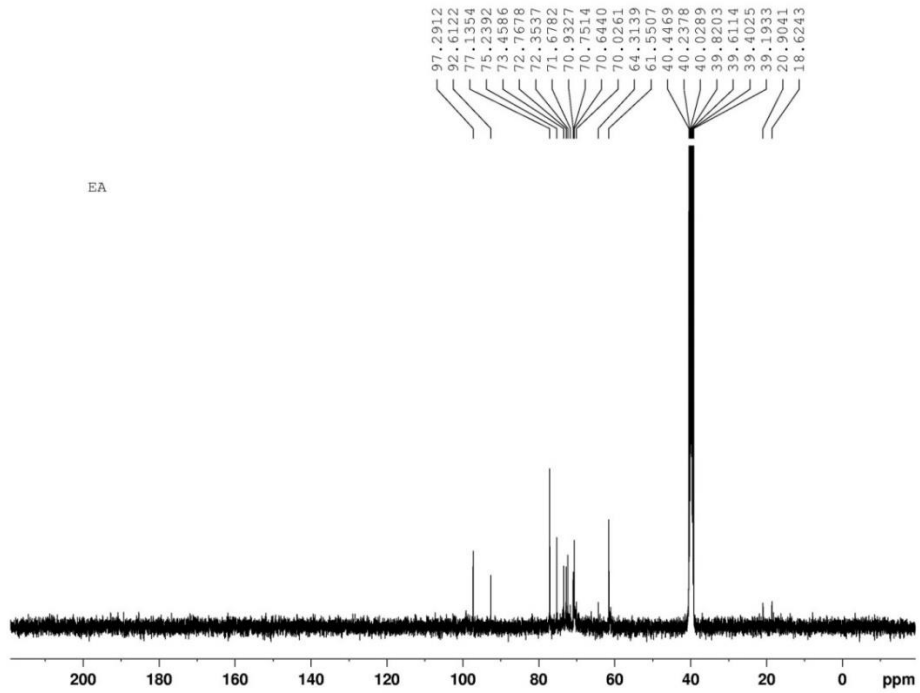
Şekil 4.2. *Beauveria bassiana* kalıntısının  $H^1$  NMR spektrumu (DMSO:  $\delta_H$  2.5 ve 4.0)



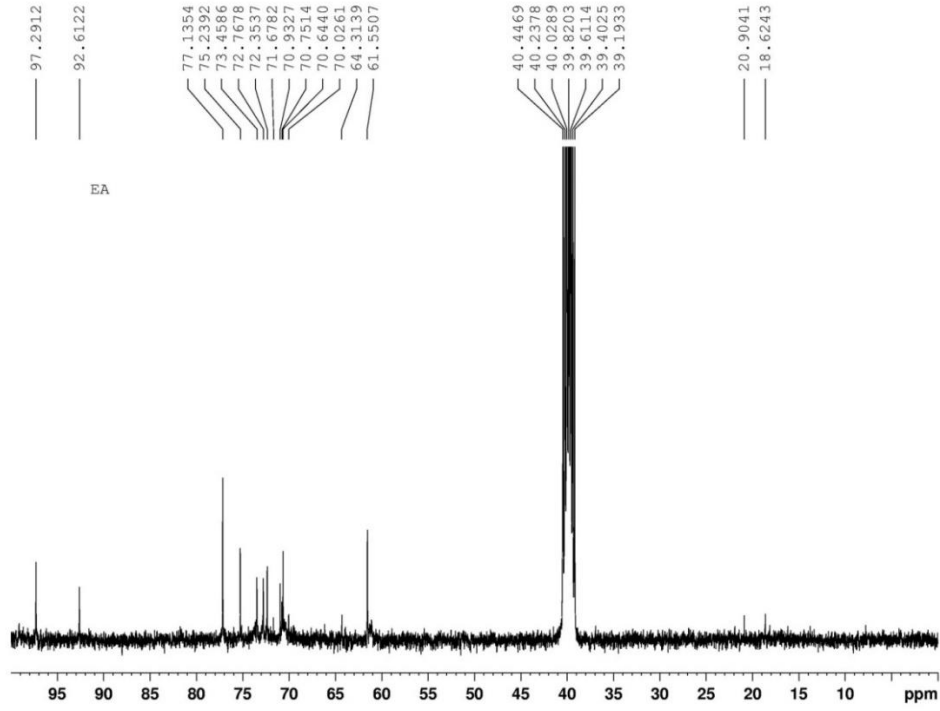
Şekil 4.3. *Beauveria bassiana* kalıntısının  $H^1$  NMR spektrumu (0-5 ppm arası)



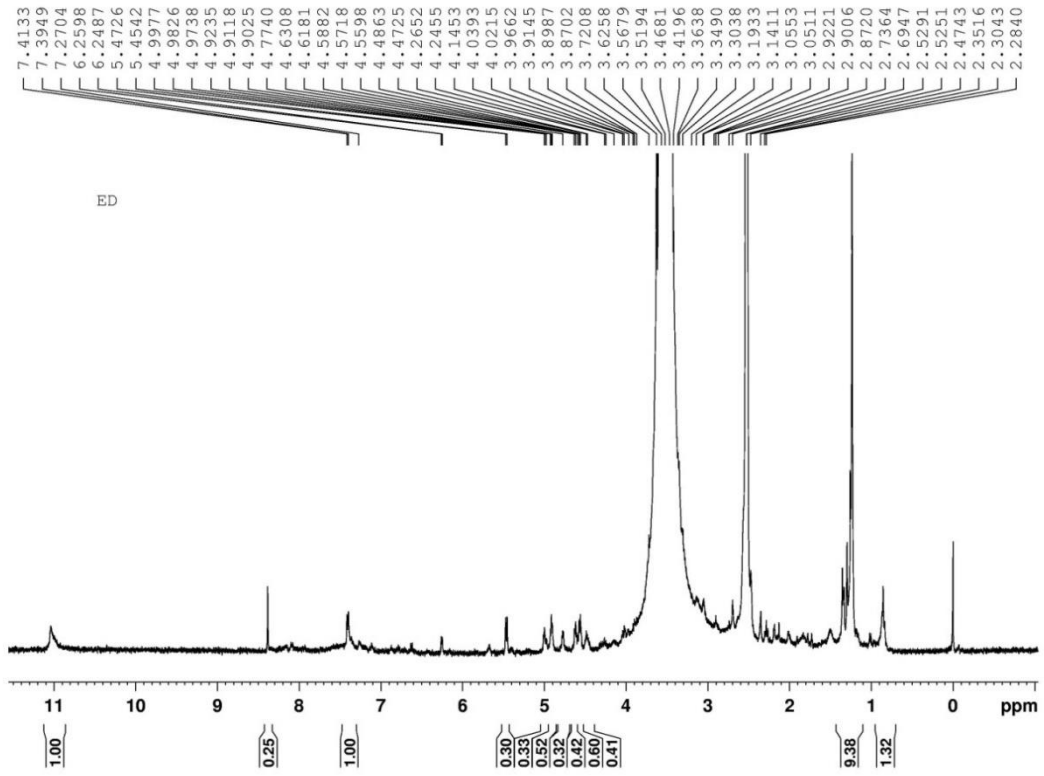
Şekil 4.4. *Beauveria bassiana* kalıntısının  $H^1$  NMR spektrumu (7-10 ppm arası)



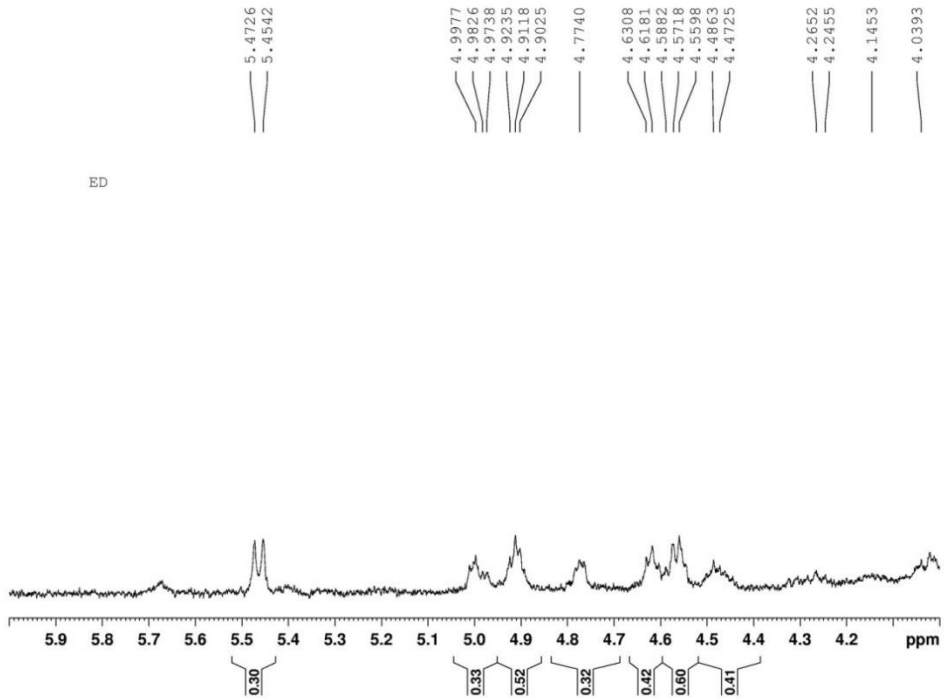
Şekil 4.5. *Beauveria bassiana* kalıntısının  $C^{13}$  NMR spektrumu (DMSO: $\delta_C$  39.52)



Şekil 4.6. *Beauveria bassiana* kalıntısının  $C^{13}$  NMR spektrumu (10-100 ppm arası)  
*Fusarium oxysporum*'un 1. besiyeri ile üretiminden elde edilen kalıntının  $H^1$  NMR spektrumları değerlendirilmiştir (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.) *Fusarium oxysporum*'un  $H^1$  NMR sonuçları incelendiğinde; Bassiatinin kalıntı içerisinde bulunduğu ancak saf olmadığı tespit edilmiştir. Diğer maddeler küçük ve basit yapıya karşın *Beauveria bassiana* kalıntısına göre diğer maddelerin miktarı daha fazladır. Ayrıca NMR spektroskopisinden önce, *Fusarium oxysporum* kalıntısının ağırlığı *Beauveria bassiana* kalıntısına göre daha düşük miktarda olması, Bassiatin'in daha az miktarlarda üretildiğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.7. *Fusarium oxysporum* kalıntısının  $H^1$  NMR spektrumu

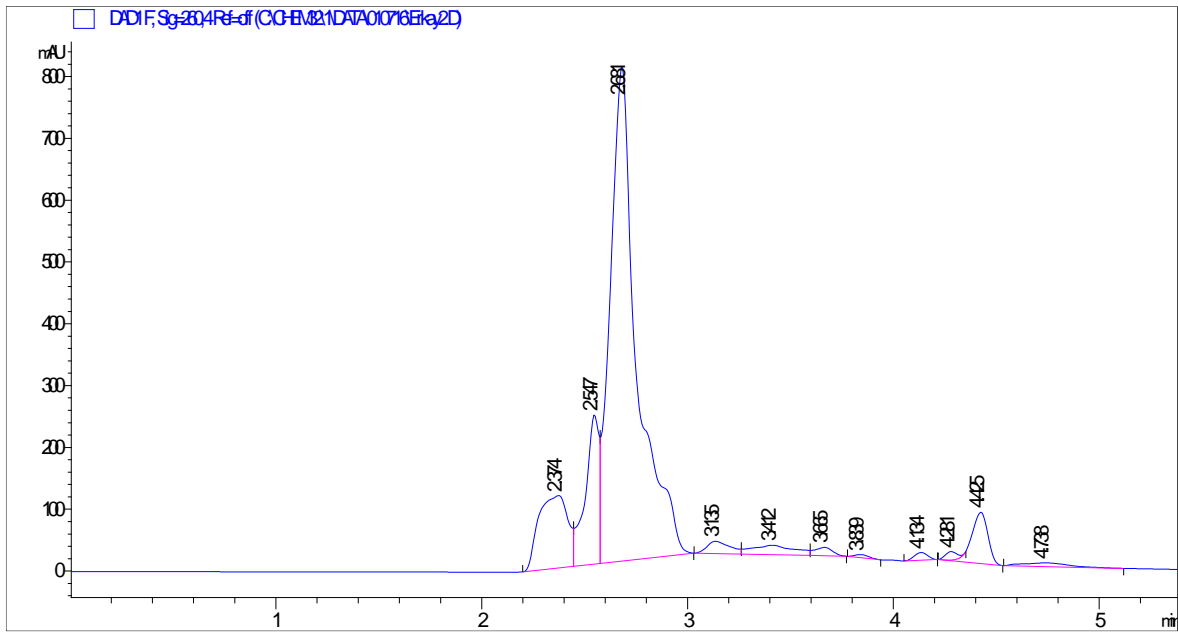


Şekil 4.8. *Fusarium oxysporum* kalıntısının  $H^1$  NMR spektrumu (4-6 ppm arası)

NMR sonuçları, Bassiatinin en verimli ve en yüksek miktarlarda *Beauveria bassiana*'nın 1. besiyeri ile üretiminden elde edilebileceğini ortaya koymuştur.

#### 4.3. Bassiatinin Preparatif HPLC ile Saf Eldesinin Değerlendirilmesi

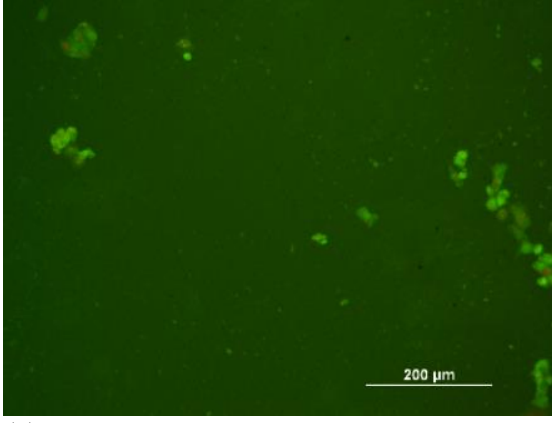
*Beauveria bassiana*'nın 1. besiyeri ile üretiminden elde edilen üretim sıvıları; filtrasyon, ekstraksiyon, evaporasyon ve elüsyon (Sephadex ve Silika ile) aşamalarının ardından Preparatif HPLC kullanılarak incelenmiş ve Bassiatinin saf halde verimli bir şekilde elde edilmesi için çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalar sırasında en yüksek elde edilen pik, bassiatinin bulunduğu aralıktır. Çalışmada gösterilen pik aralığı 2.681'inci dakikada görülmüş ve 800 mAU'dan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9.). En yüksek pik aralığından bir tüpe 1.251,67 µL ürün toplanmış ve üzerindeki solvent uçurulmuştur. Böylece bassiatin saf olarak elde edilmiştir.



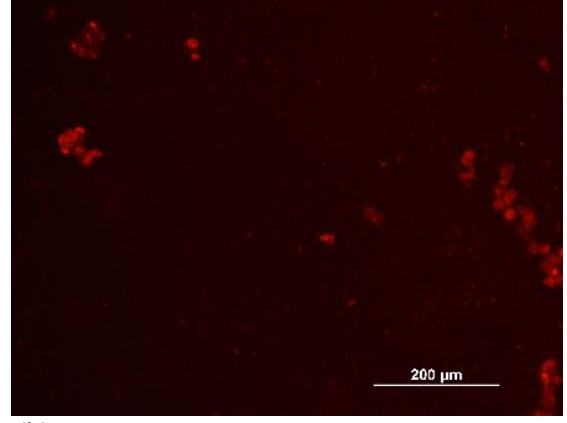
Şekil 4.9. Preparatif HPLC çalışması sırasında bassiatinin bulunduğu pik aralığının gösterilmesi

#### **4.4. Sitotoksosite Çalışmalarının Değerlendirilmesi**

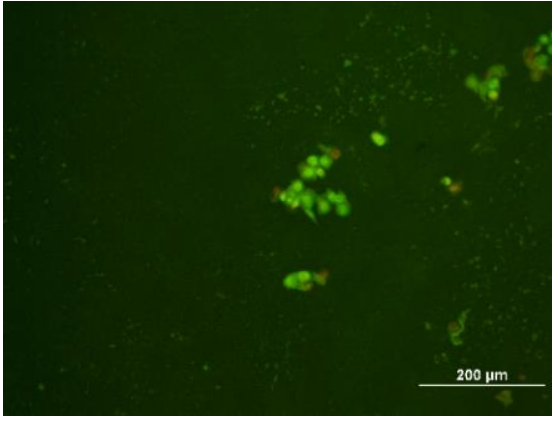
Bassiatinin MCF-7 ve SVCT hücre hatlarında toksisitesini değerlendirmek için yapılan çalışmalarda; bassiatin, tamoksifen ve kombine maddenin 15 farklı konsantrasyonu hücreler üzerine uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonrasında MTT analizleri yapılmıştır. Hücrelerdeki maddelere bağlı inhibisyonun Acridine Orange/Propidium Iodide (AO/PI) floresan boya karışımı kullanılarak floresan boyama ile görüntülenmesi yapılmıştır. MCF-7 hücre hattı üzerinde bassiatin, tamoksifen ve kombine maddenin inhibitör etkisi ve apoptotik hücreler, floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.). Aynı şekilde, SVCT hücre hattı üzerinde bassiatin, tamoksifen ve kombine maddenin inhibitör etkisi floresan mikroskobu ile görüntülenerek karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 4.17., Şekil 4.18., Şekil 4.19., Şekil 4.20., Şekil 4.21., Şekil 4.22. ve Şekil 4.23.).



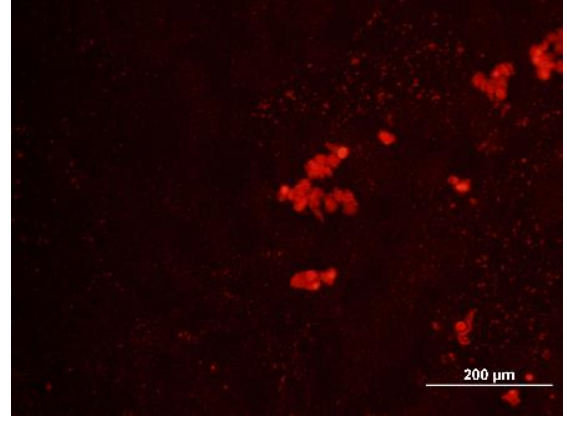
(a)



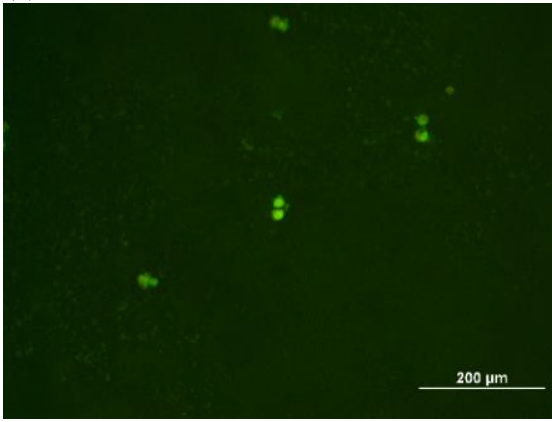
(b)



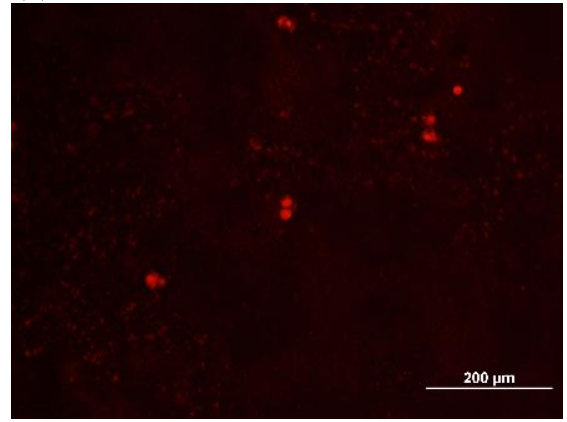
(c)



(d)

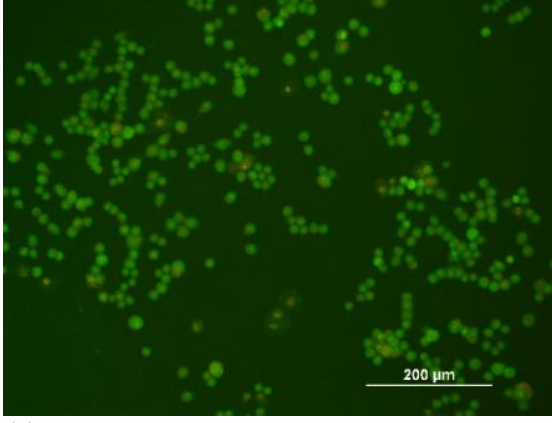


(e)

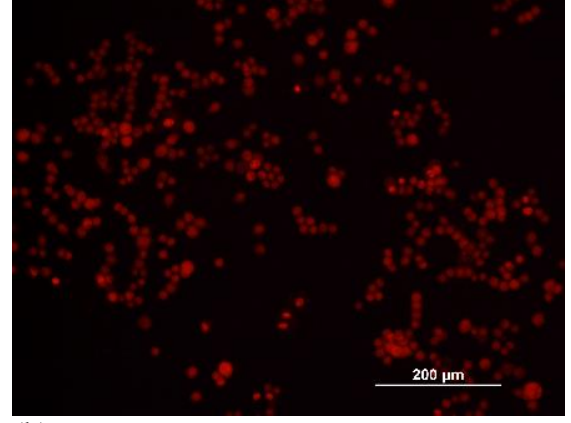


(f)

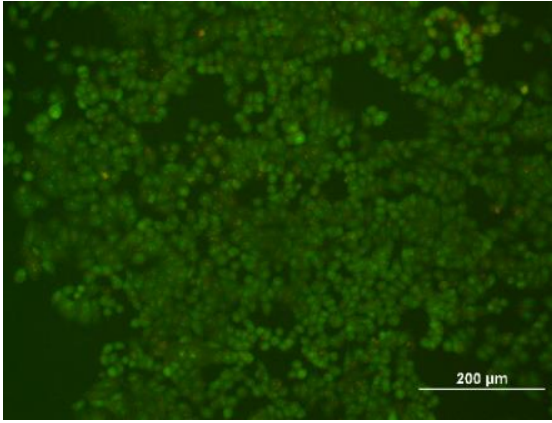
Şekil 4.10. 75 mM Bassiatin konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)



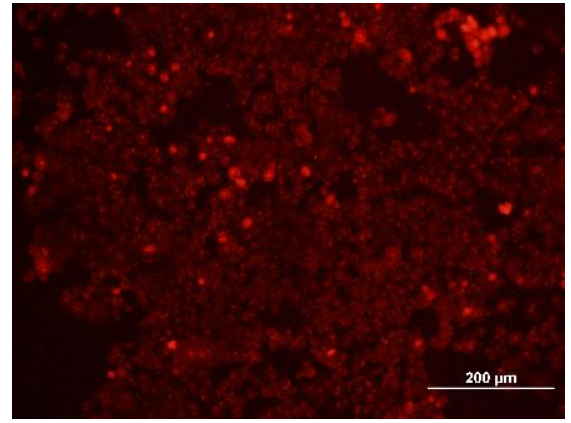
(a)



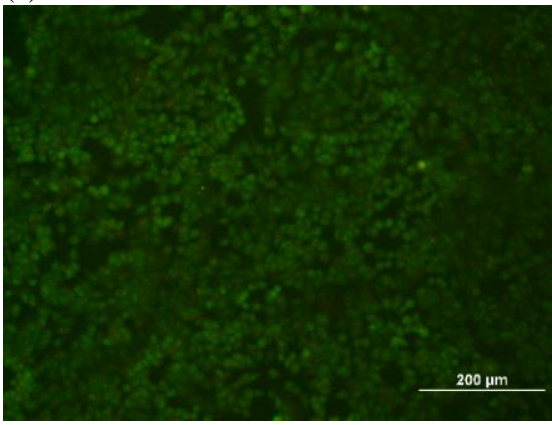
(b)



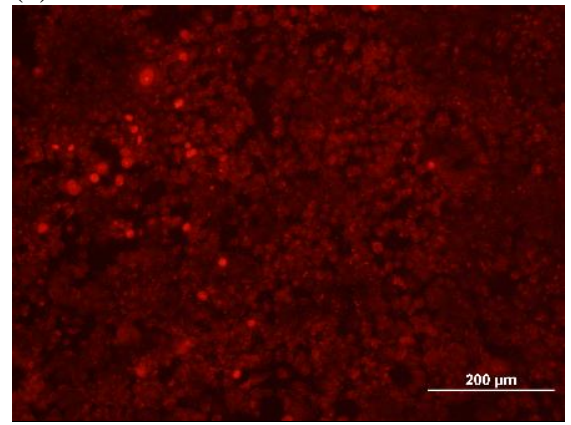
(c)



(d)



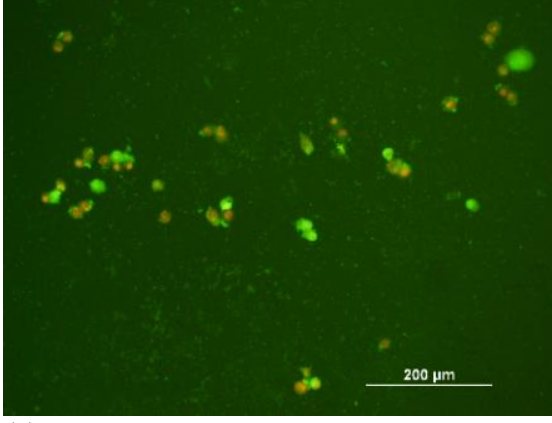
(e)



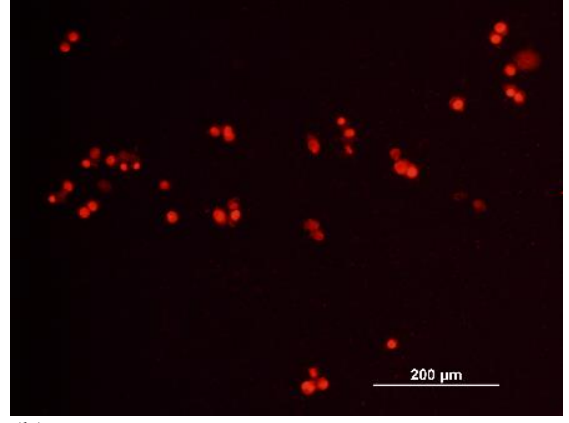
(f)

Şekil 4.11. 0,25 mM Bassiatin konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör)

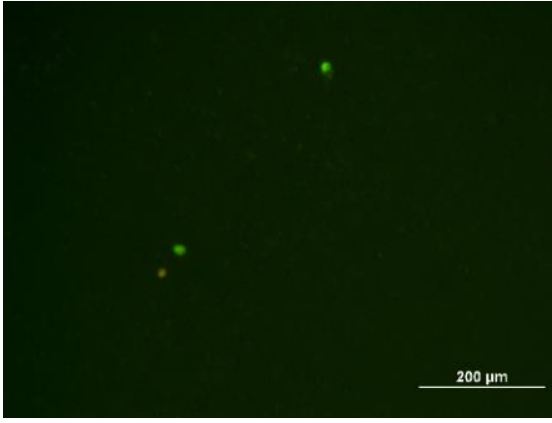




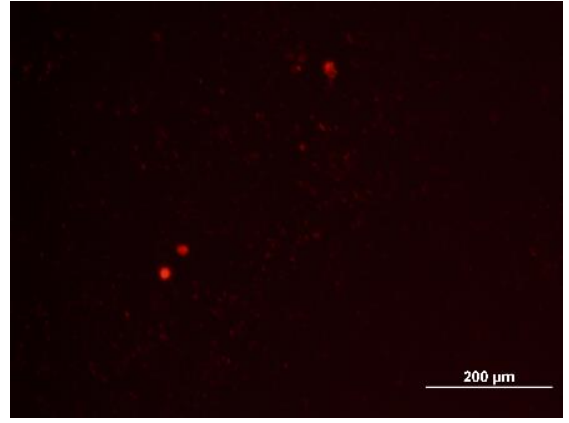
(a)



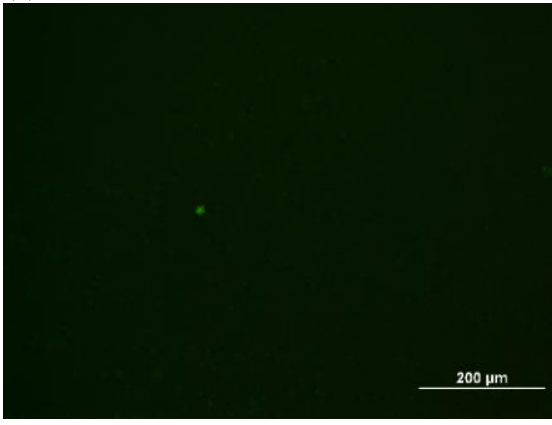
(b)



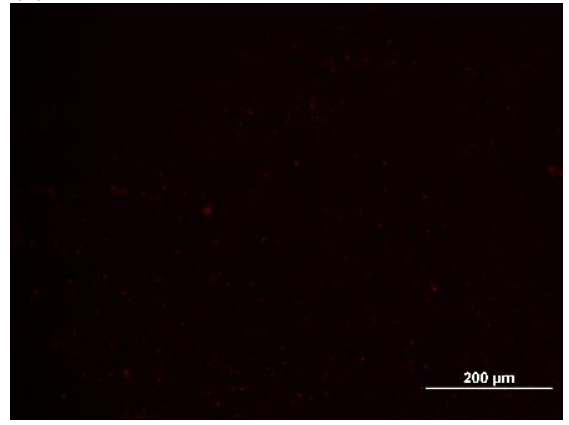
(c)



(d)

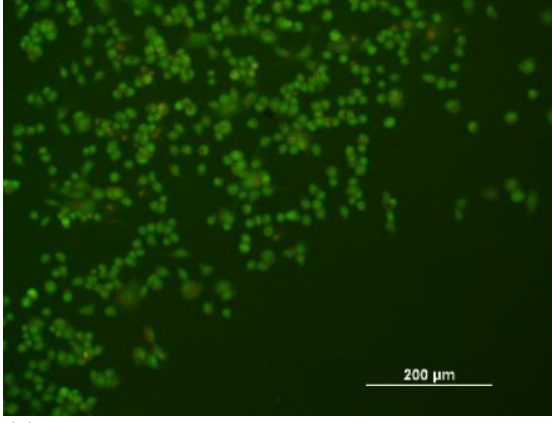


(e)

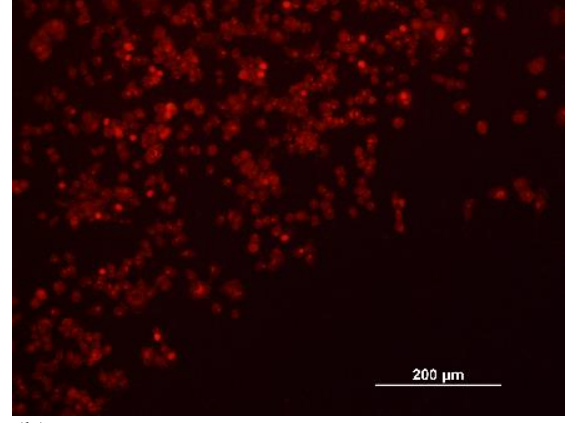


(f)

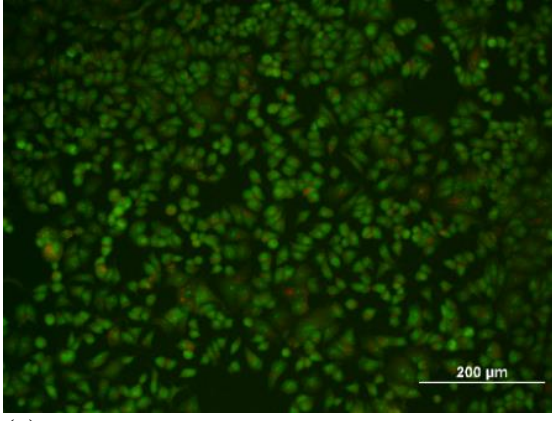
Şekil 4.12. 75 mM Tamoksifen konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör)



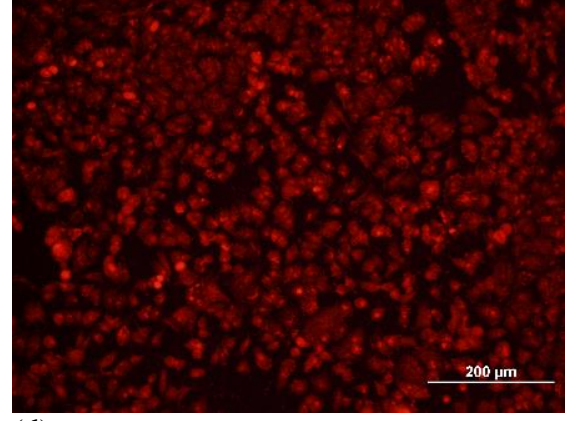
(a)



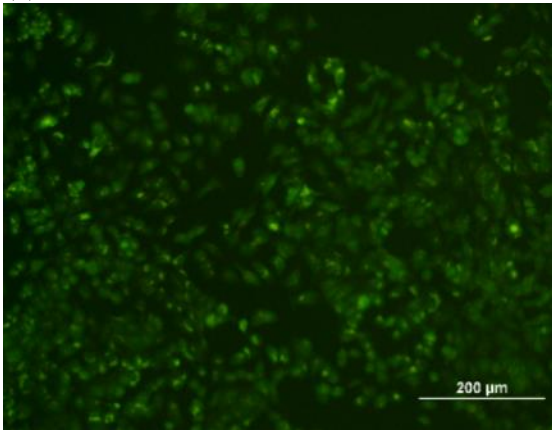
(b)



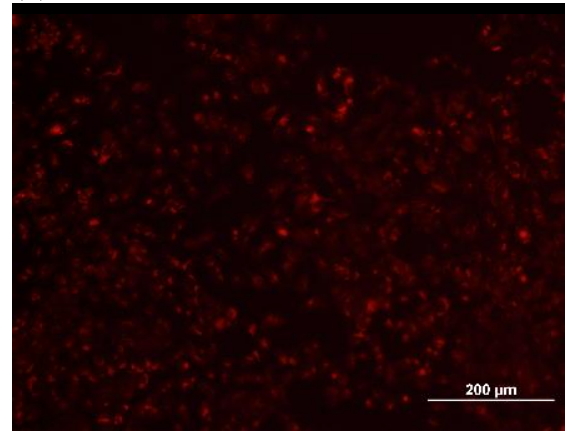
(c)



(d)



(e)



(f)

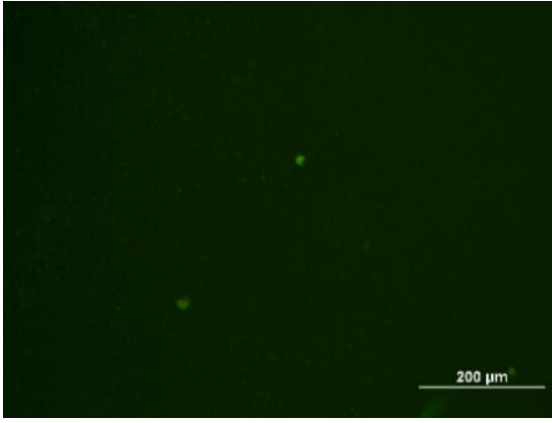
Şekil 4.13. 0,25 mM Tamoksifen konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)



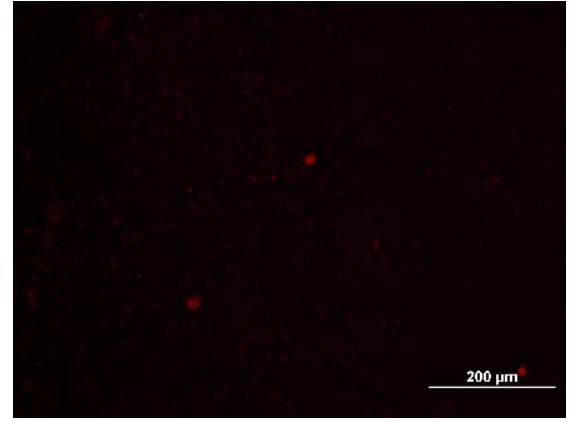
(a)



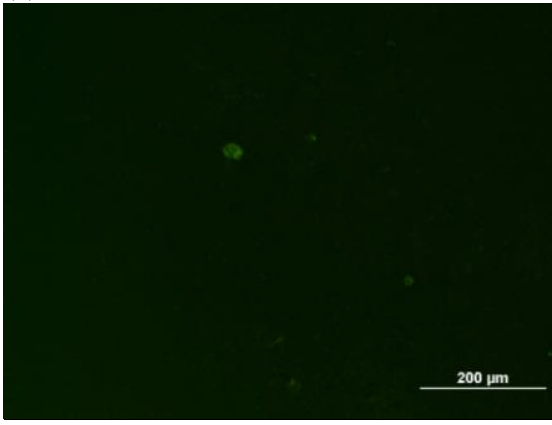
(b)



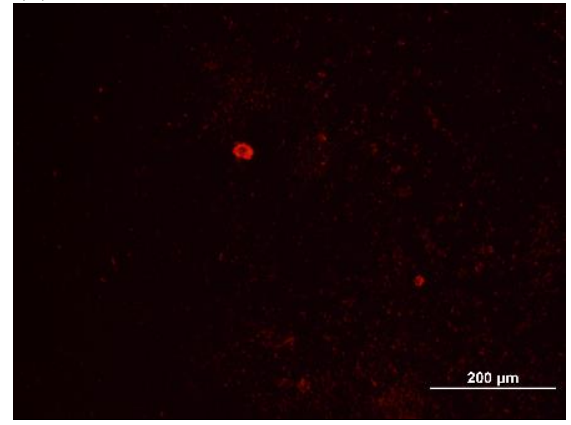
(c)



(d)

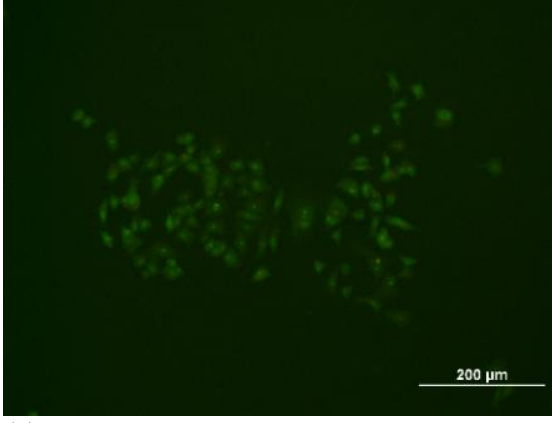


(e)

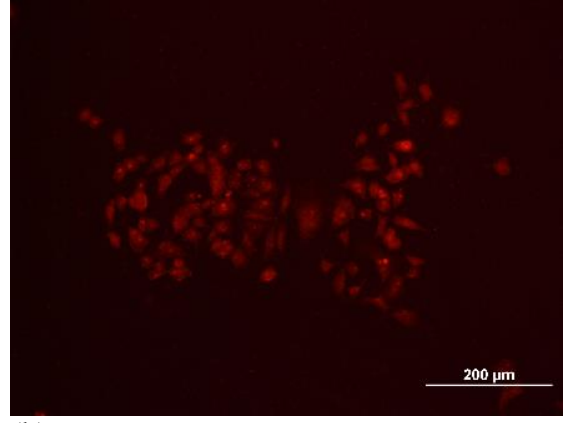


(f)

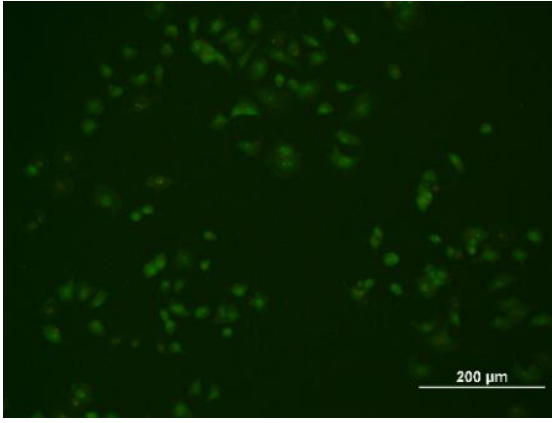
Şekil 4.14. 75 mM kombine madde konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)



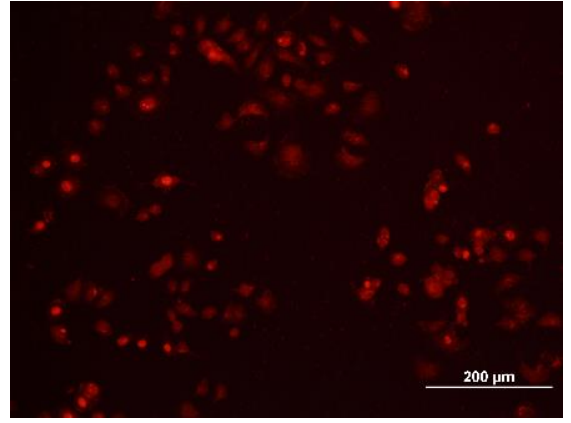
(a)



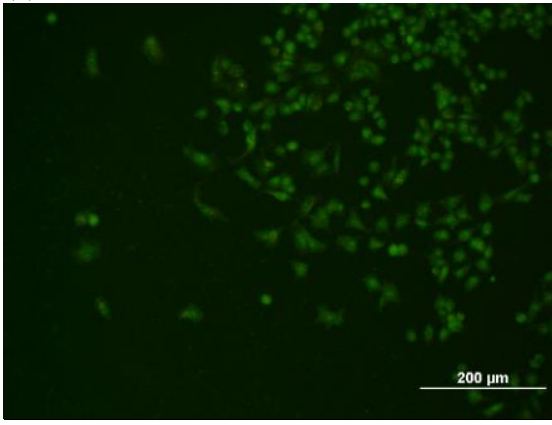
(b)



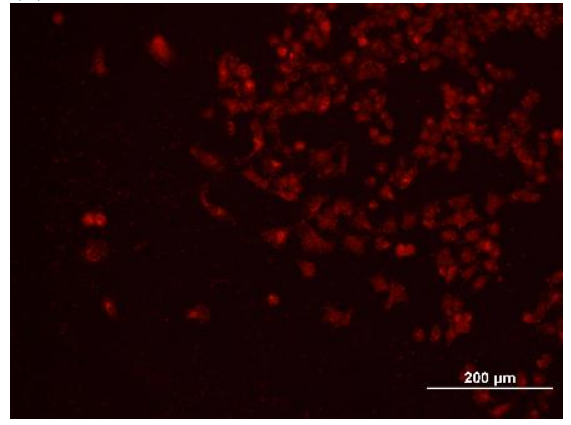
(c)



(d)

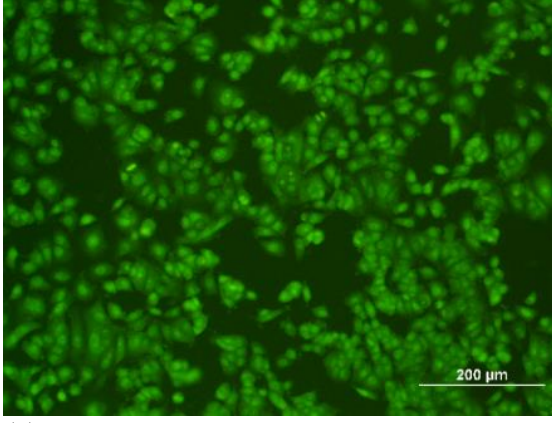


(e)

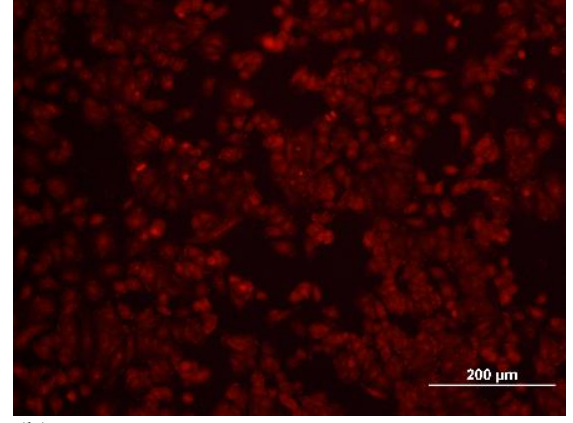


(f)

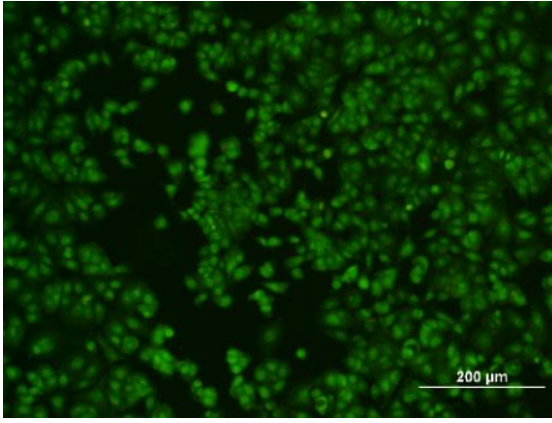
Şekil 4.15. 0,25 mM kombine madde konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)



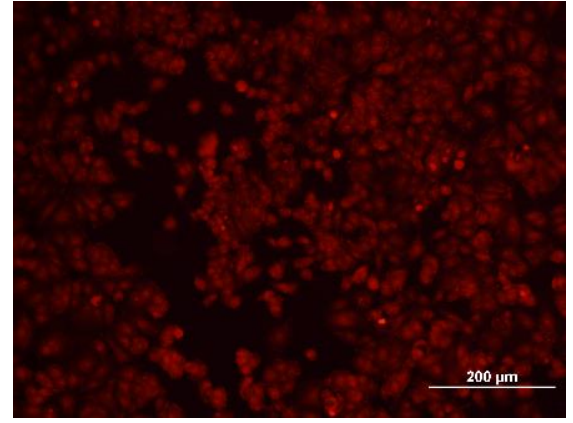
(a)



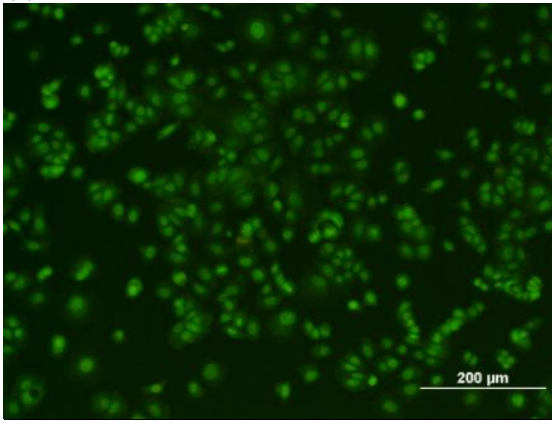
(b)



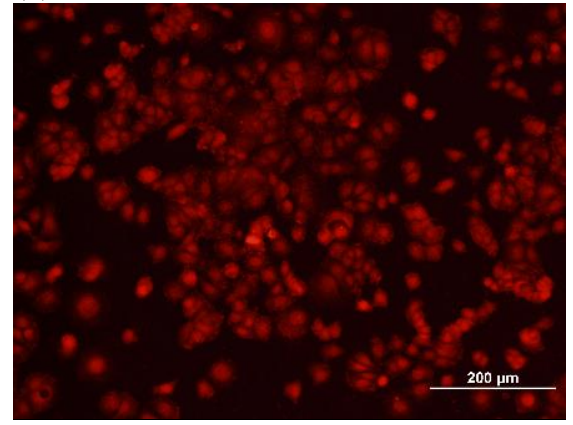
(c)



(d)

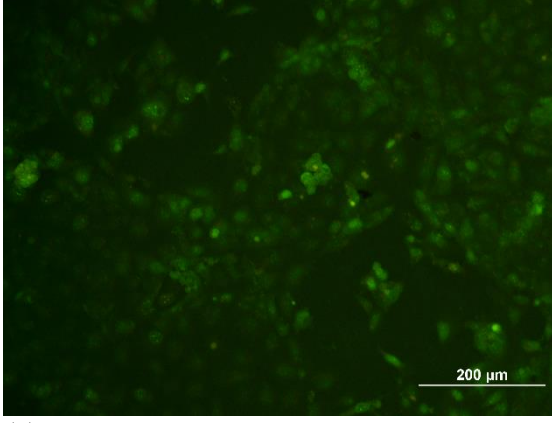


(e)

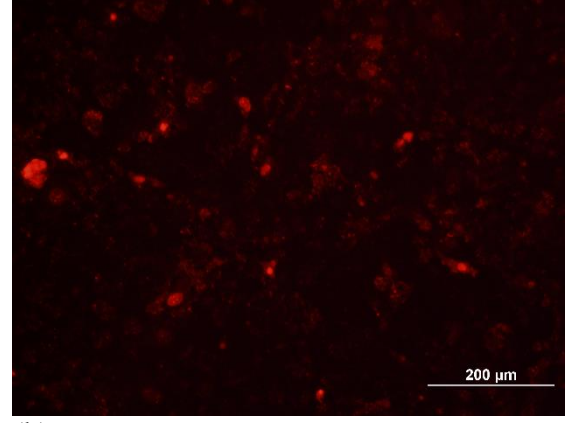


(f)

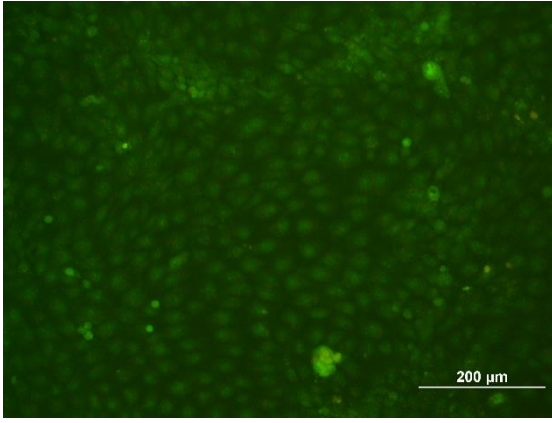
Şekil 4.16. MCF-7 hücrelerinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, ErKay Özgör)



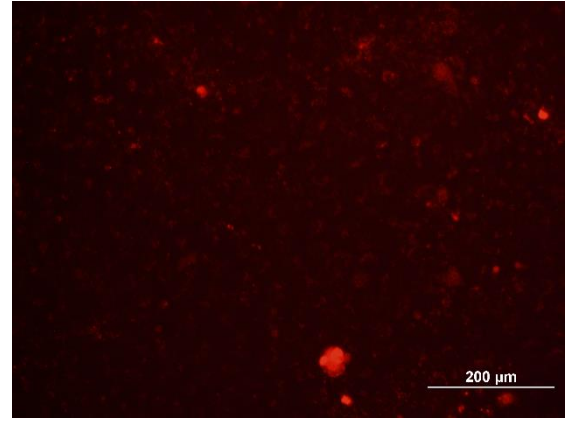
(a)



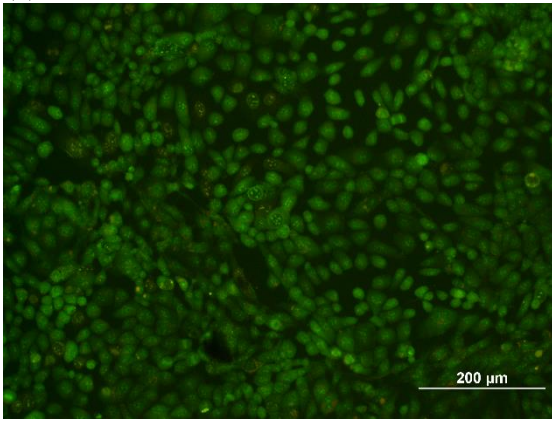
(b)



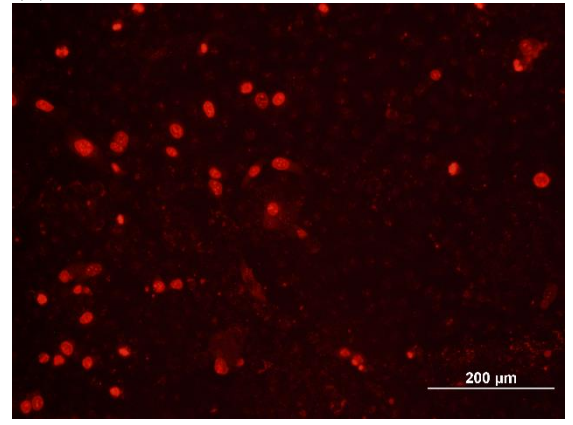
(c)



(d)

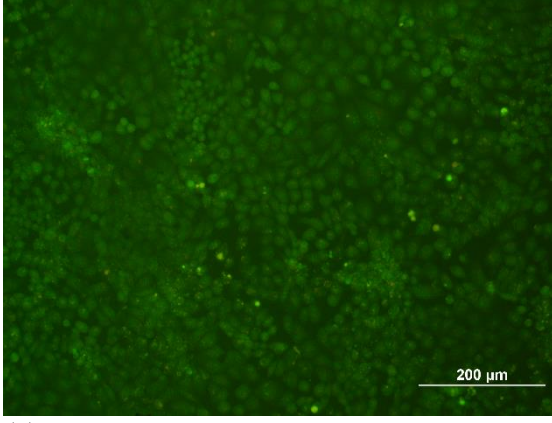


(e)

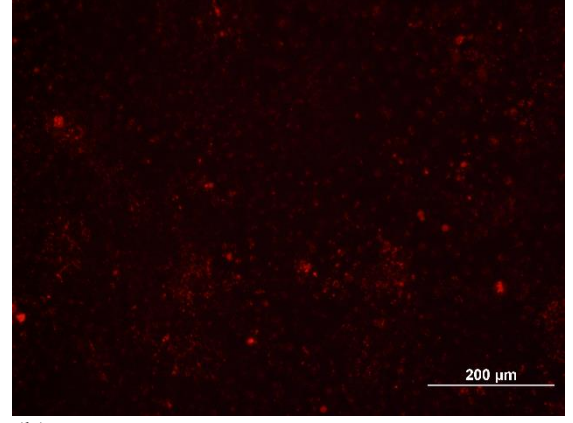


(f)

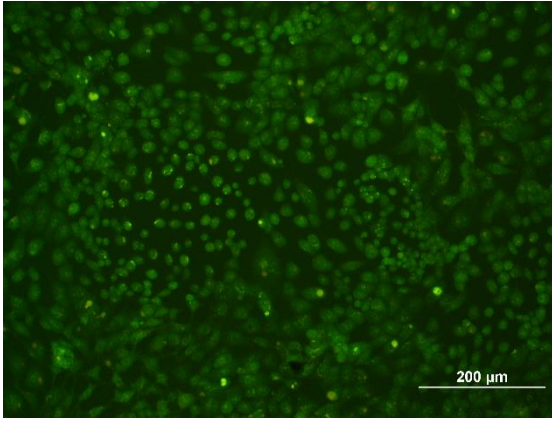
Şekil 4.17. 75 mM Bassiatin konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)



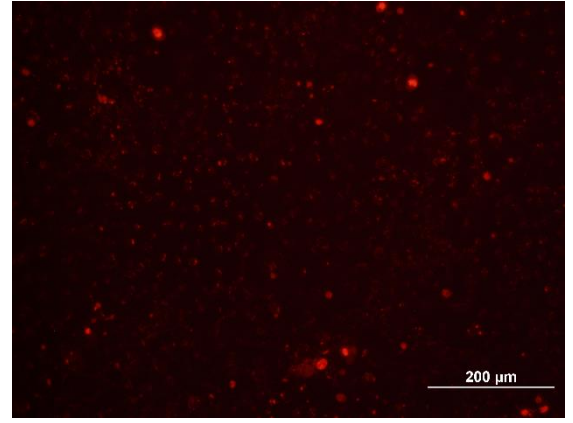
(a)



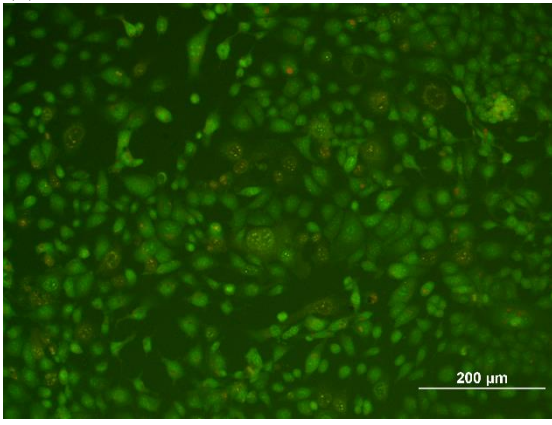
(b)



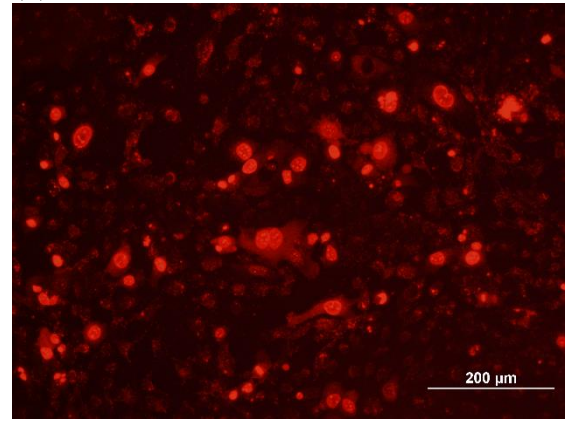
(c)



(d)

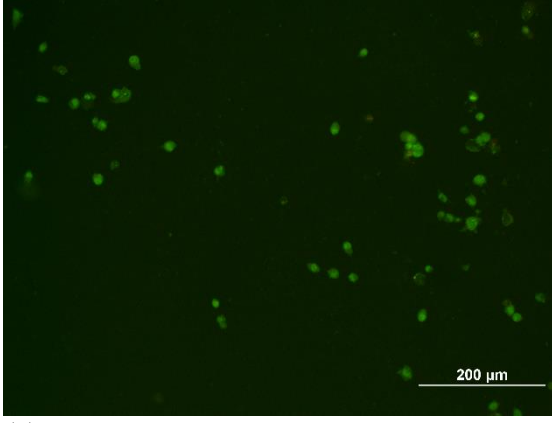


(e)

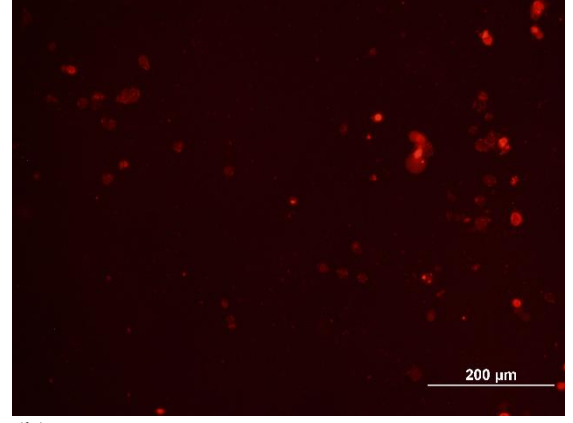


(f)

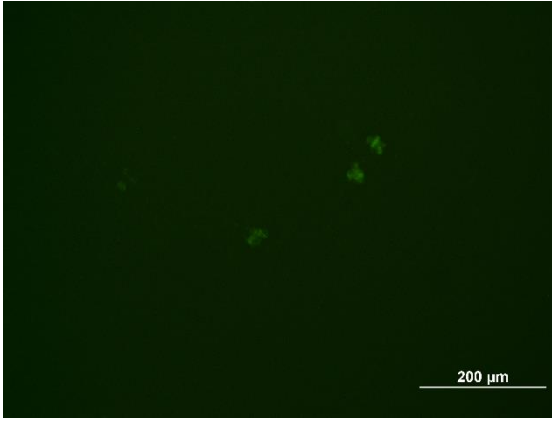
Şekil 4.18. 0,25 mM Bassiatin konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)



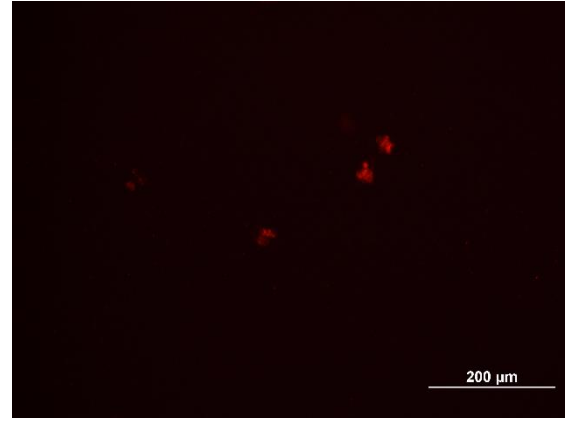
(a)



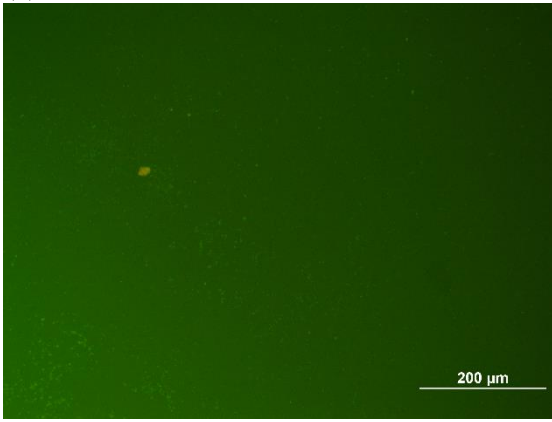
(b)



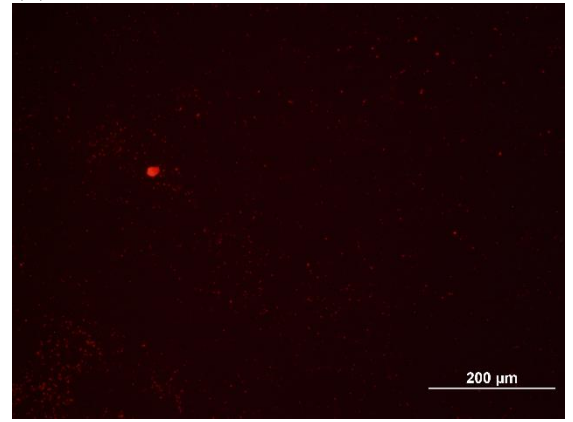
(c)



(d)



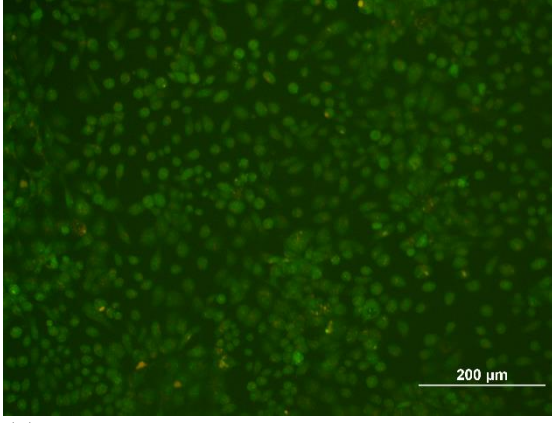
(e)



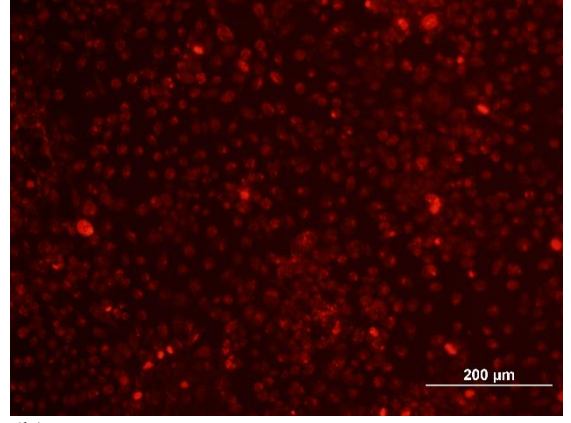
(f)

Şekil 4.19. 75 mM Tamoksifen konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör)

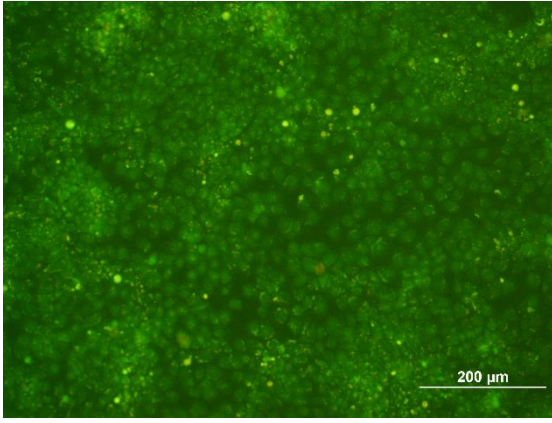




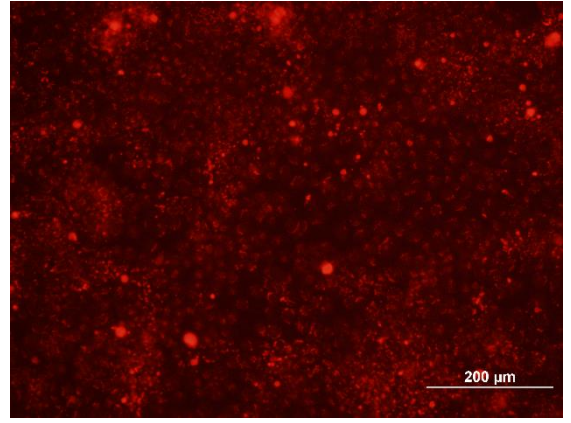
(a)



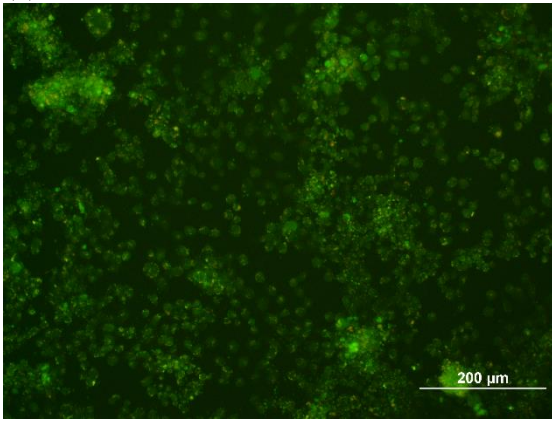
(b)



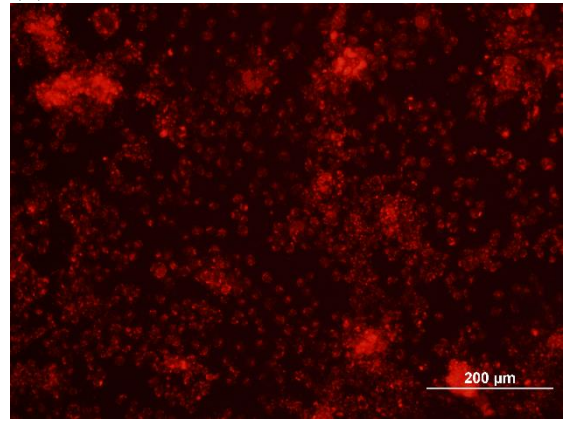
(c)



(d)

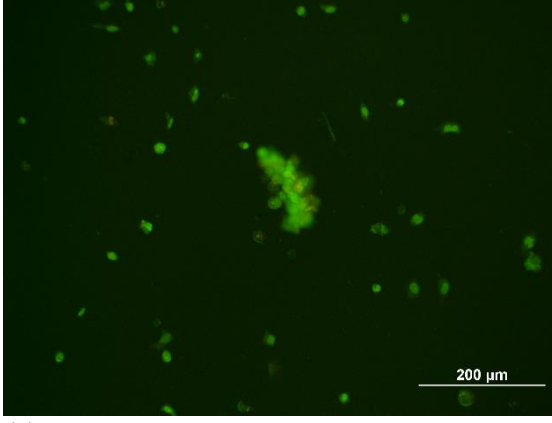


(e)

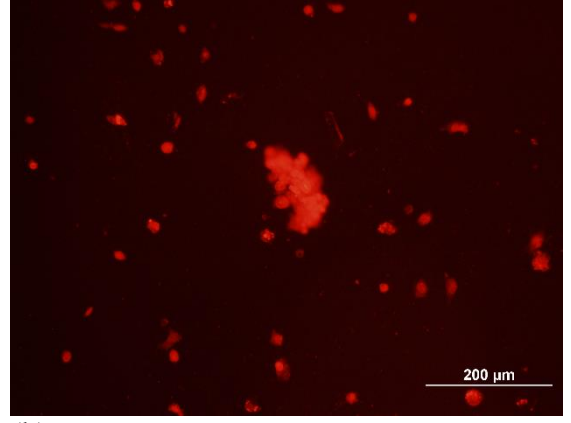


(f)

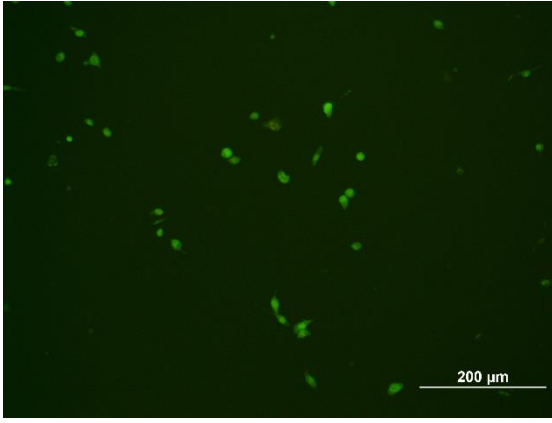
Şekil 4.20. 0,25 mM Tamoksifen konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkay Özgör)



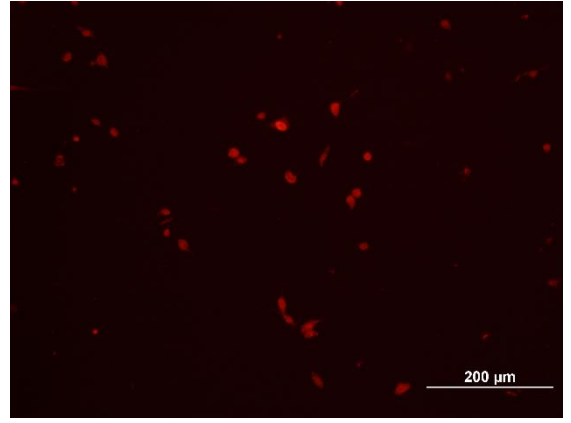
(a)



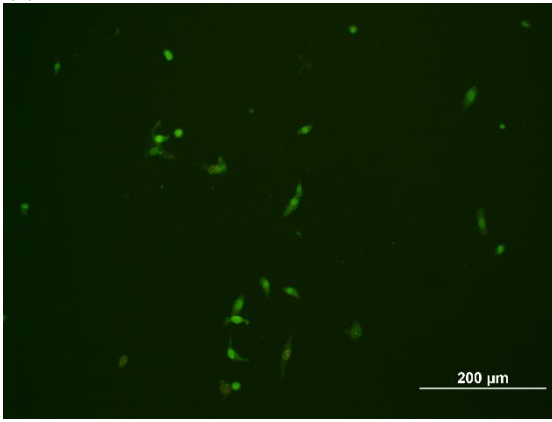
(b)



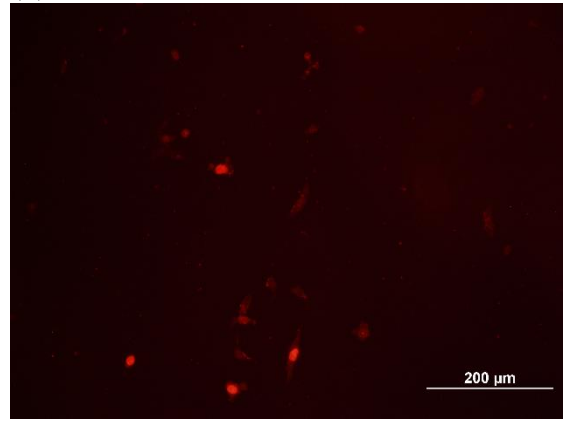
(c)



(d)

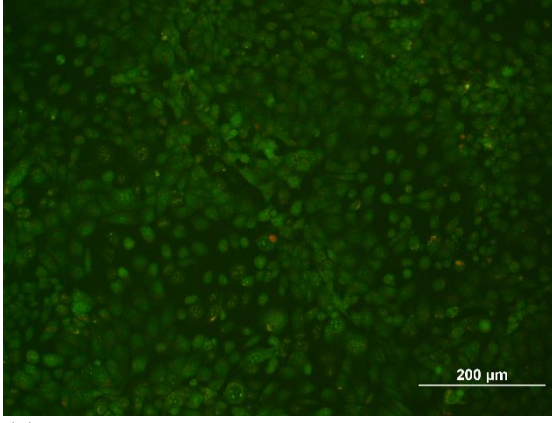


(e)

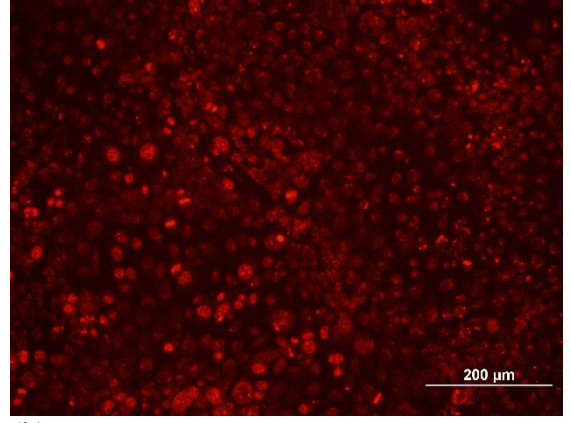


(f)

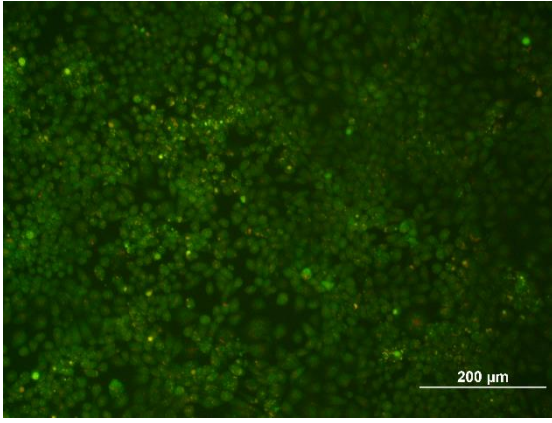
Şekil 4.21. 75 mM kombine madde konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)



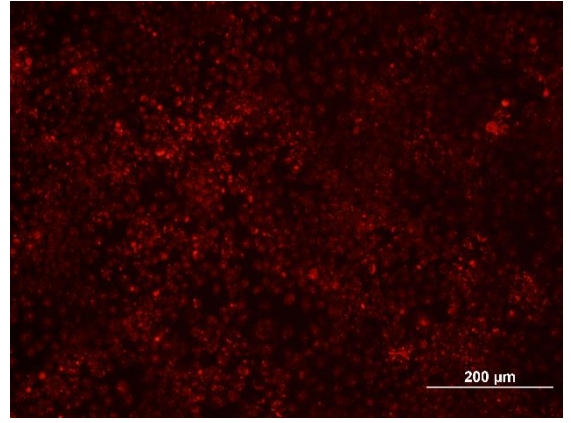
(a)



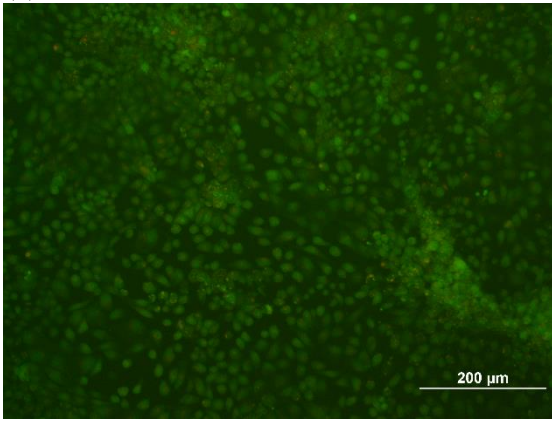
(b)



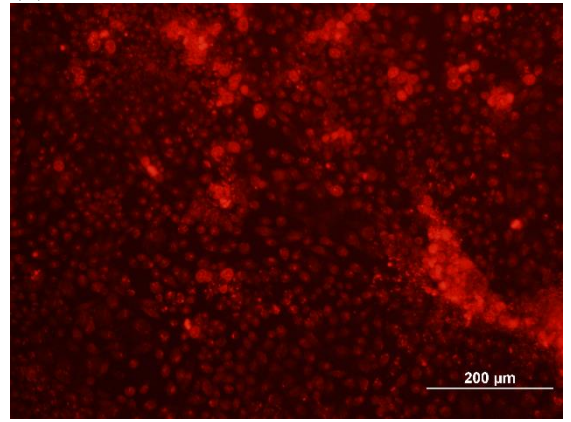
(c)



(d)

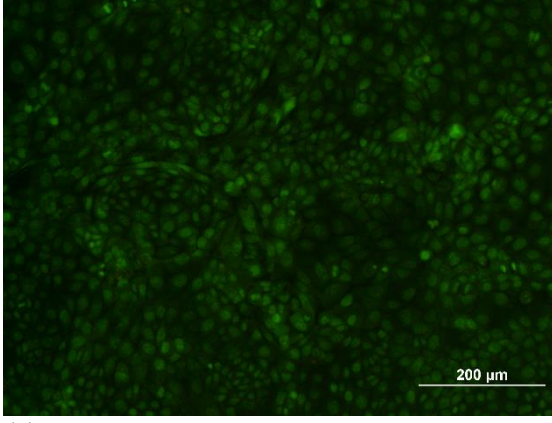


(e)

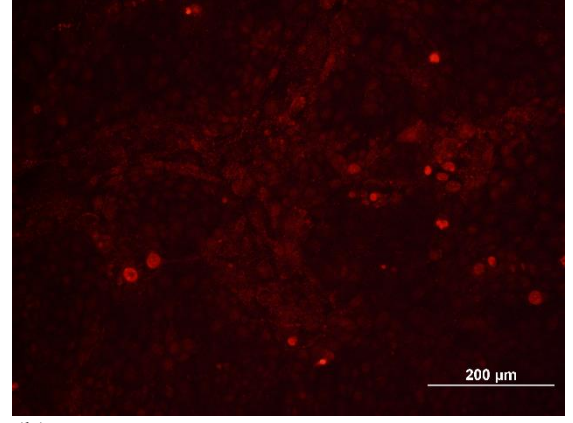


(f)

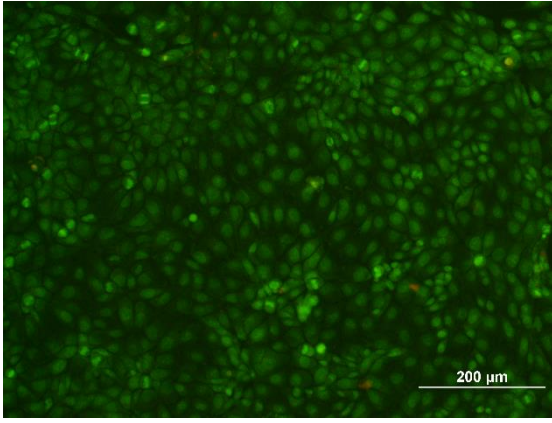
Şekil 4.22. 0,25 mM kombine madde konsantrasyonlarının SVCT hücreleri üzerindeki etkisinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Erkey Özgör)



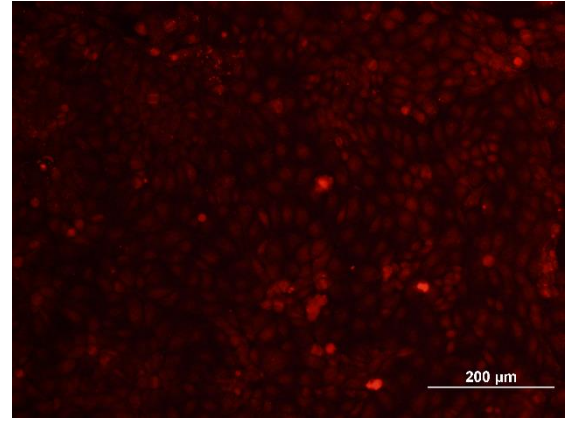
(a)



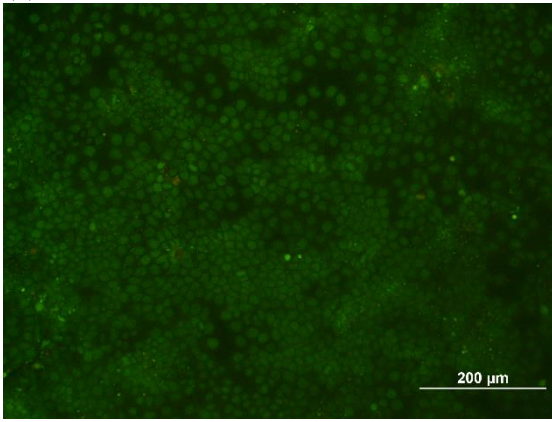
(b)



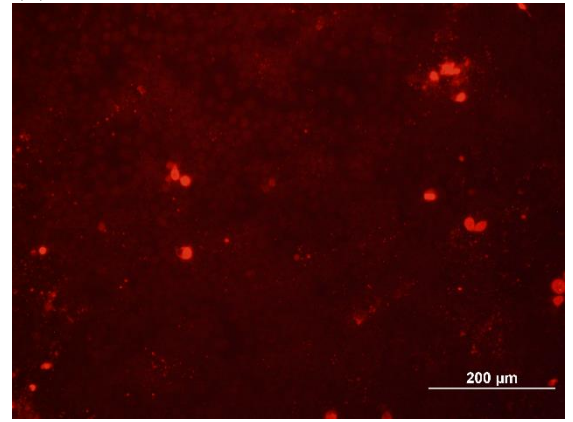
(c)



(d)



(e)

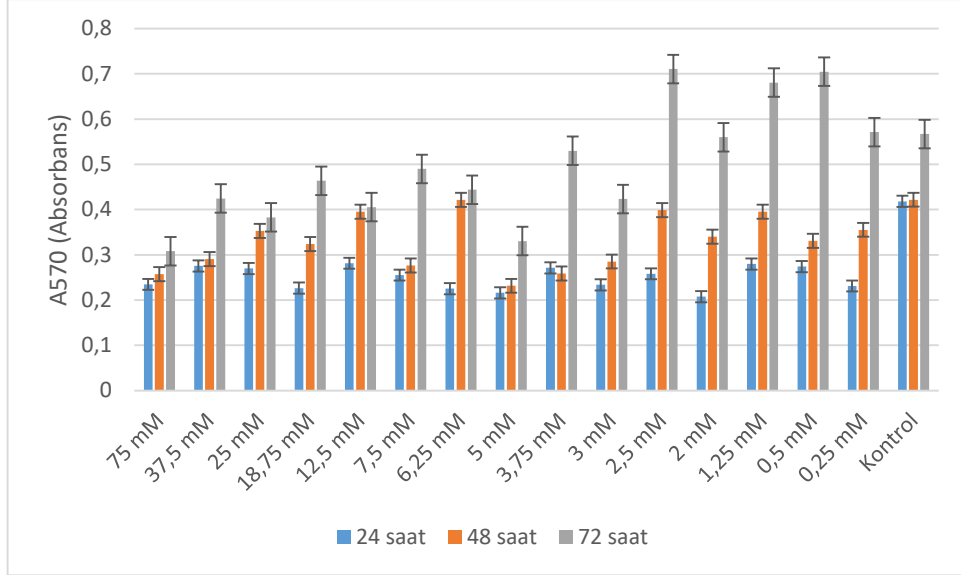


(f)

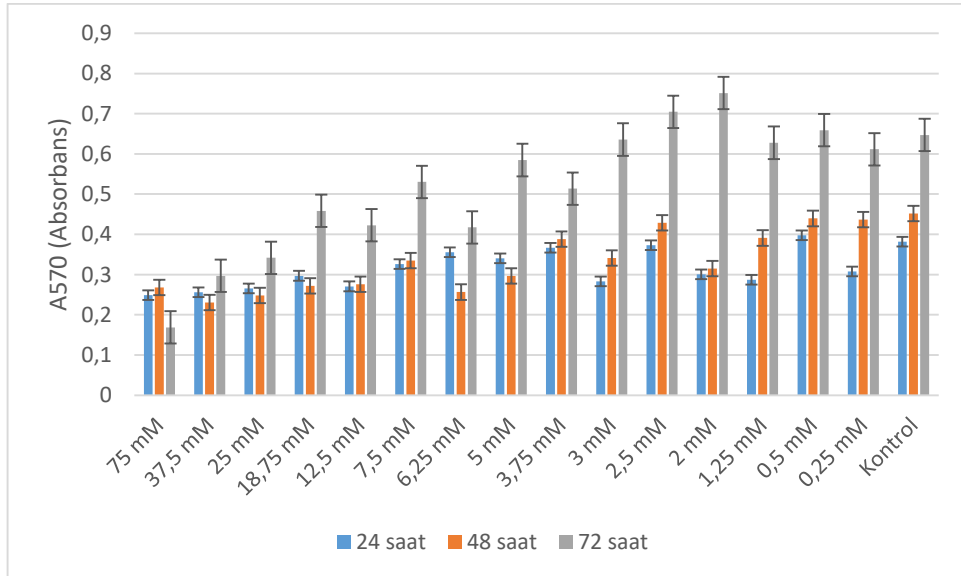
Şekil 4.23. SVCT hücrelerinin 24 (a,b), 48 (c,d) ve 72 (e,f) saatlerdeki floresan boyama görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, ErKay Özgör)

Sitotoksisite çalışmalarından elde edilen verilerin karşılaştırılmasında bar ve box-plot grafikleri kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde ayrı ayrı Bassiatin, Tamoksifen ve Kombine maddelerinin farklı konsantrasyonlarının saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması bar grafikleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.24., Şekil 4.25., Şekil 4.26., Şekil 4.27., Şekil 4.28. ve Şekil 4.29.). MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde 24, 48 ve 72 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması da box-plot grafiği ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.30., Şekil 4.31., Şekil 4.32., Şekil 4.33., Şekil

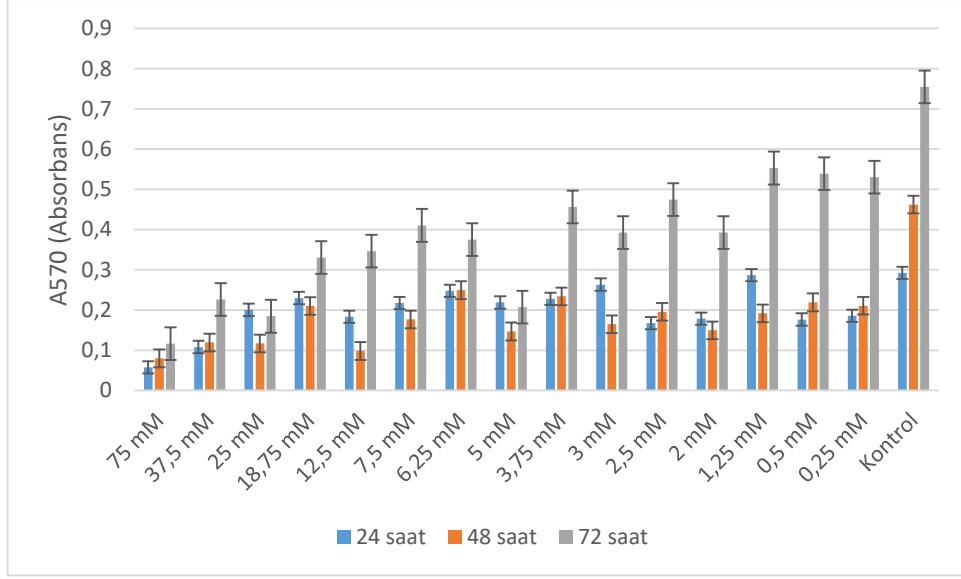
4.34. ve Şekil 4.35.). Tüm bu karşılaştırmalara ilaveten her bir uygulama süresi için maddelerin farklı konsantrasyonlarının birbirleri arasındaki karşılaştırmaları da bar grafikleri ile gösterilerek genel bir değerlendirme yapılmıştır (Şekil 4.36., Şekil 4.37., Şekil 4.38., Şekil 4.39., Şekil 4.40. ve Şekil 4.41.)



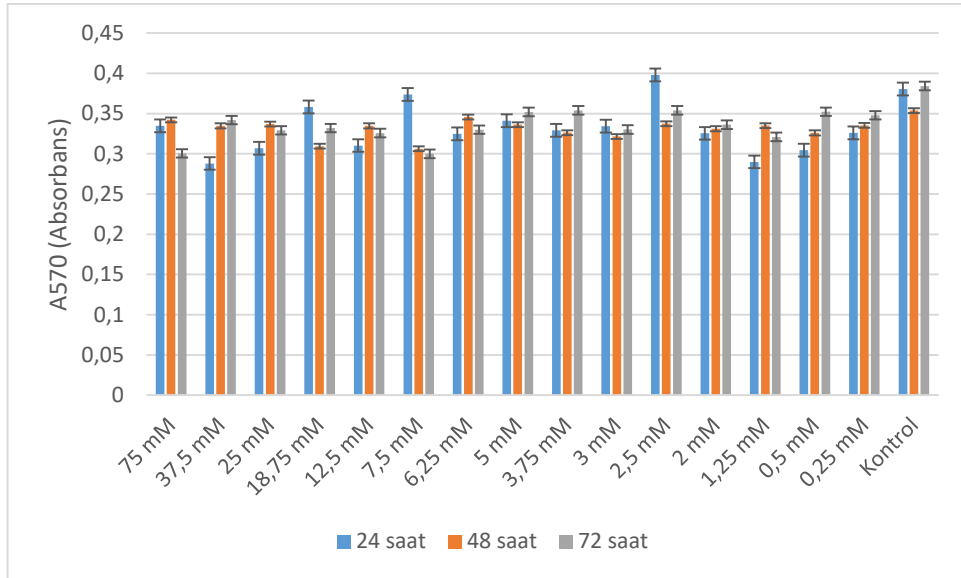
Şekil 4.24. MCF-7 Hücre hattı üzerinde Bassiatinin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin ile muamele edilmiştir.



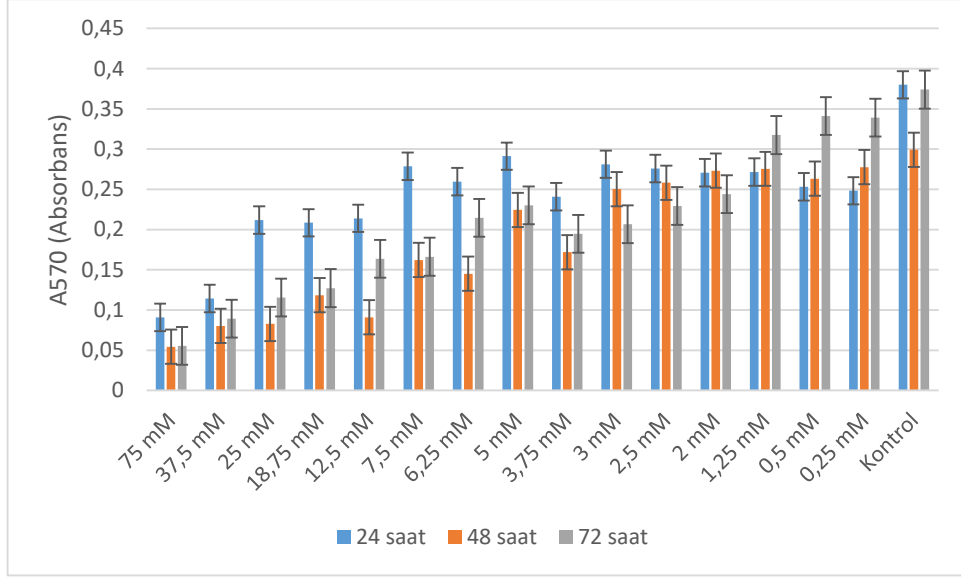
Şekil 4.25. MCF-7 Hücre hattı üzerinde Tamoksifenin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan tamoksifen ile muamele edilmiştir.



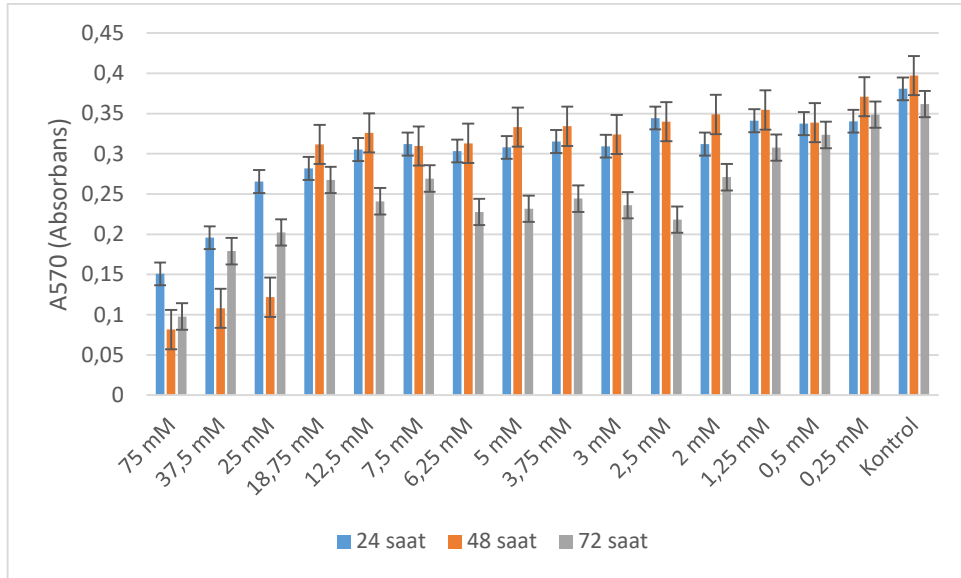
Şekil 4.26. MCF-7 Hücre hattı üzerinde Kombine maddenin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan kombine madde ile muamele edilmiştir.



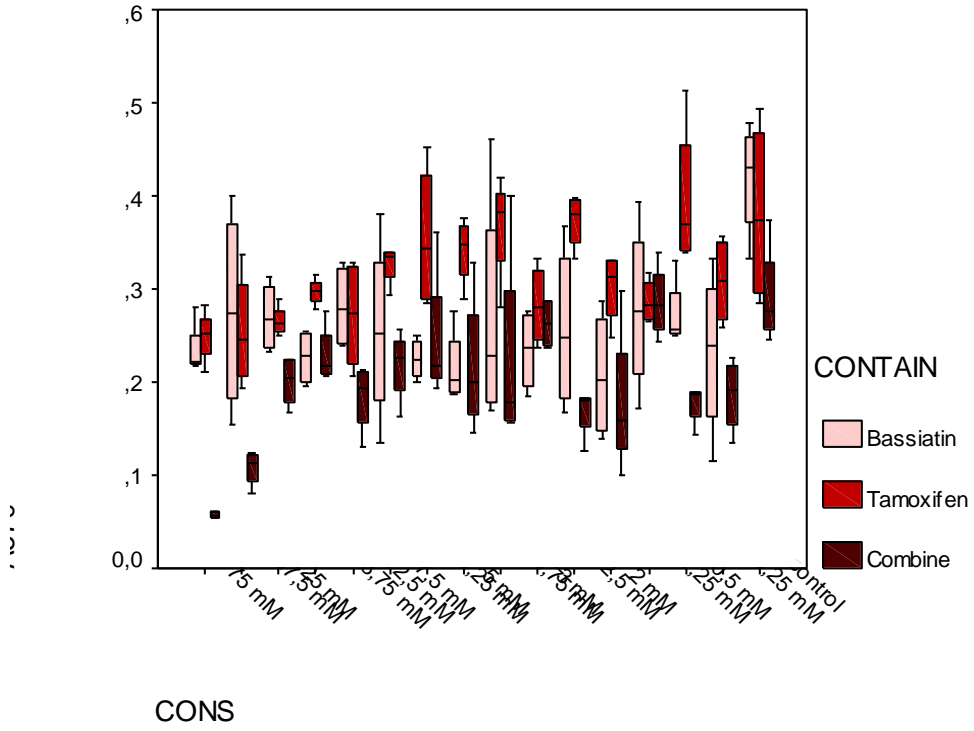
Şekil 4.27. SVCT Hücre hattı üzerinde Bassiatinin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin ile muamele edilmiştir.



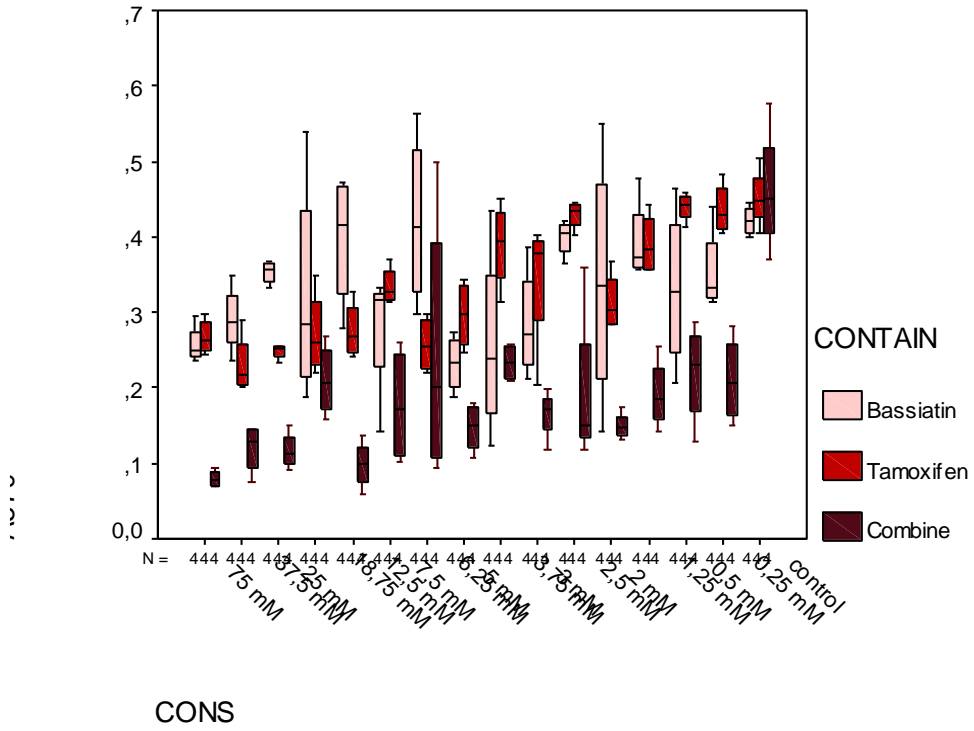
Şekil 4.28. SVCT Hücre hattı üzerinde Tamoksifenin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan tamoksifen ile muamele edilmiştir.



Şekil 4.29. SVCT Hücre hattı üzerinde Kombine maddenin saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan kombine madde ile muamele edilmiştir.

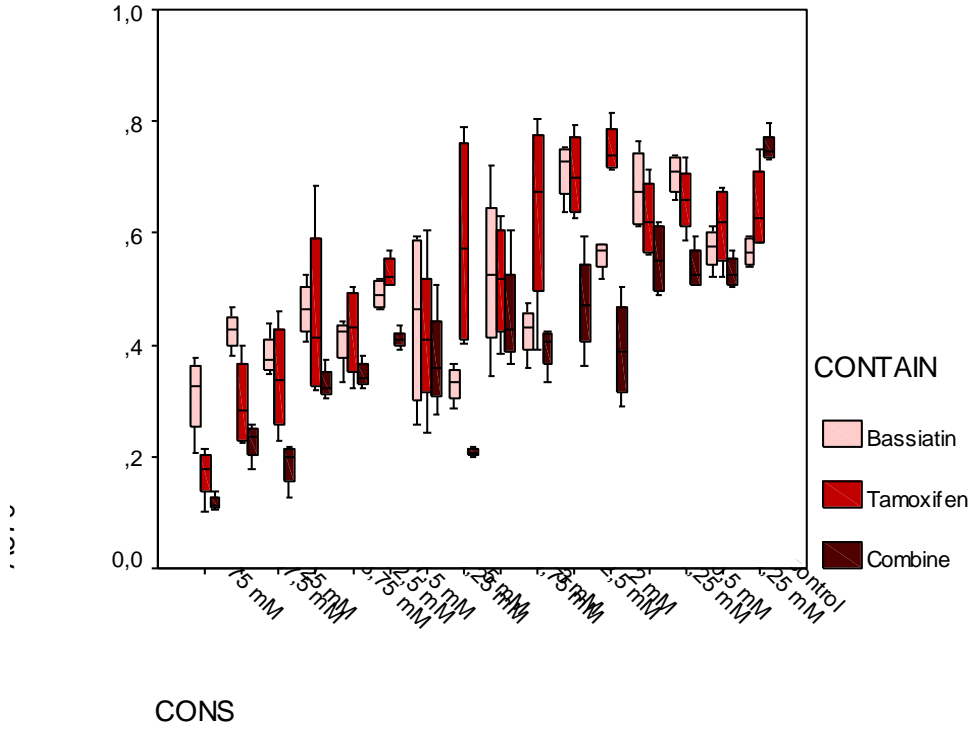


Şekil 4.30. MCF-7 Hücre hattı üzerinde 24 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması

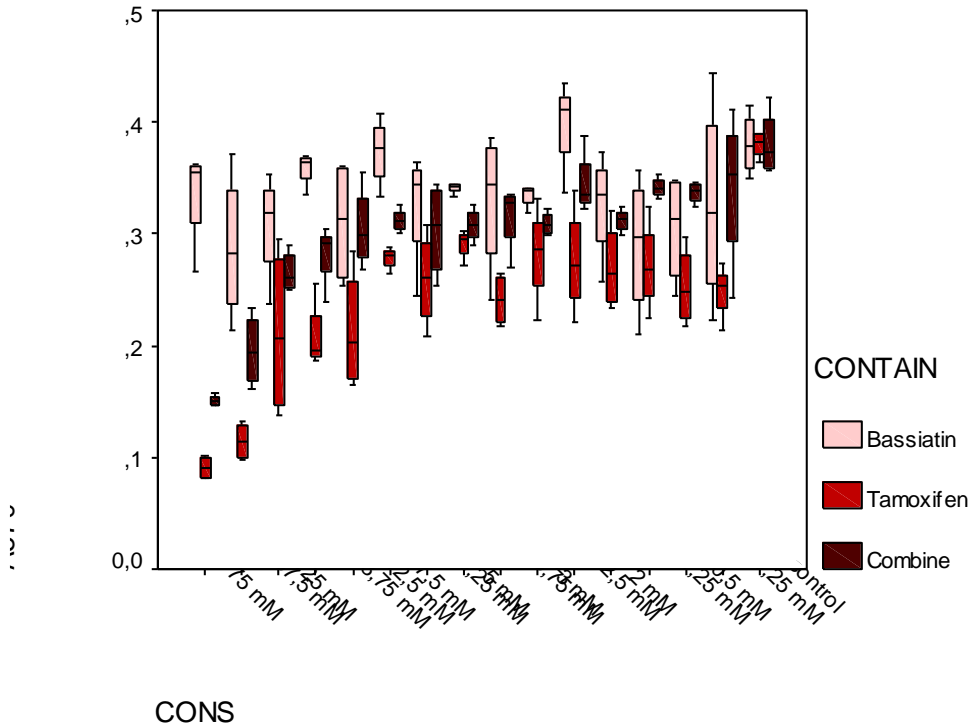


Şekil 4.31. MCF-7 Hücre hattı üzerinde 48 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması

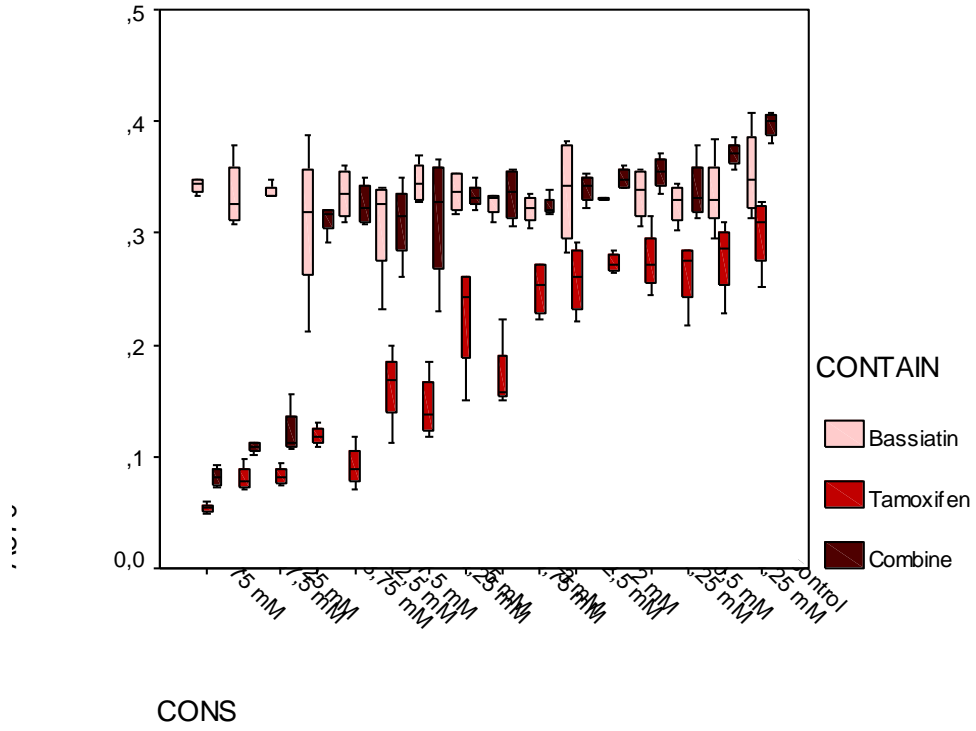




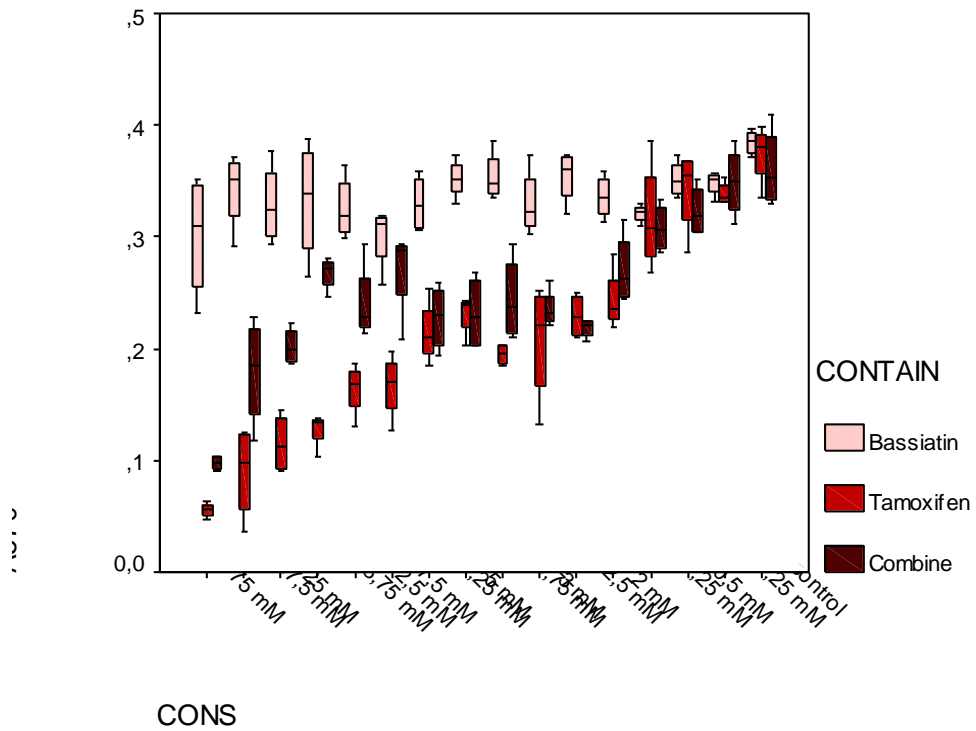
Şekil 4.32. MCF-7 Hücre hattı üzerinde 72 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması



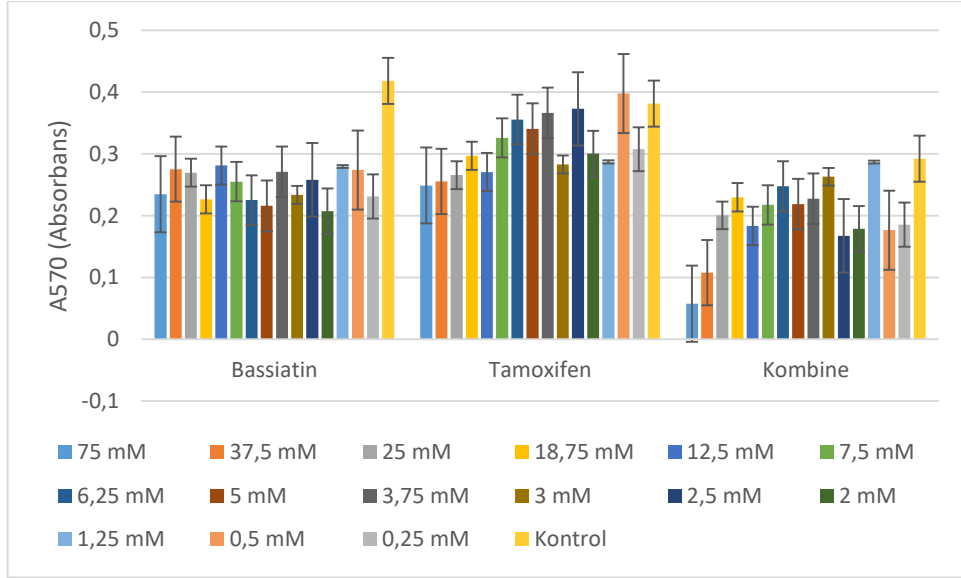
Şekil 4.33. SVCT Hücre hattı üzerinde 24 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması



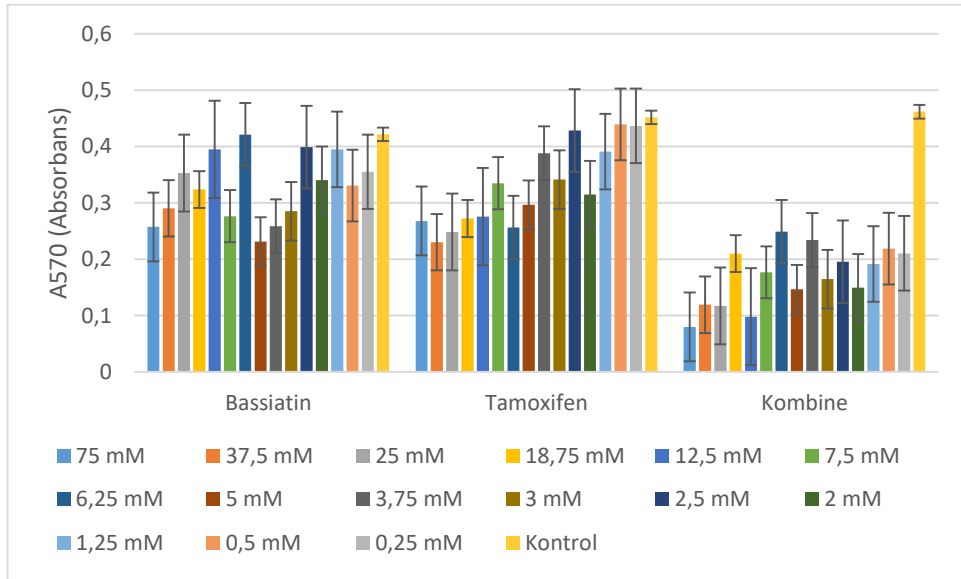
Şekil 4.34. SVCT Hücre hattı üzerinde 48 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması



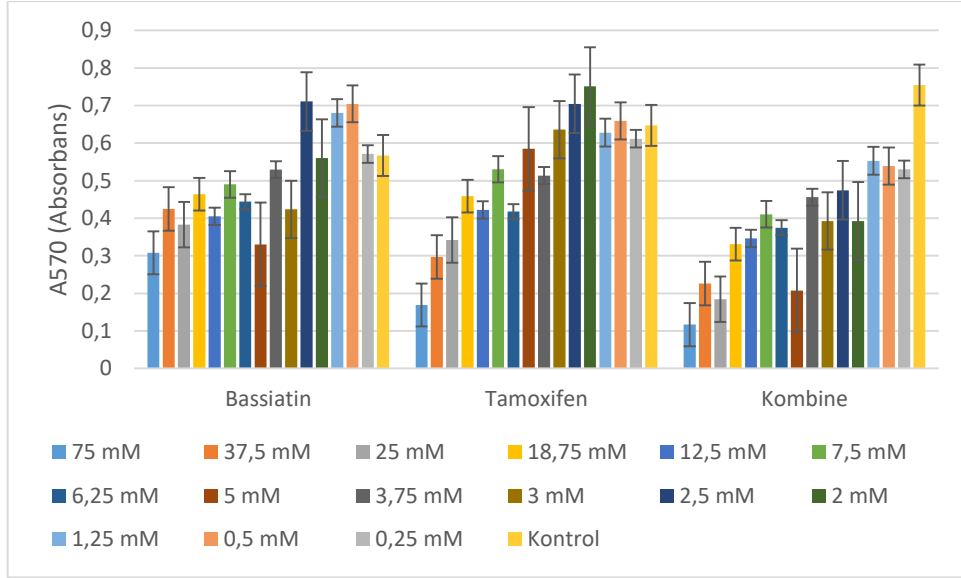
Şekil 4.35. SVCT Hücre hattı üzerinde 72 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması



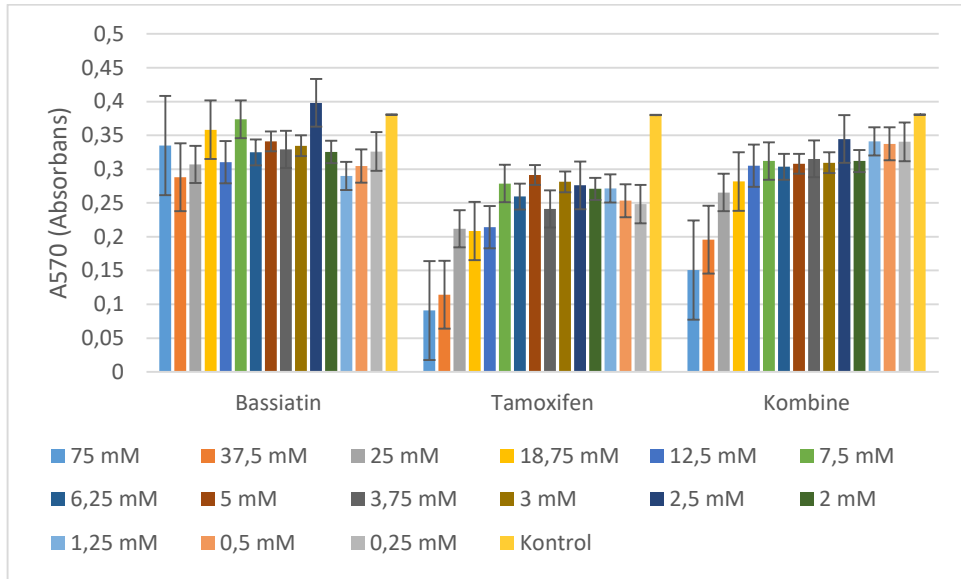
Şekil 4.36. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 24 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.



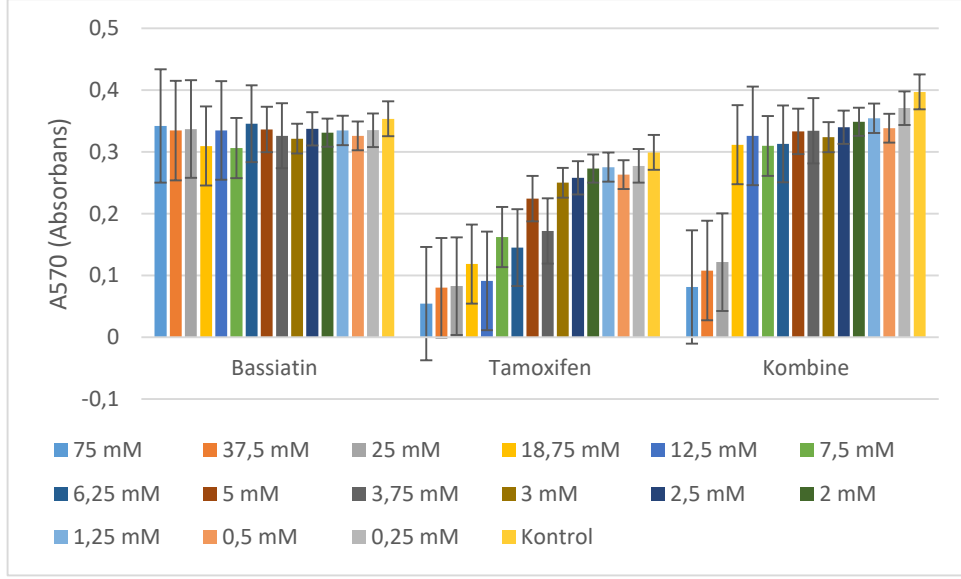
Şekil 4.37. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 48 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.



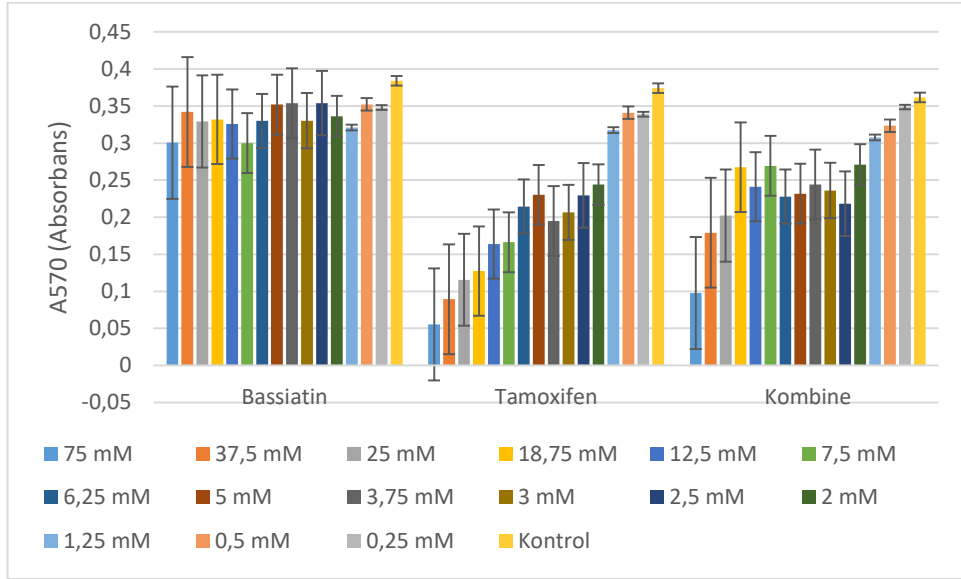
Şekil 4.38. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.



Şekil 4.39. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 24 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.



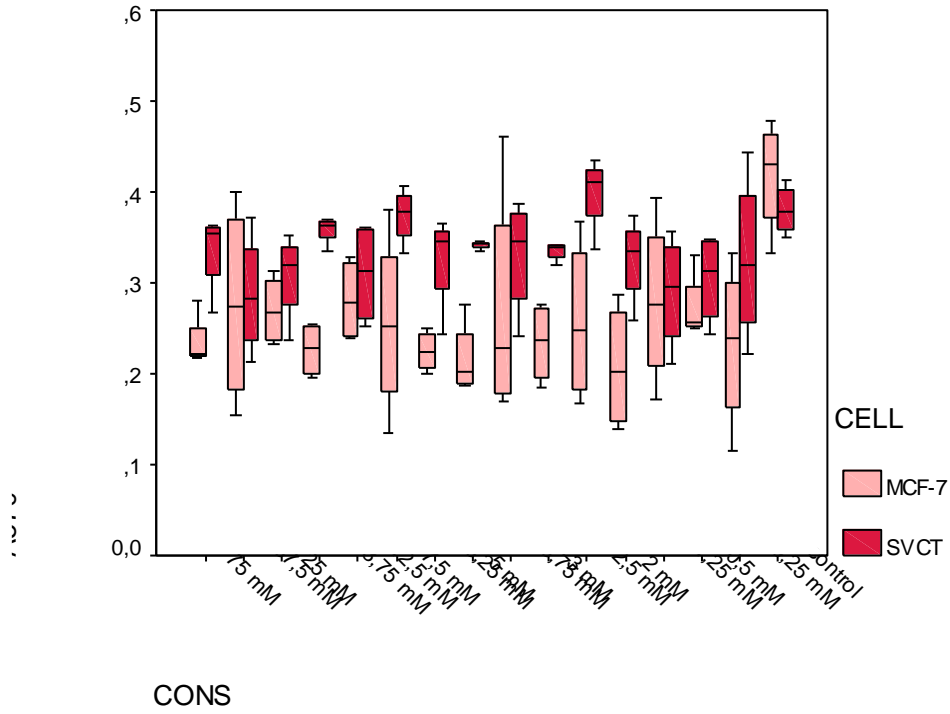
Şekil 4.40. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 48 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.



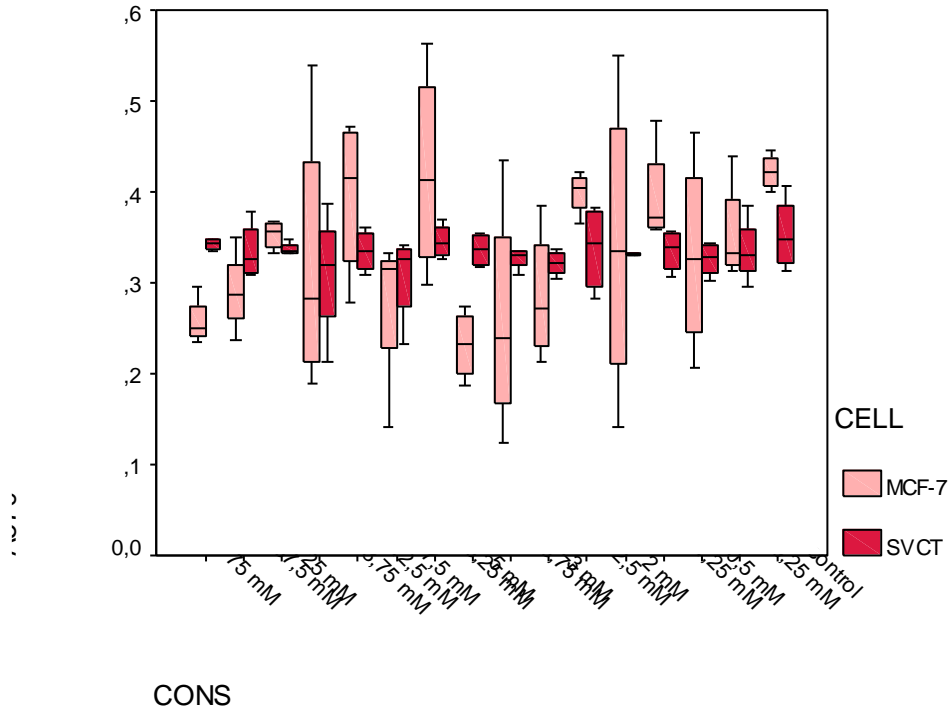
Şekil 4.41. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre etkisinin karşılaştırılması. Hücreler 72 saatlik inkübasyonda 75 mM'dan 0,25 mM'a kadar 15 farklı konsantrasyonda hazırlanan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile muamele edilmiştir.

MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile SVCT normal meme epiteli hücre hattı arasında Bassiatin, Tamoksifen ve kombine maddelerinin inhibisyonunun ayrı ayrı karşılaştırmaları saatlere göre box-plot grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 4.42., Şekil 4.43., Şekil 4.44., Şekil 4.45., Şekil 4.46., Şekil 4.47., Şekil 4.48., Şekil 4.49. ve Şekil 4.50.). MCF-7 ve SVCT hücre hatları arasında 24, 48 ve 72 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun

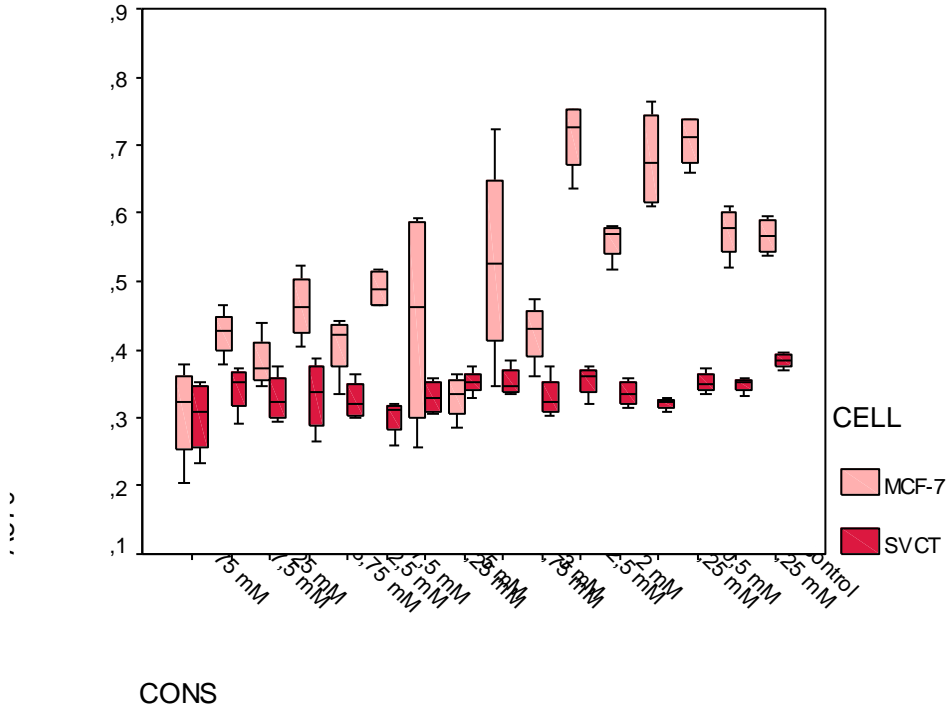
karşılaştırılması da box-plot grafiği ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.51., Şekil 4.52. ve Şekil 4.53.)



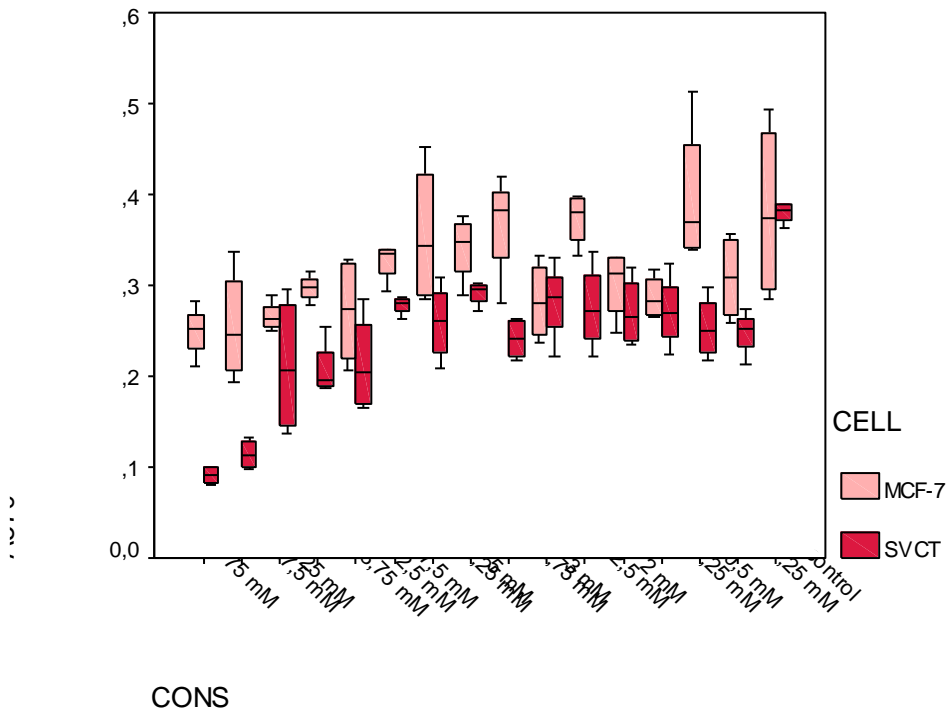
Şekil 4.42. Bassiatinin konsantrasyonlarına göre 24 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



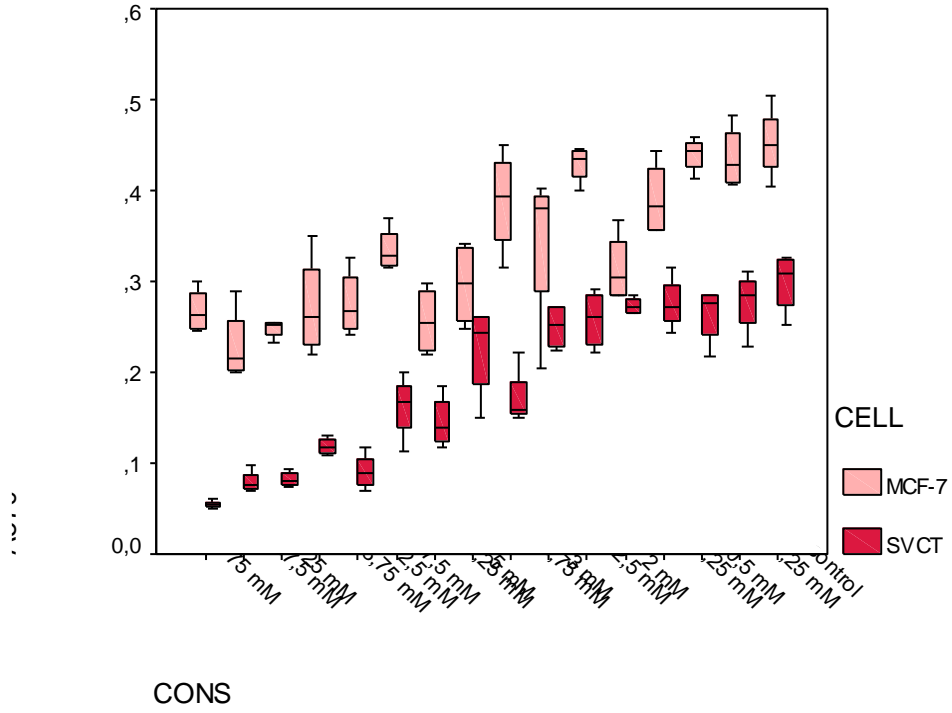
Şekil 4.43. Bassiatinin konsantrasyonlarına göre 48 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



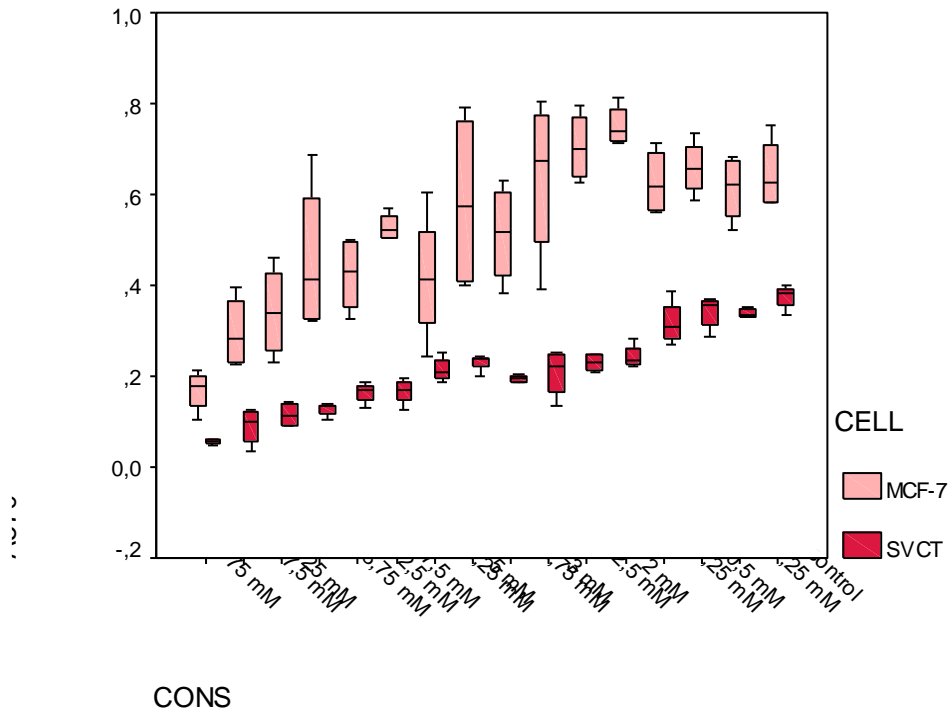
Şekil 4.44. Bassiatinin konsantrasyonlarına göre 72 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



Şekil 4.45. Tamoksifenin konsantrasyonlarına göre 24 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

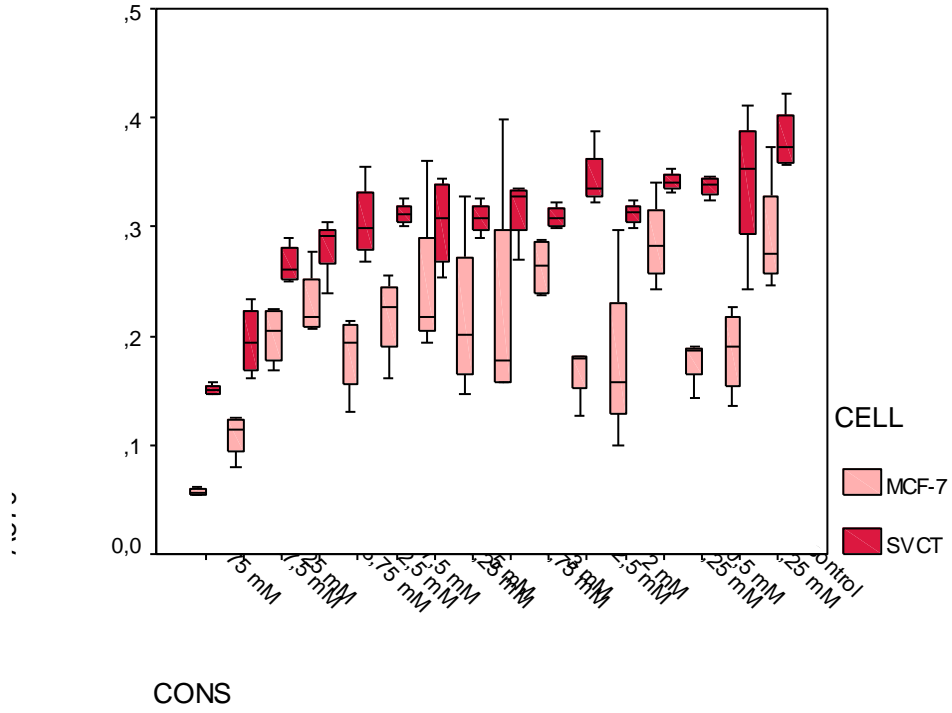


Şekil 4.46. Tamoksifenin konsantrasyonlarına göre 48 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

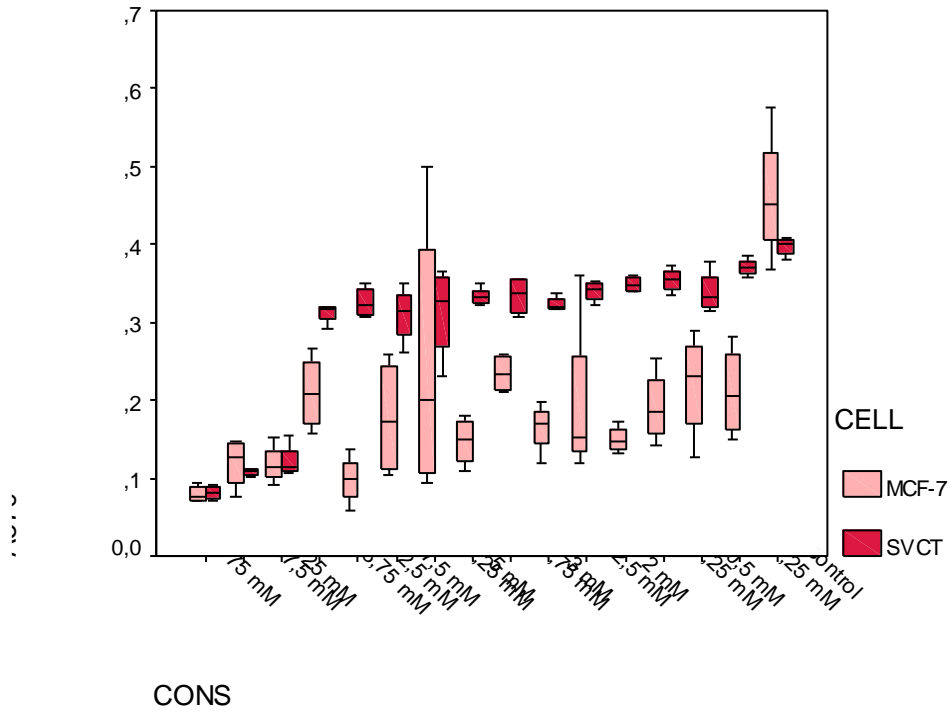


Şekil 4.47. Tamoksifenin konsantrasyonlarına göre 72 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

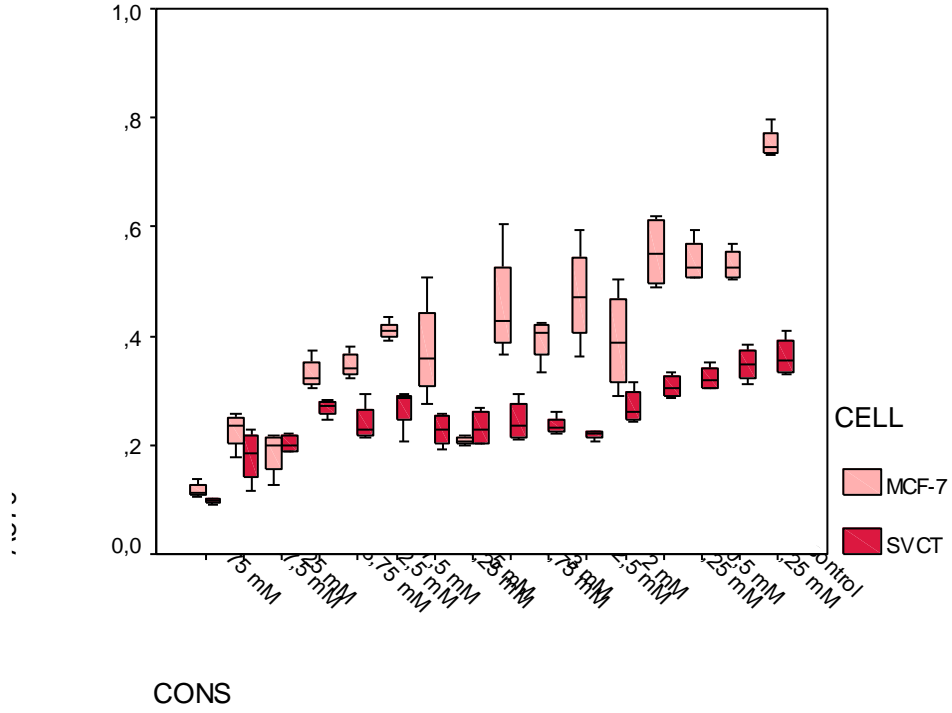




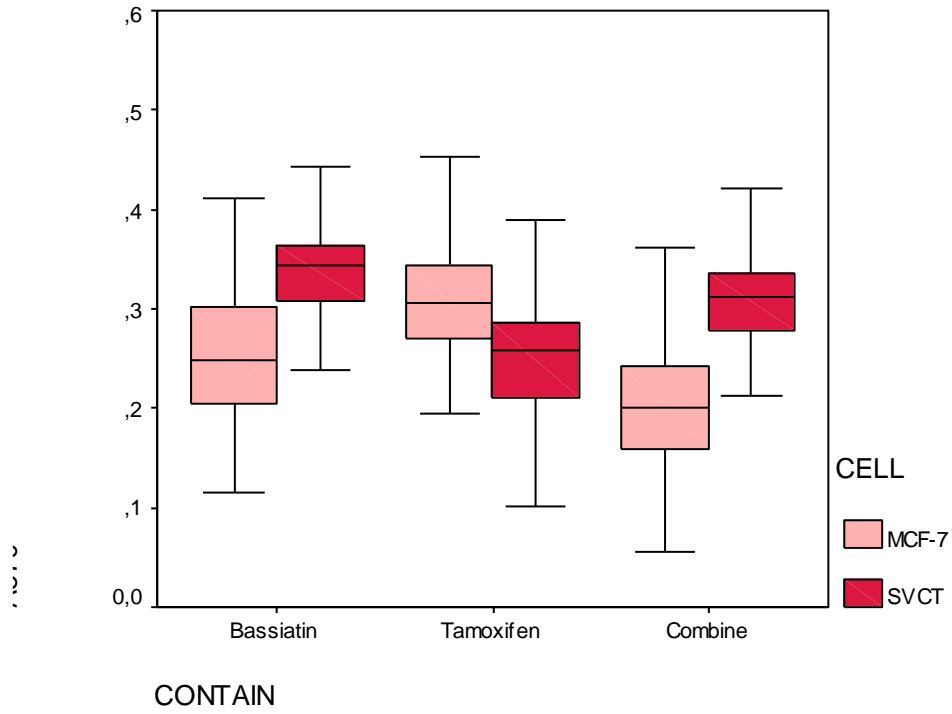
Şekil 4.48. Kombine maddenin konsantrasyonlarına göre 24 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



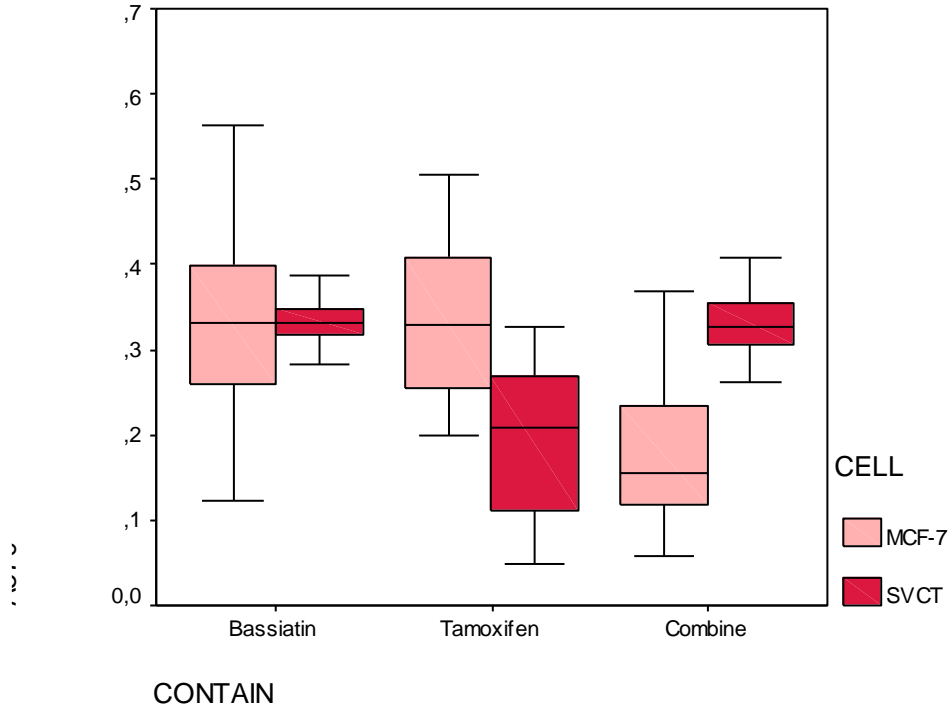
Şekil 4.49. Kombine maddenin konsantrasyonlarına göre 48 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



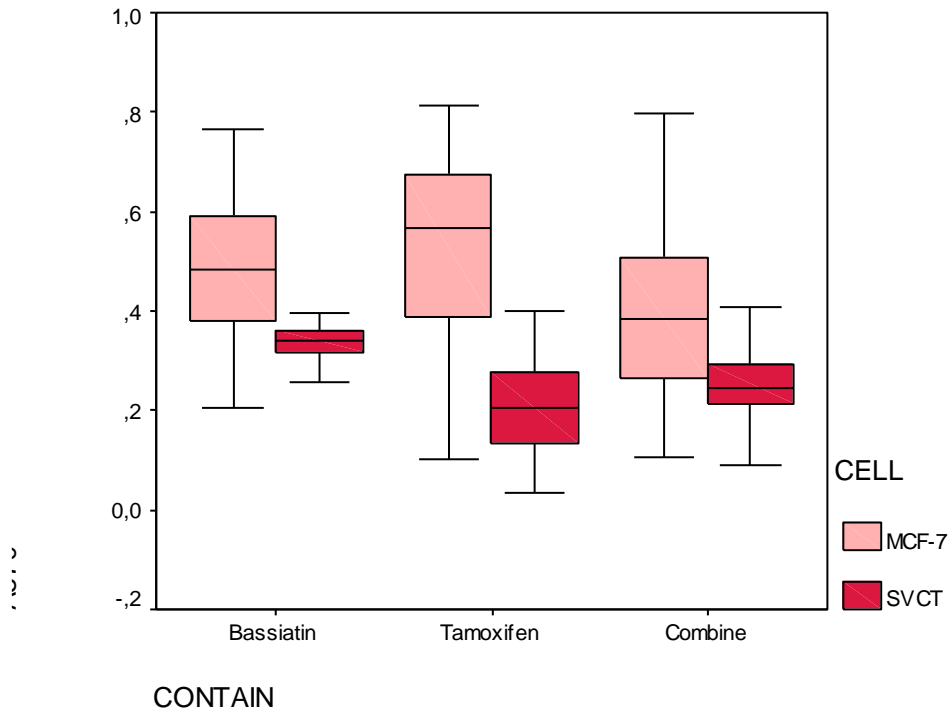
Şekil 4.50. Kombine maddenin konsantrasyonlarına göre 72 saat sonrası MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



Şekil 4.51. MCF-7 ve SVCT Hücre hatlarının 24 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması



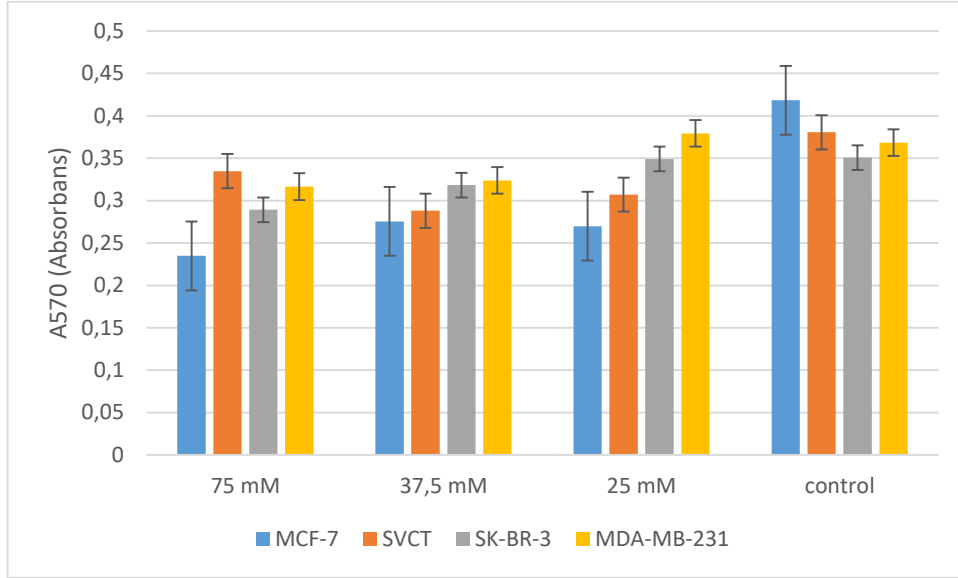
Şekil 4.52. MCF-7 ve SVCT Hücre hatlarının 48 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması



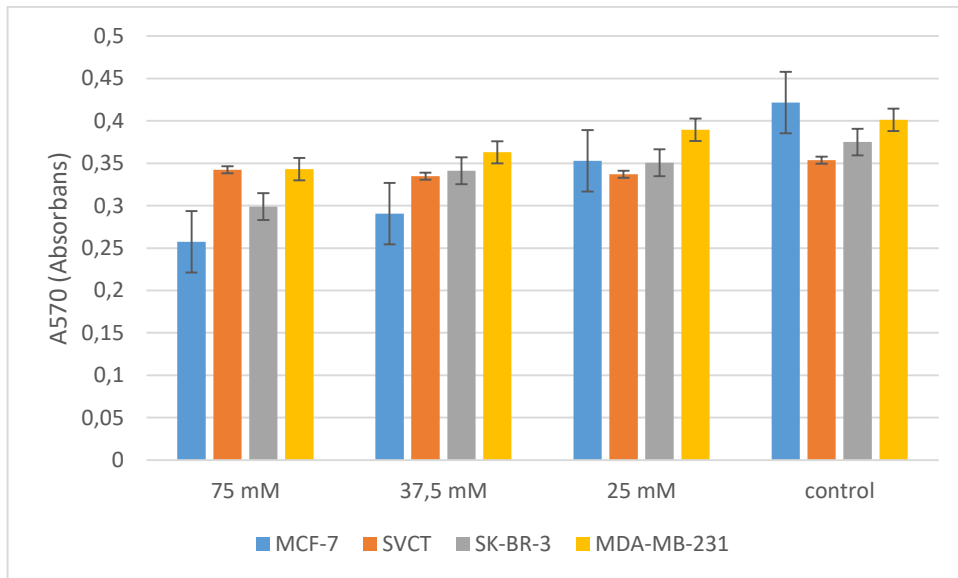
Şekil 4.53. MCF-7 ve SVCT Hücre hatlarının 72 saat sonrası farklı maddelere göre inhibisyonunun karşılaştırılması

MCF-7 ve SVCT hücre hatları ile yapılan sitotoksosite çalışmalarından elde edilen sonuçlar incelendiğinde; 37,5 mM madde karşılaştırmalarının güvenilir sonuçlar verdiği ortaya

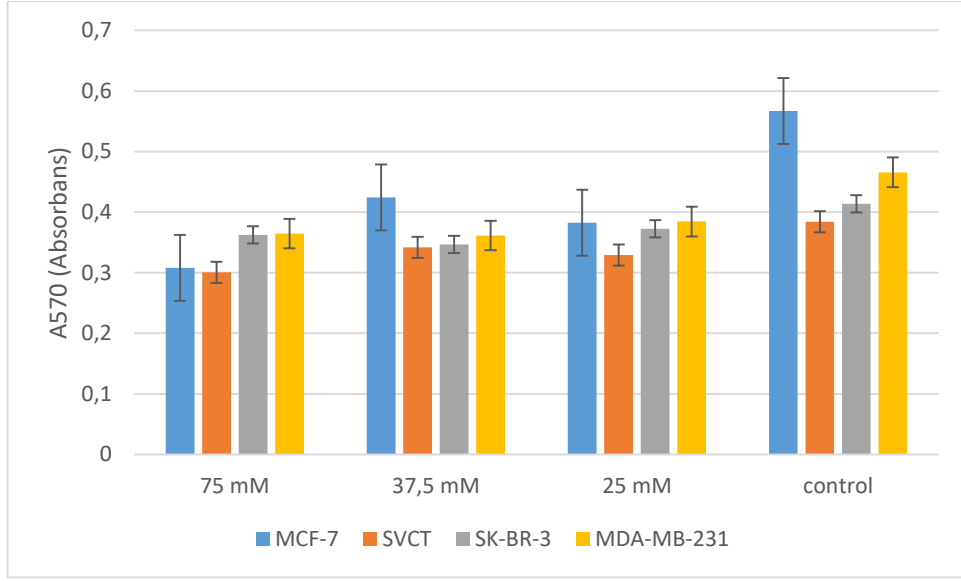
çıkmıştır. Bu nedenle, MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile diğer meme kanser hatlarını reseptör özellikleri açısından karşılaştırmak için; MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerinde maddelerin üç farklı konsantrasyonu (75, 37,5 ve 25 mM) seçilerek sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 ve SVCT hücre hatları arasında Bassiatin, Tamoksifen ve kombine maddelerinin inhibisyonunun ayrı ayrı karşılaştırmaları saatlere göre bar grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 4.54., Şekil 4.55, Şekil 4.56., Şekil 4.57., Şekil 4.58., Şekil 4.59., Şekil 4.60., Şekil 4.61. ve Şekil 4.62.).



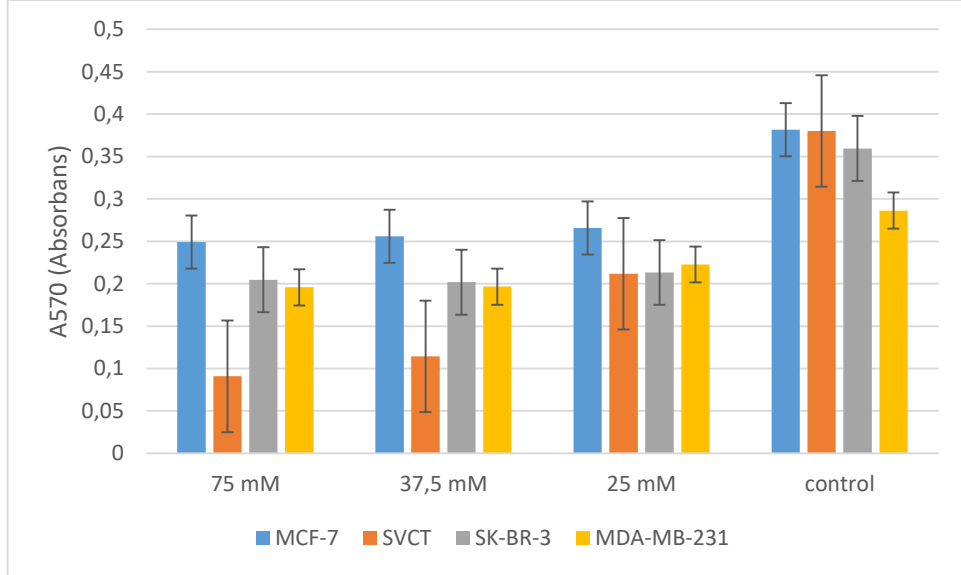
Şekil 4.54. Bassiatinin üç farklı konsantrasyonuna göre 24 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



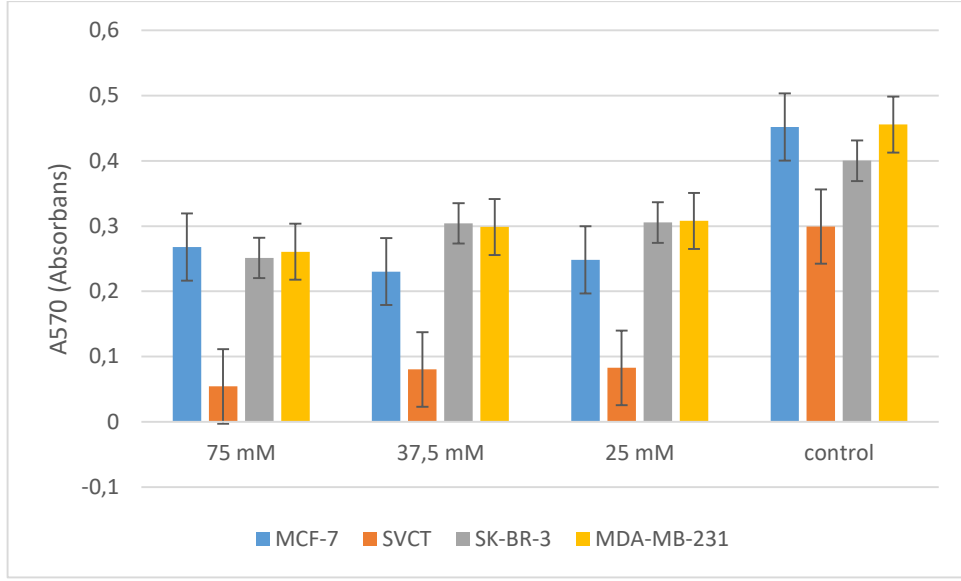
Şekil 4.55. Bassiatinin üç farklı konsantrasyonuna göre 48 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



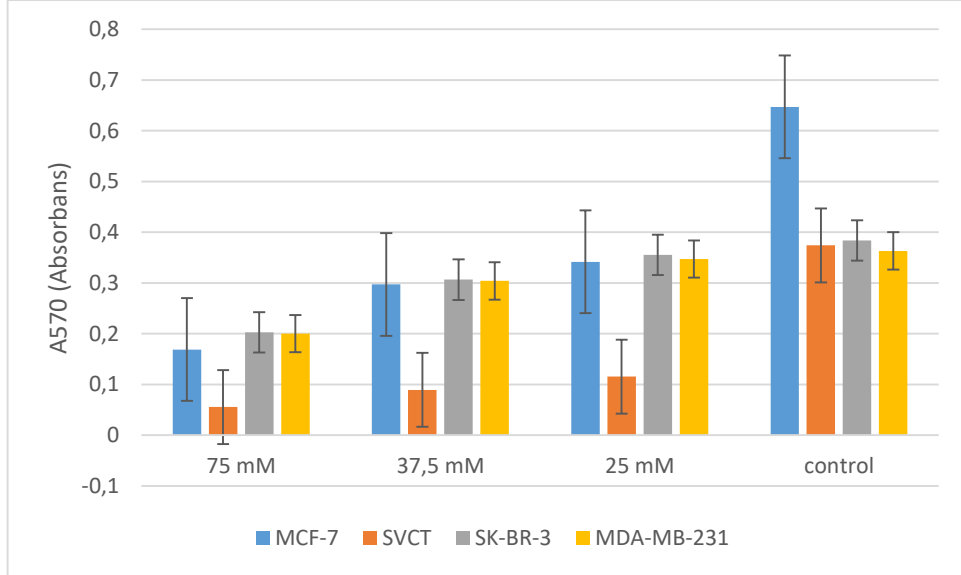
Şekil 4.56. Bassiatinin üç farklı konsantrasyonuna göre 72 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



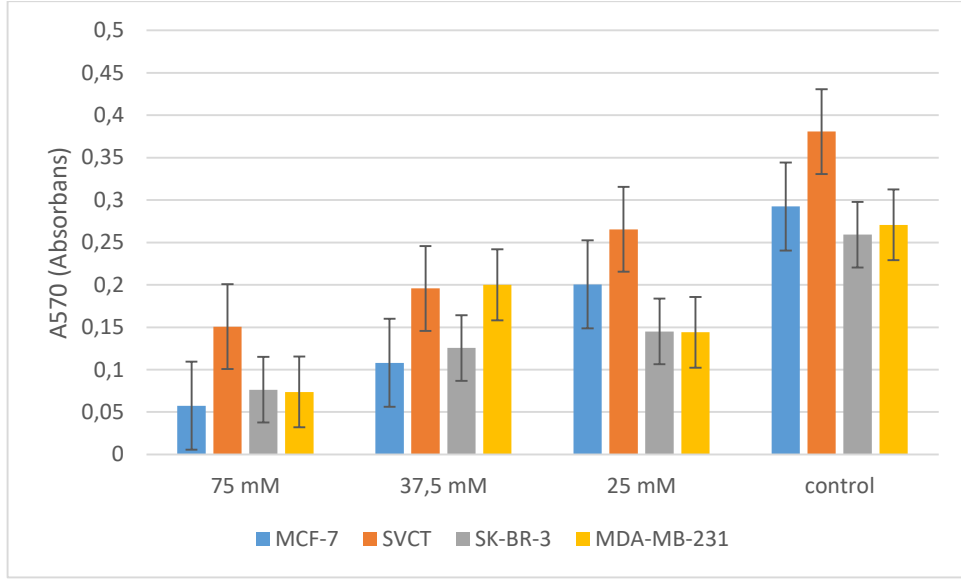
Şekil 4.57. Tamoksifenin üç farklı konsantrasyonuna göre 24 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



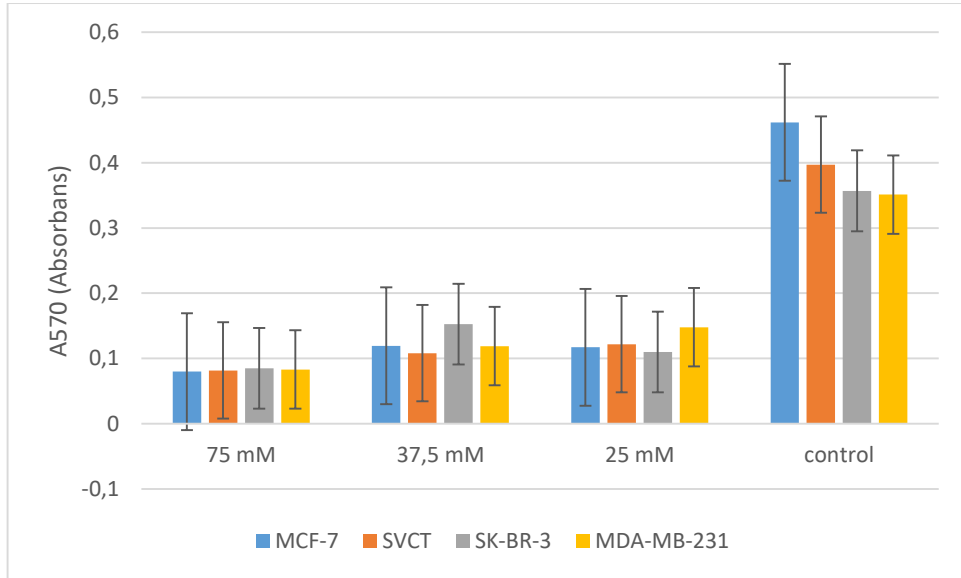
Şekil 4.58. Tamoksifenin üç farklı konsantrasyonuna göre 48 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



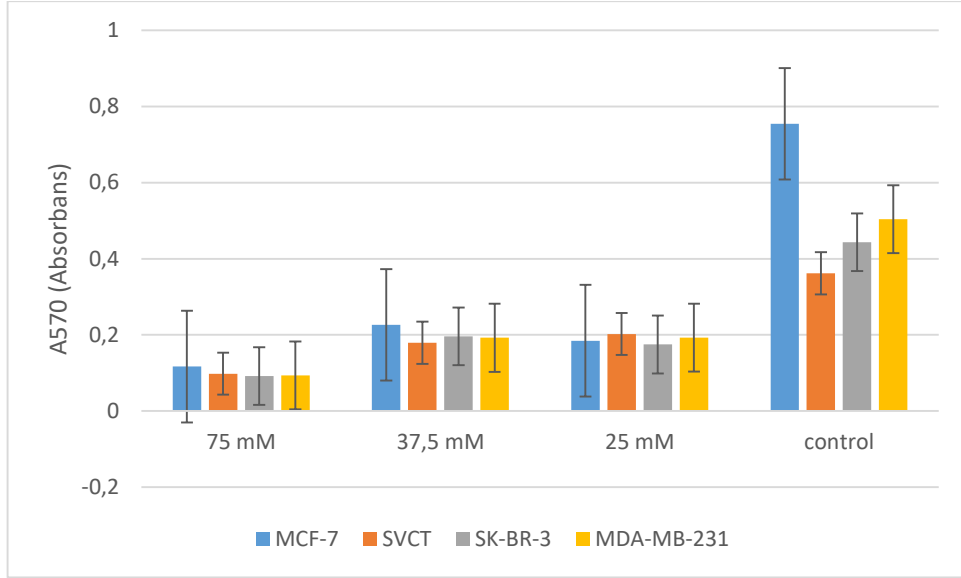
Şekil 4.59. Tamoksifenin üç farklı konsantrasyonuna göre 72 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



Şekil 4.60. Kombine maddenin üç farklı konsantrasyonuna göre 24 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



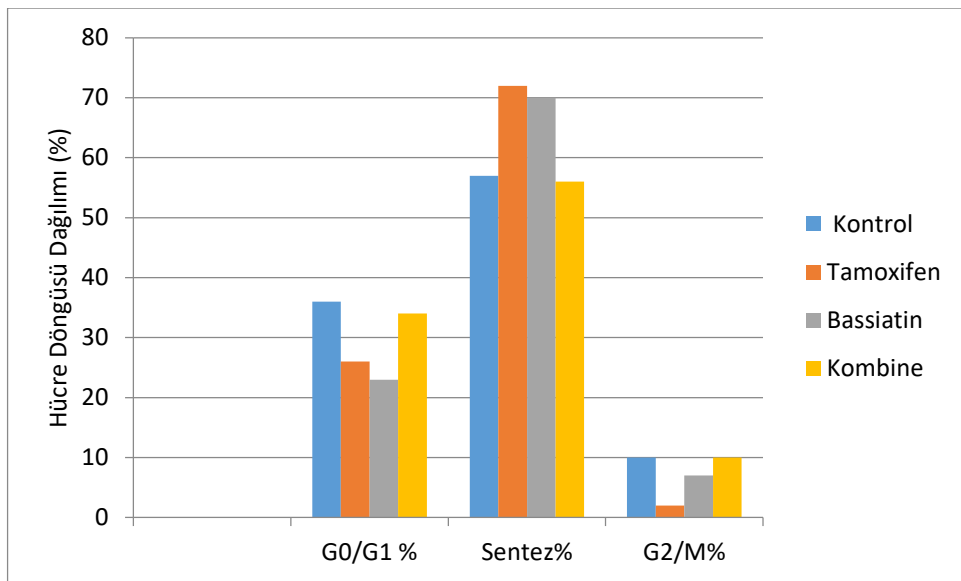
Şekil 4.61. Kombine maddenin üç farklı konsantrasyonuna göre 48 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



Şekil 4.62. Kombine maddenin üç farklı konsantrasyonuna göre 72 saat sonrası MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

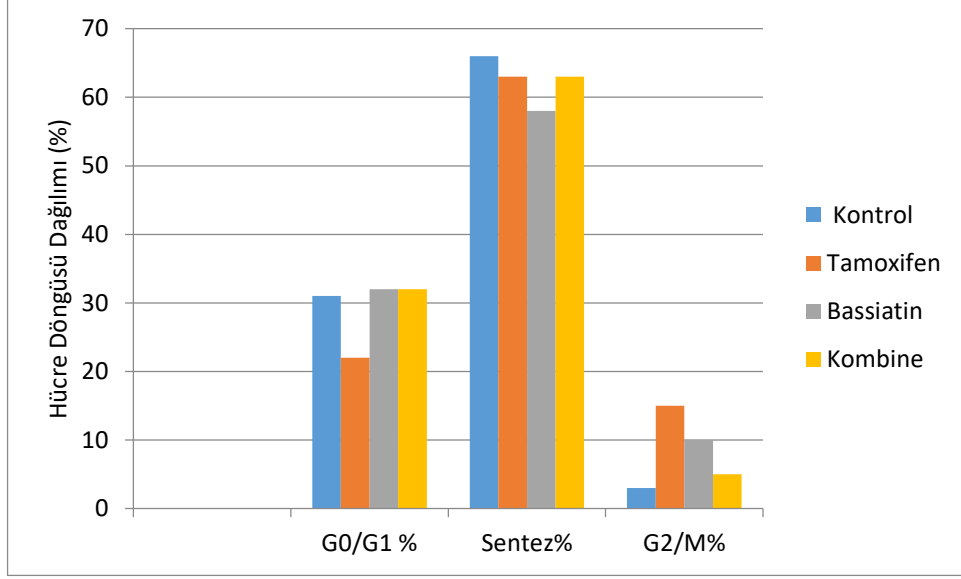
#### 4.5. MCF-7 ve SVCT Hücre Hatlarının Apoptozis Durumu ve Hücre Siklusu Analizinin Sonuçları

MCF-7 ve SVCT hücre hatlarının 37,5 mM bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonrası akım sitometri cihazı kullanılarak hücre siklusu analizleri yapılmış ve her inkübasyon periyodu bar grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 4.63., Şekil 4.64., Şekil 4.65. ve Şekil 4.66.). Hücre döngüsü dağılımı G0/G1, Sentez ve G2/M oranları doğrultusunda değerlendirilerek iki değişkenli histogramlar elde edilmiştir (Şekil 4.67., Şekil 4.68., Şekil 4.69., Şekil 4.70., Şekil 4.71., Şekil 4.72., Şekil 4.73., Şekil 4.74., Şekil 4.75., Şekil 4.76., Şekil 4.77., Şekil 4.78., Şekil 4.79., Şekil 4.80., Şekil 4.81. ve Şekil 4.82.).

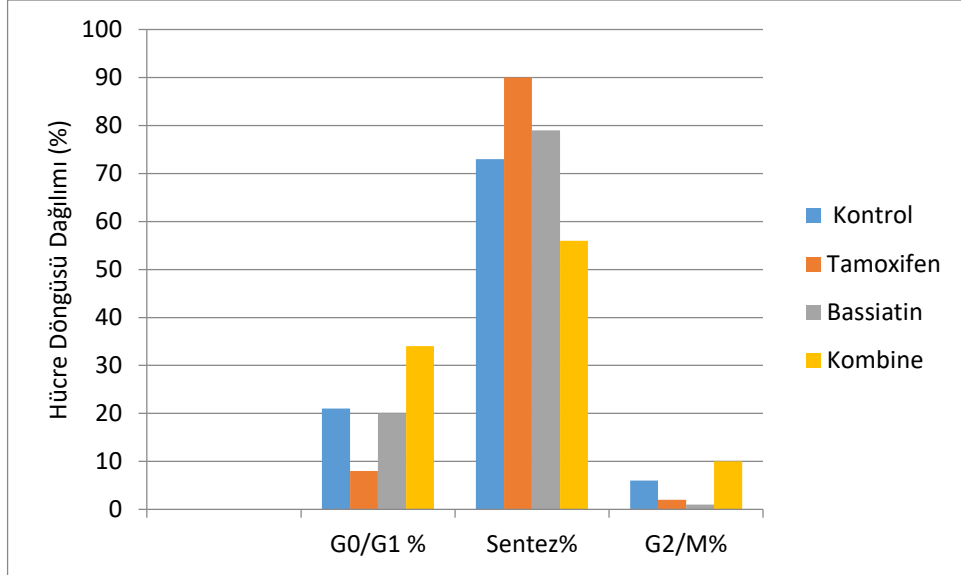


Şekil 4.63. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin 24 saat inkübasyonu sonrası hücre döngüsünün değerlendirilmesi

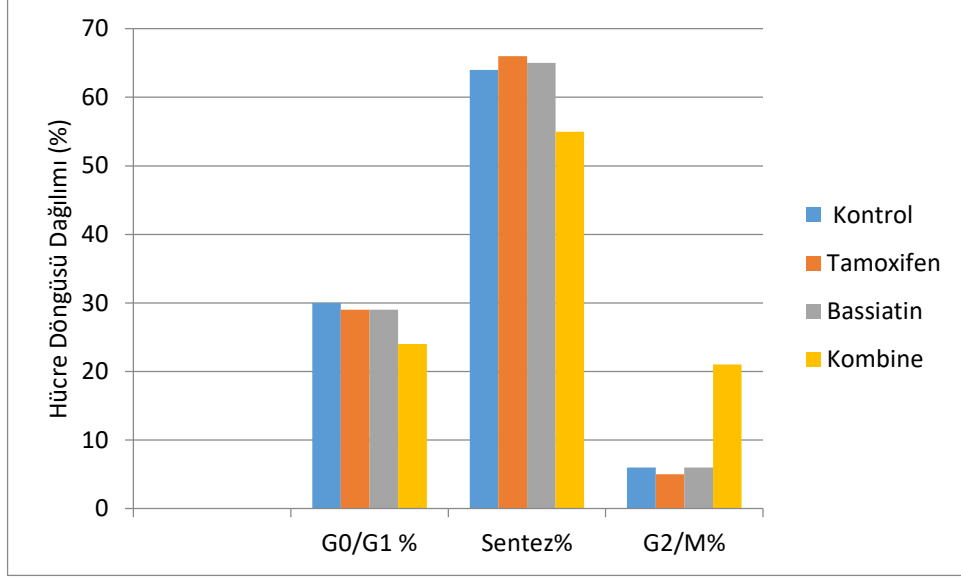




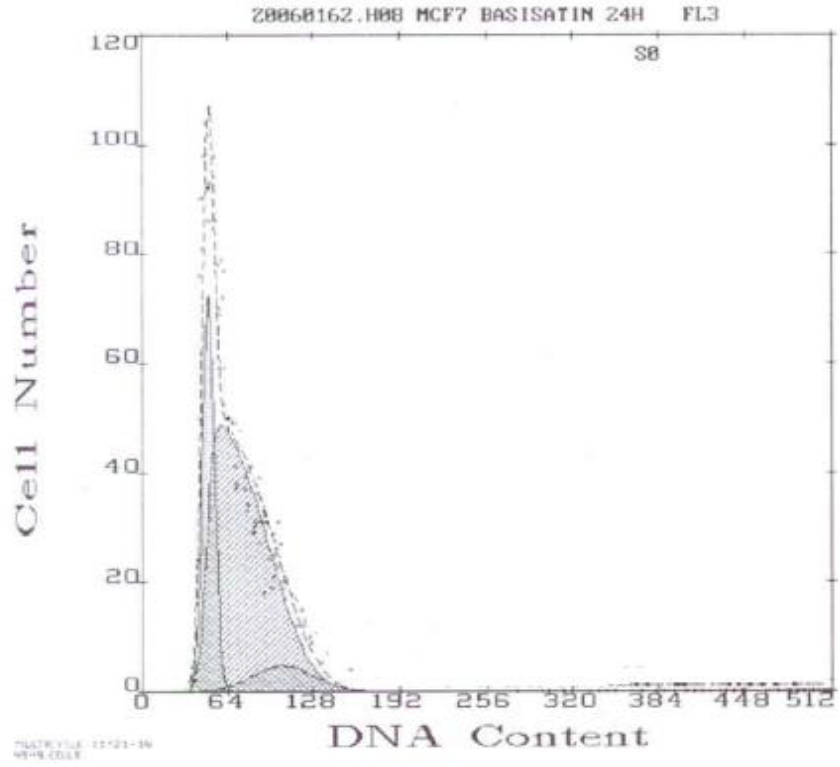
Şekil 4.64. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin 48 saat inkübasyonu sonrası hücre döngüsünün değerlendirilmesi



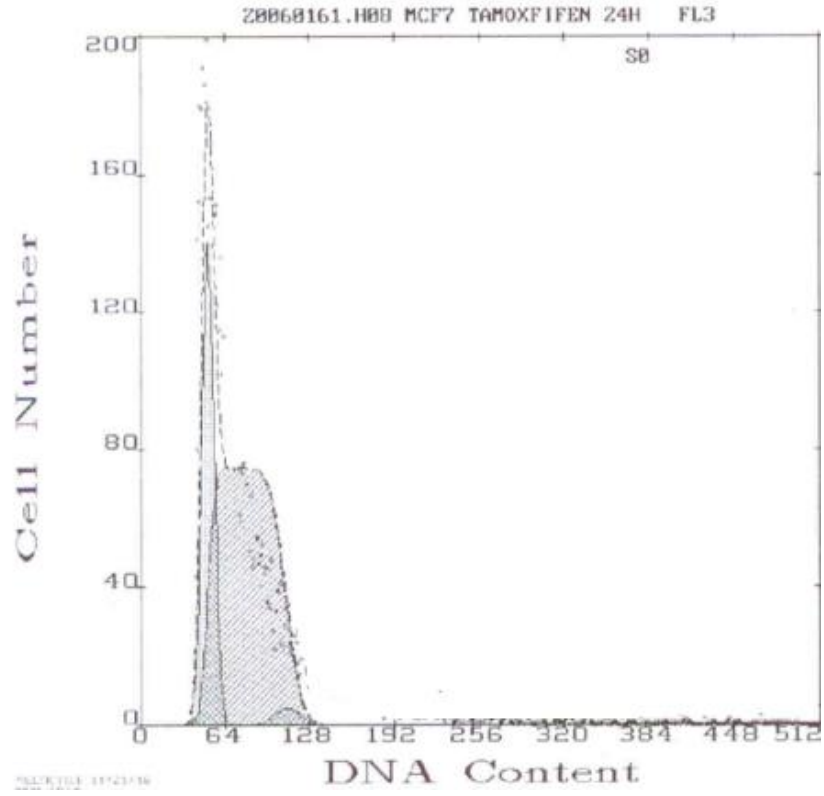
Şekil 4.65. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin 24 saat inkübasyonu sonrası hücre döngüsünün değerlendirilmesi



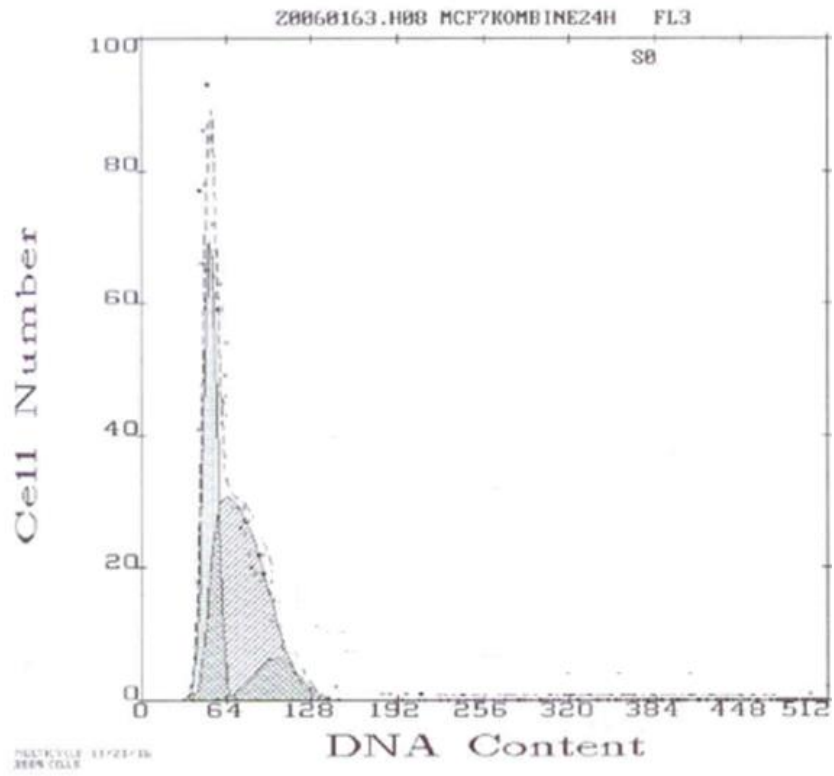
Şekil 4.66. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin 48 saat inkübasyonu sonrası hücre döngüsünün değerlendirilmesi



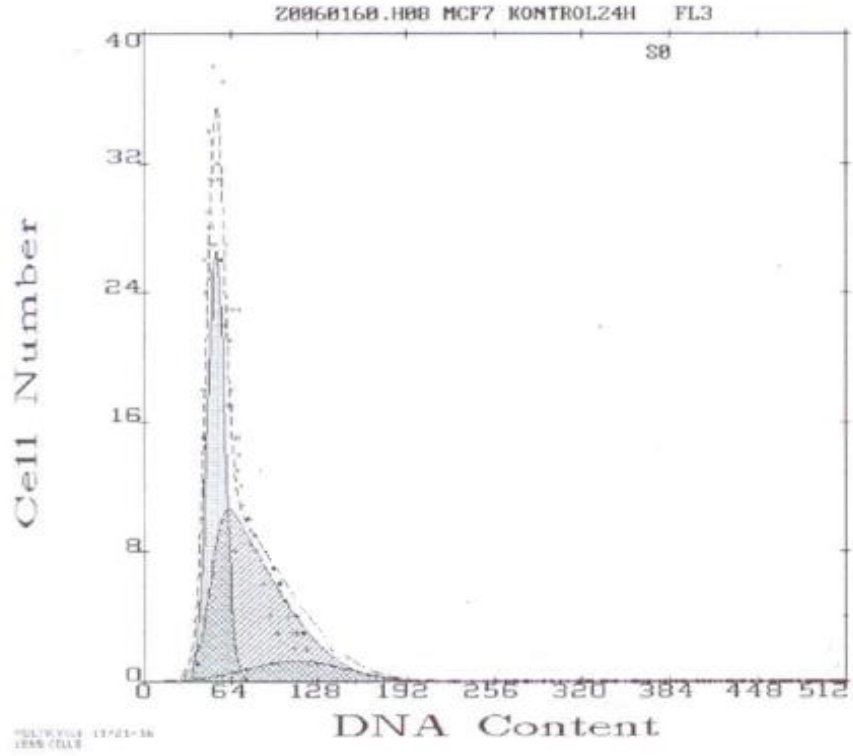
Şekil 4.67. MCF-7 hücrelerinin bassiatin ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



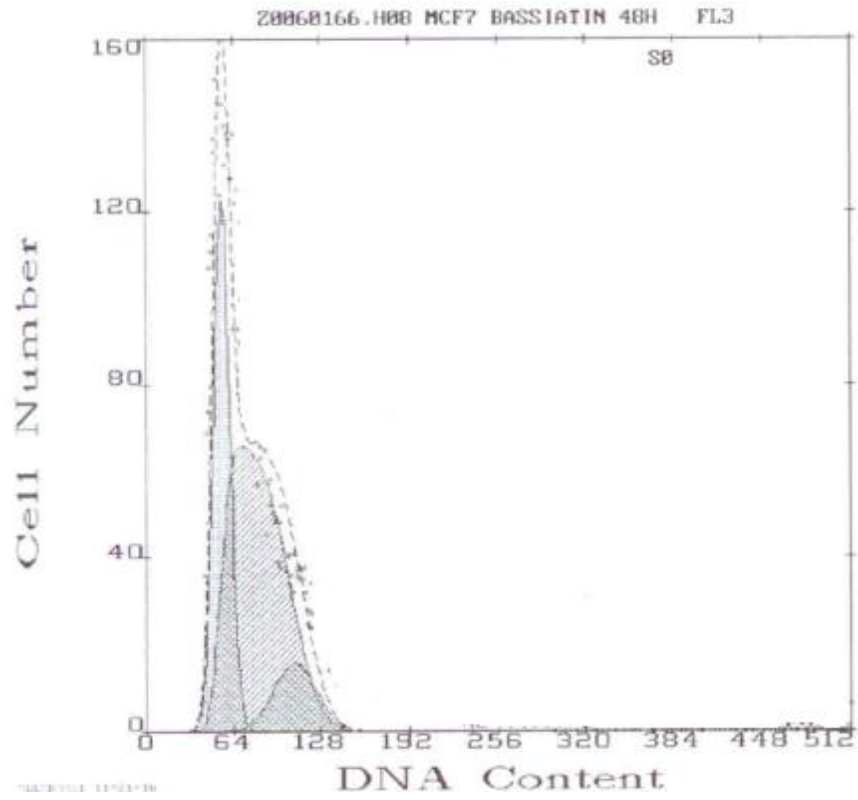
Şekil 4.68. MCF-7 hücrelerinin tamoksifen ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



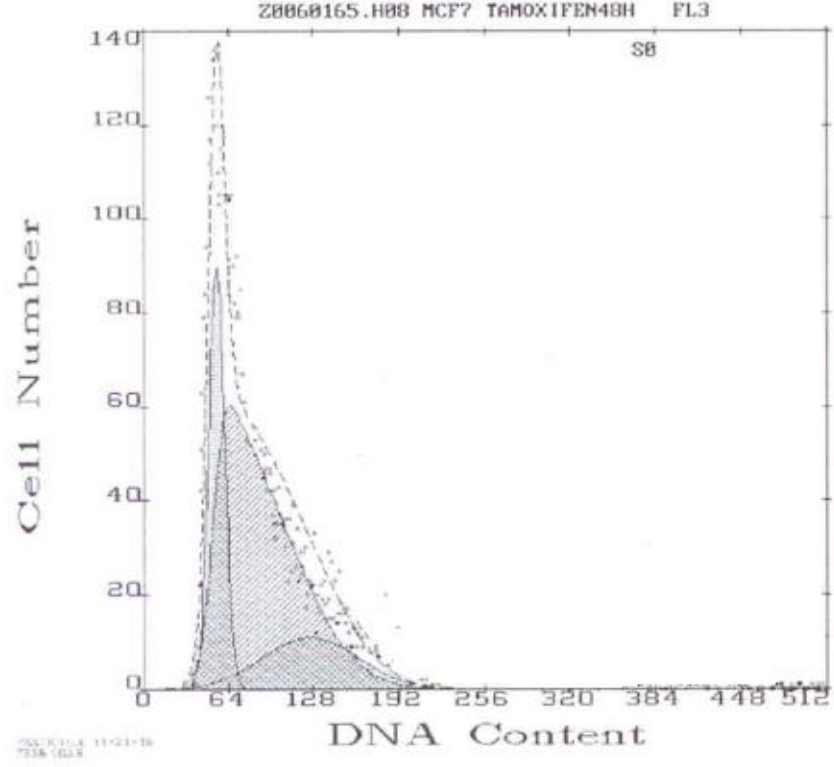
Şekil 4.69. MCF-7 hücrelerinin kombine madde ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



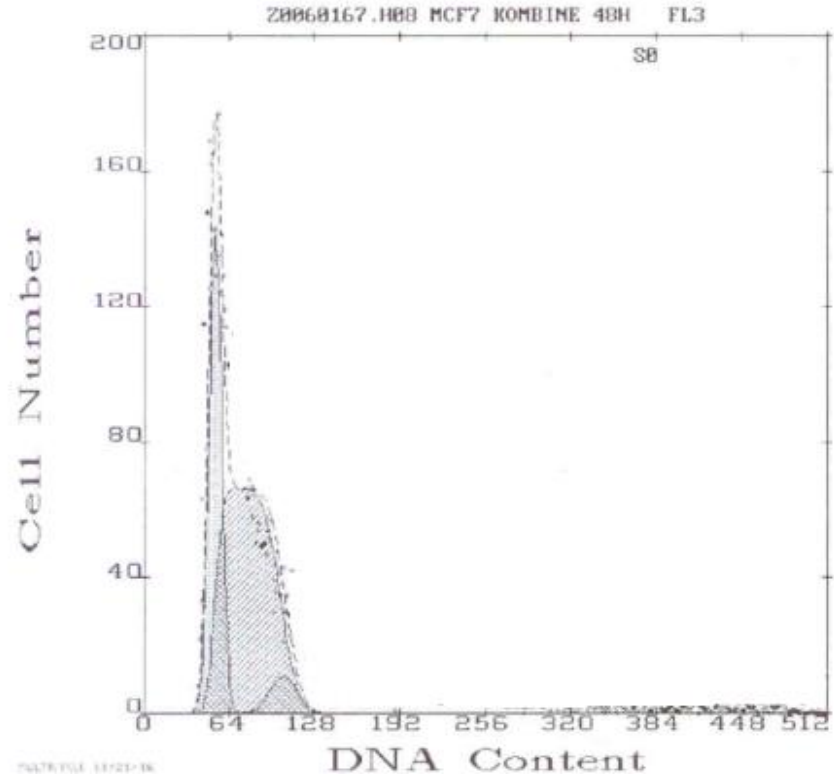
Şekil 4.70. MCF-7 kontrol hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



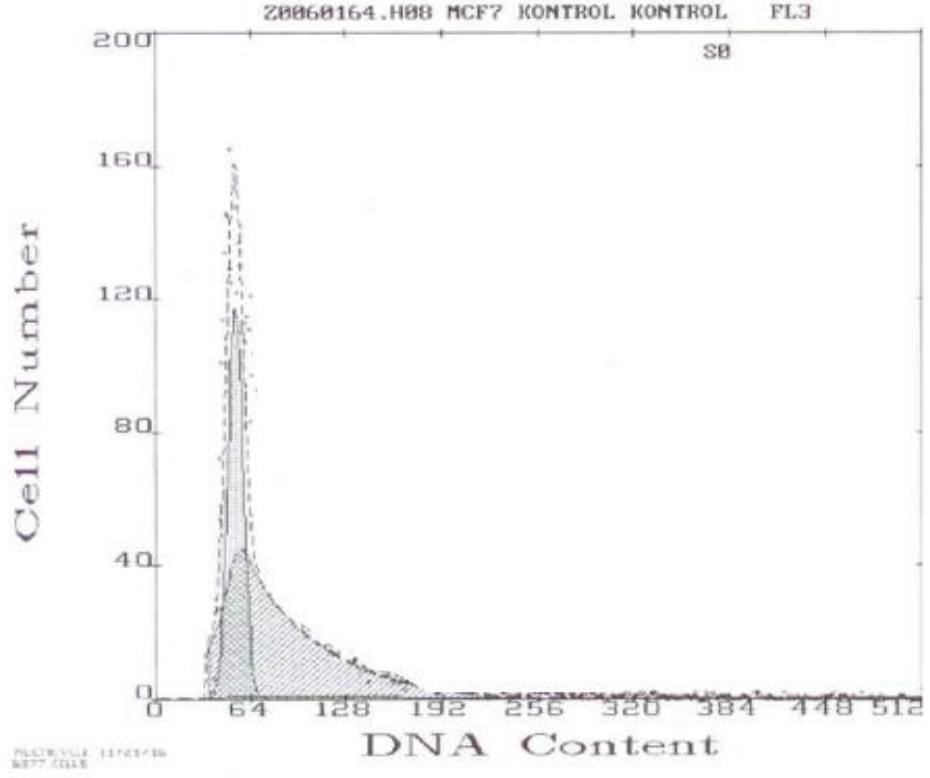
Şekil 4.71. MCF-7 hücrelerinin bassiatin ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



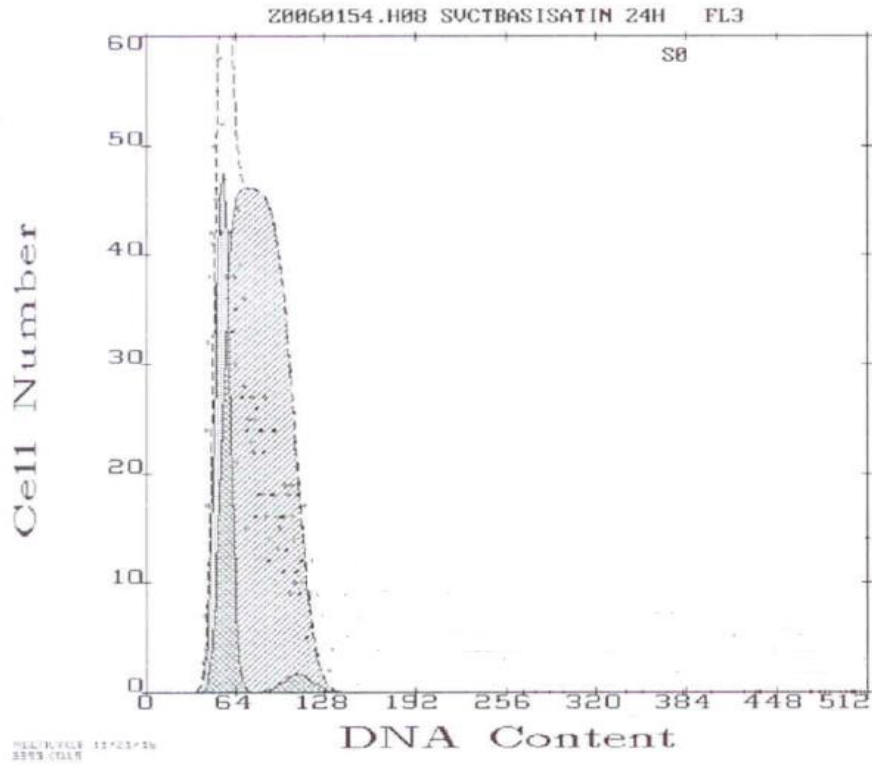
Şekil 4.72. MCF-7 hücrelerinin tamoksifen ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



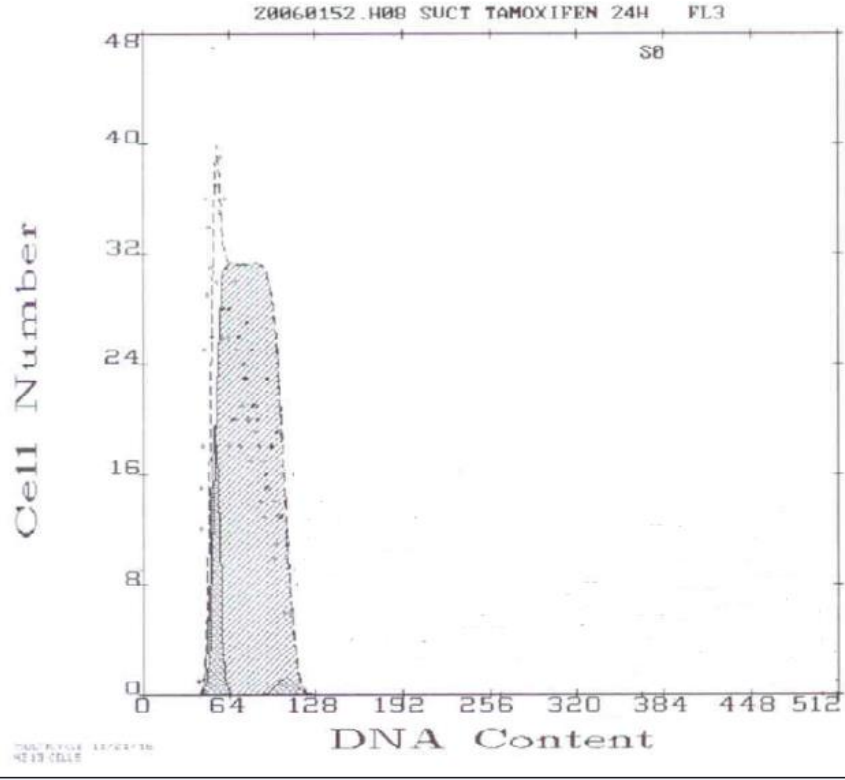
Şekil 4.73. MCF-7 hücrelerinin kombine madde ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



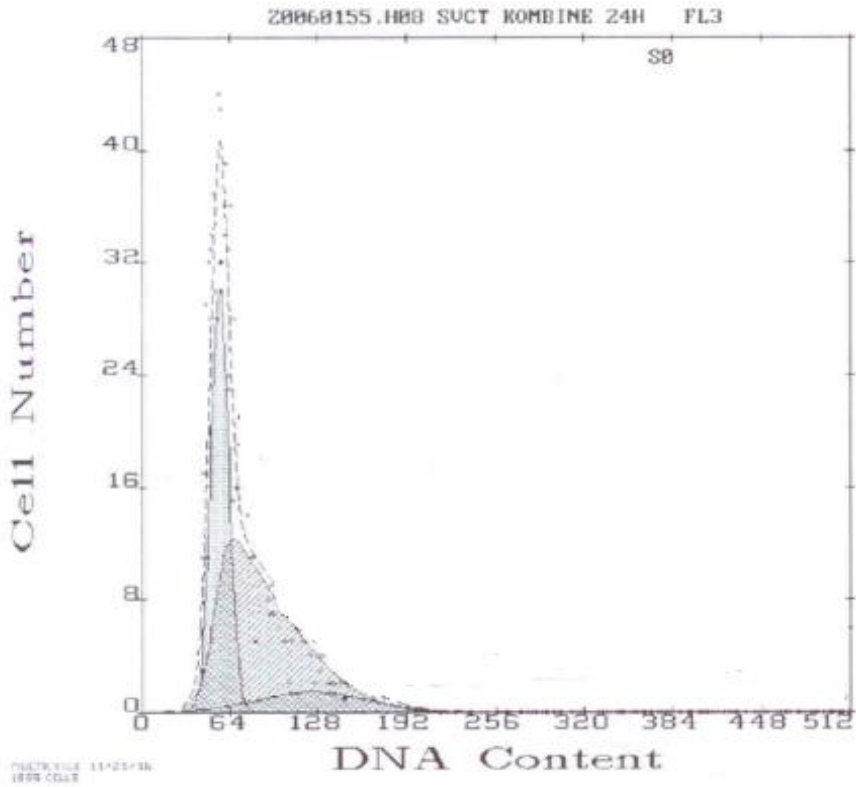
Şekil 4.74. MCF-7 kontrol hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



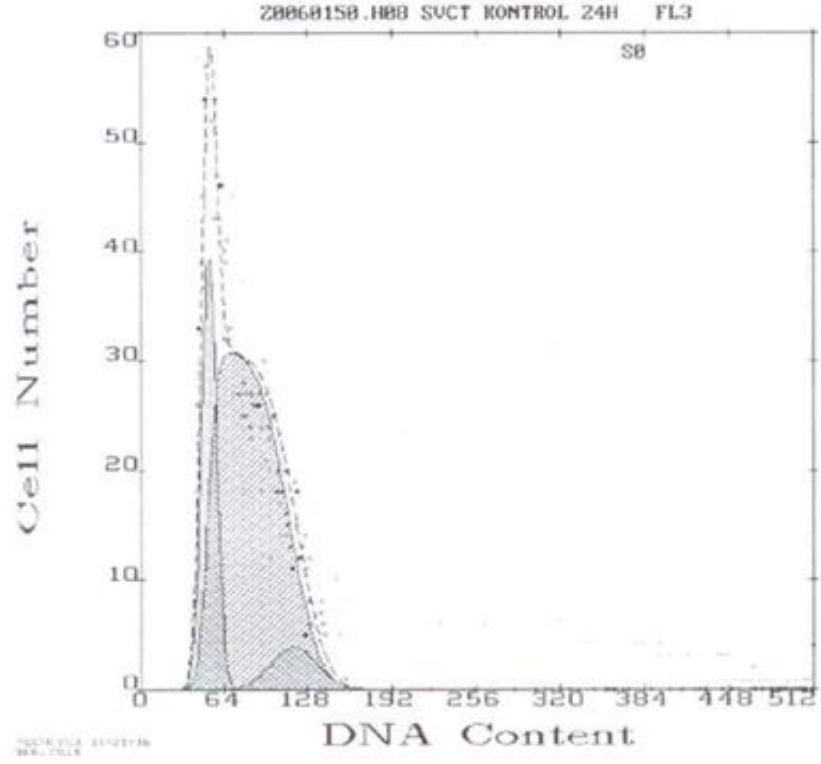
Şekil 4.75. SVCT hücrelerinin bassiatin ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



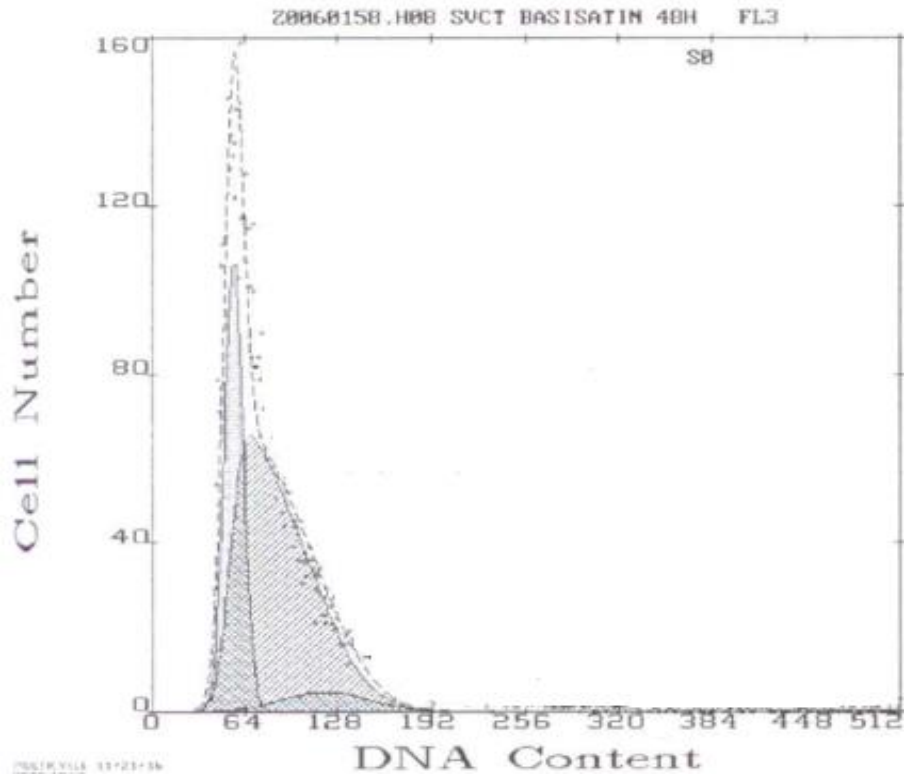
Şekil 4.76. SVCT hücrelerinin tamoksifen ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



Şekil 4.77. SVCT hücrelerinin kombine madde ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı

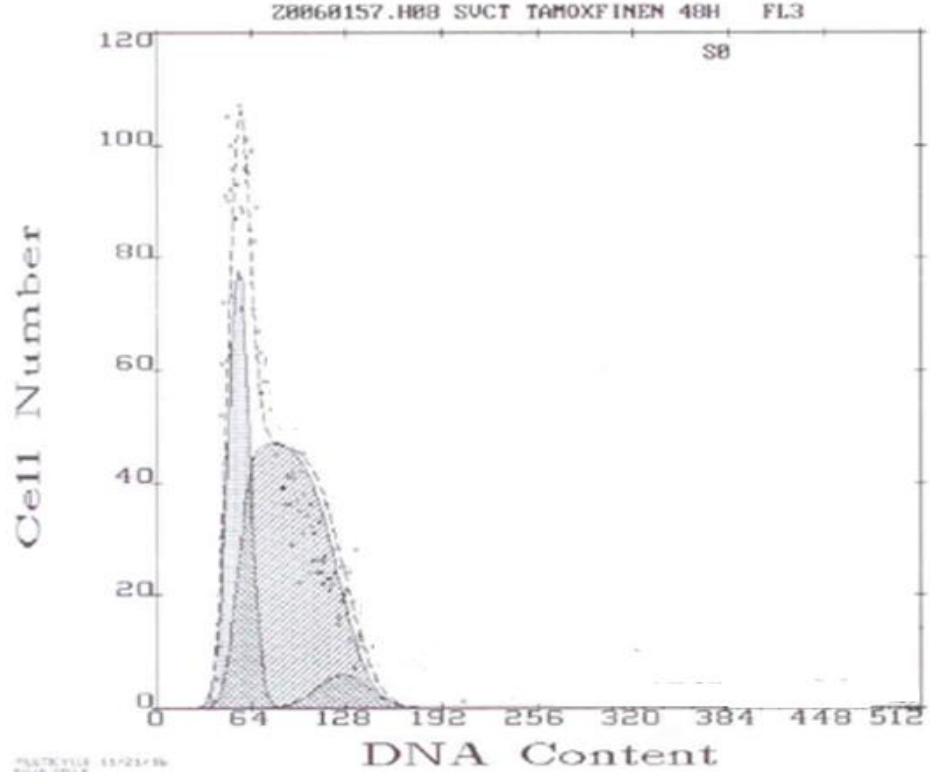


Şekil 4.78. SVCT kontrol hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı

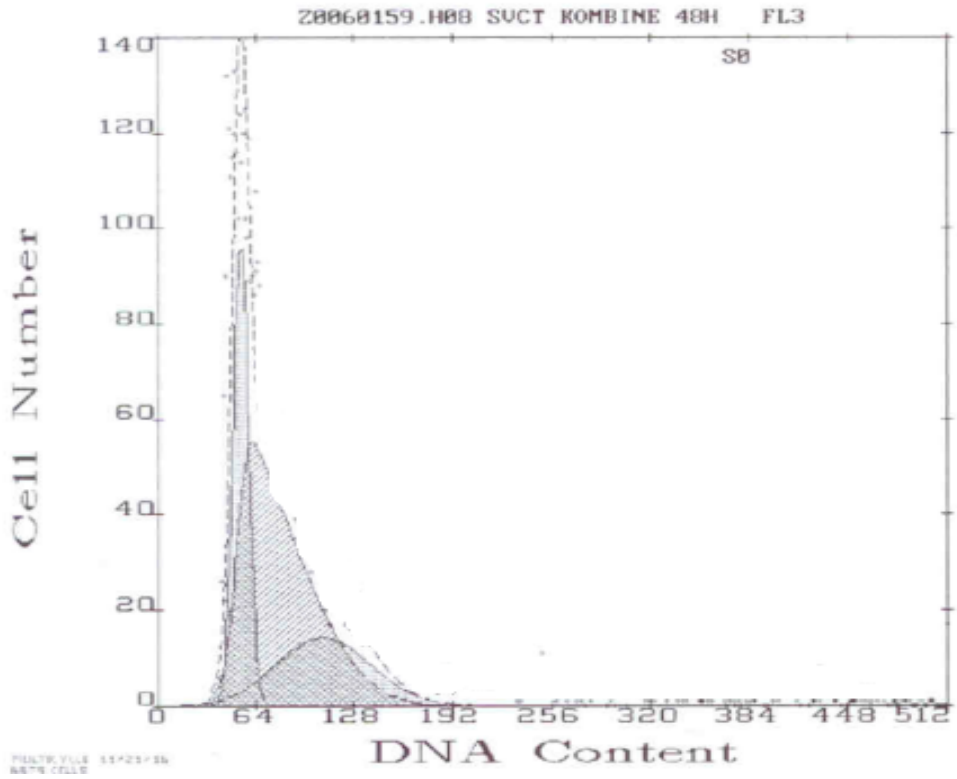


Şekil 4.79. SVCT hücrelerinin bassiatin ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı

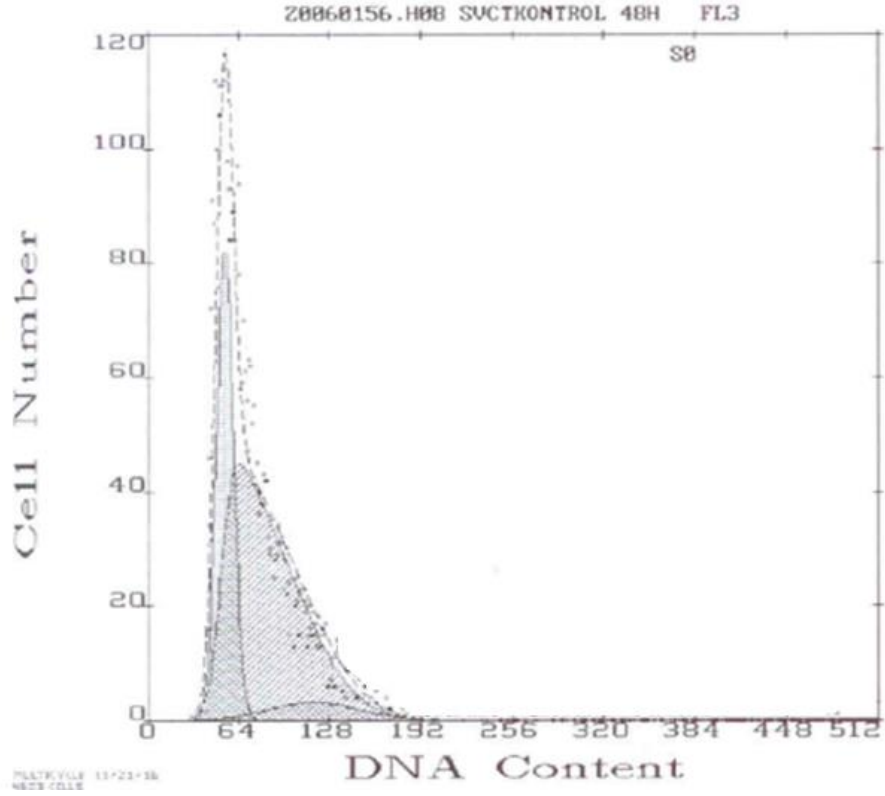




Şekil 4.80. SVCT hücrelerinin tamoksifen ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



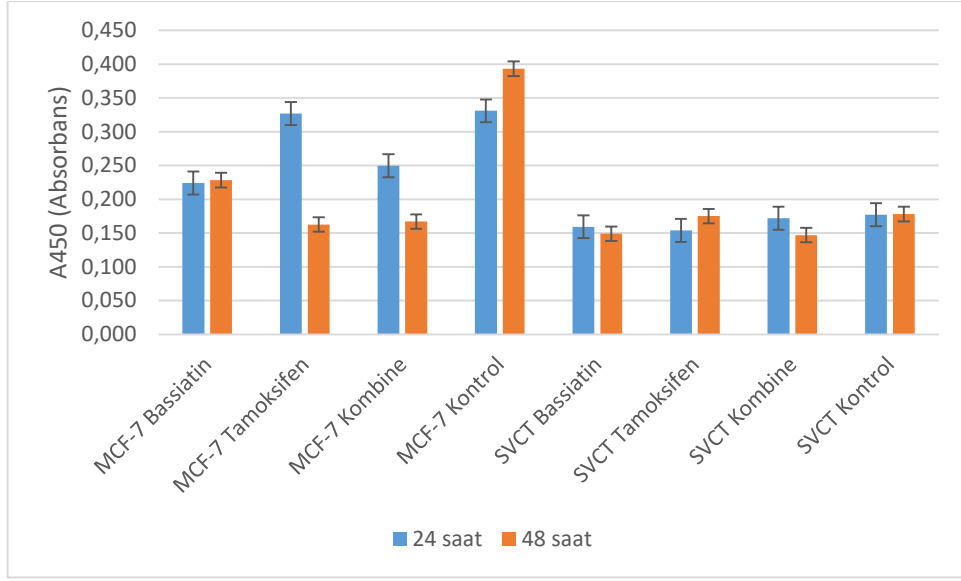
Şekil 4.81. SVCT hücrelerinin kombine madde ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı



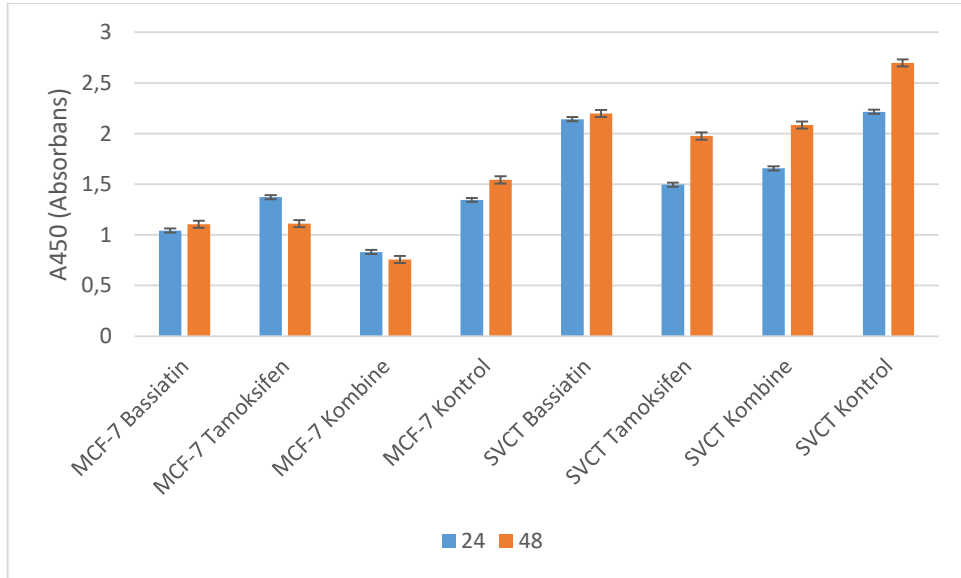
Şekil 4.82. SVCT kontrol hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre döngüsü dağılımı

#### 4.6. Bassiatinin ER, EGFR ve VEGFR Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesinde Elde Edilen Sonuçlar

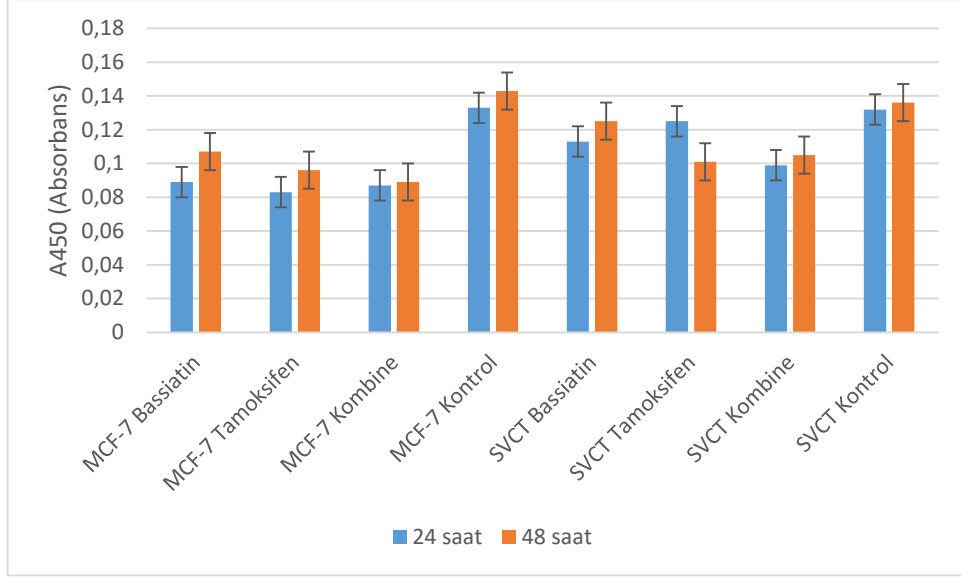
Ticari Eliza kitleri ile ER, EGFR ve VEGFR üzerinde bassiatinin olası etkilerinin incelenmesi sonucunda elde edilen veriler, oluşturulan grafikler ile değerlendirilmiştir. ER alfa tespiti için her bir kuyucuktaki ekstraktın miktarına bağlı olarak 450 nm'deki optik dansite değerleri kullanılmış ve bar grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.83). EGFR ve VEGFR 2 tespitinde ise 450 nm'deki optik dansiteler kullanılarak serbest reseptör miktarına bağlı olarak grafikler elde edilmiştir (Şekil 4.84 ve Şekil 4.85).



Şekil 4. 83. Bassiatin, Tamoksifen ve Kombine maddenin MCF-7 ve SVCT hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası ER alfa ile ilişkisinin karşılaştırılması



Şekil 4. 84. Bassiatin, Tamoksifen ve Kombine maddenin MCF-7 ve SVCT hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası EGFR ile ilişkisinin karşılaştırılması



Şekil 4. 85. Bassiatin, Tamoksifen ve Kombine maddenin MCF-7 ve SVCT hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası VEGFR ile ilişkisinin karşılaştırılması

#### 4.7. İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları

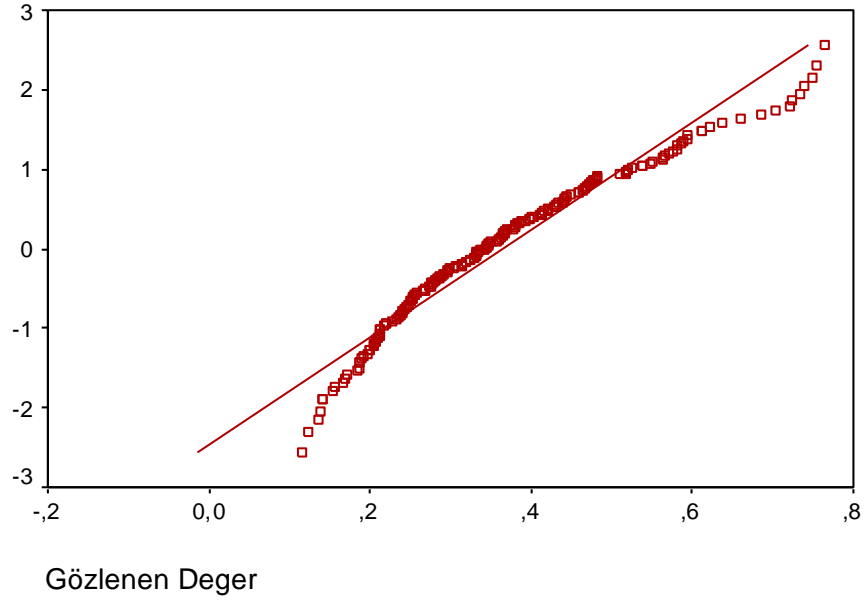
Sitotoksisite çalışmalarından elde edilen veriler ilk önce normallik testi ile değerlendirilmiştir. MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde bassiatin, tamoksifen ve kombine olmak üzere 3 madde açısından normallik testi ile karşılaştırma yapıldığı zaman; tüm verilerin normal dağılım göstermediği tespit edilmiştir ( $P < 0,05$ ) (Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.). Her 3 maddenin de Normal Q-Q plot grafiği ile normal dağılıma sahip olmadığı görülmektedir (Şekil 4.86, Şekil 4.87, Şekil 4.88, Şekil 4.89, Şekil 4.90 ve Şekil 4.91).

Çizelge 4.1. MCF-7 hücreleri üzerinde bassiatin, tamoksifen ve kombine maddeler ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışma verilerinin Normallik testi ile değerlendirilmesi (Kolmogorov-Smirnov,  $P < 0,05$ )

Madde	Kolmogorov-Smirnov		
	İstatistik	sd.	Sig.
Bassiatin	,084	192	,002
Tamoksifen	,127	192	,000
Kombine	,141	192	,000

## Normal Q-Q Plot

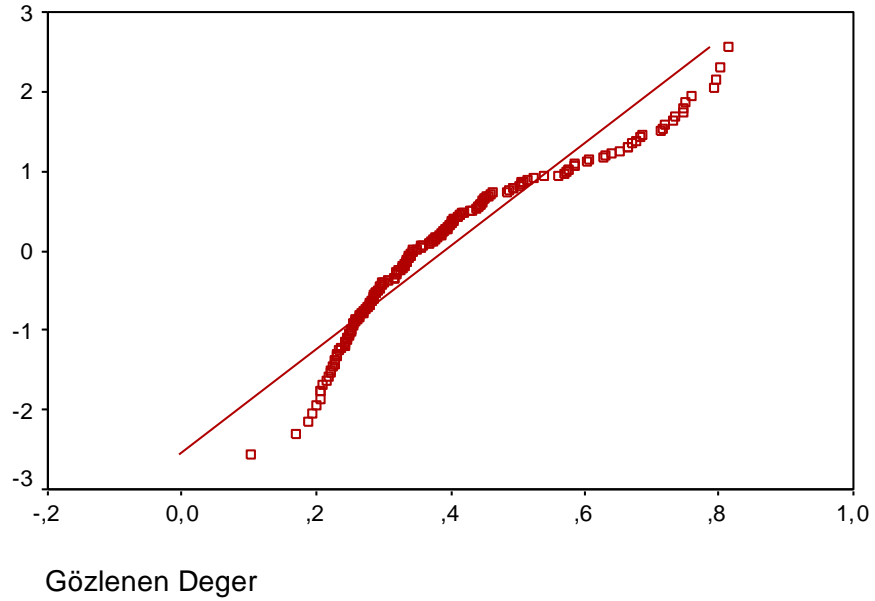
Bassiatin



Şekil 4.86. MCF-7 hücre hattı üzerinde bassiatin ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği

## Normal Q-Q Plot

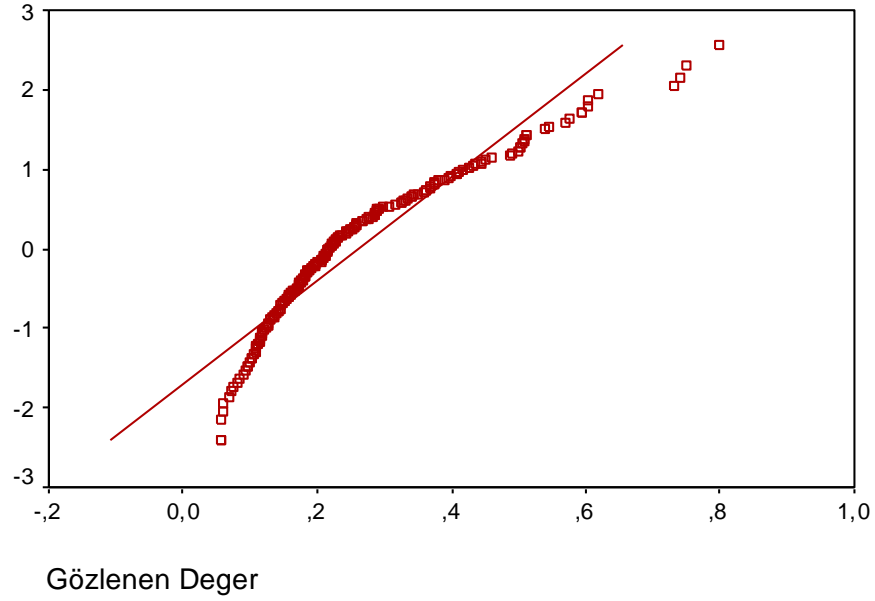
Tamoxifen



Şekil 4.87. MCF-7 hücre hattı üzerinde tamoksifen ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği

## Normal Q-Q Plot

Combine



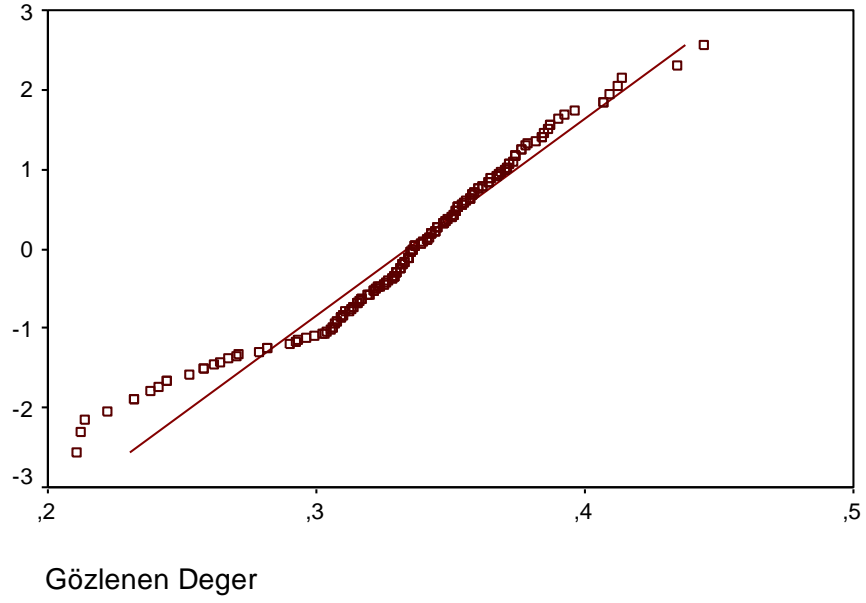
Şekil 4.88. MCF-7 hücre hattı üzerinde kombine madde ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği

Çizelge 4.2. SCVT hücreleri üzerinde bassiatin, tamoksifen ve kombine maddeler ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışma verilerinin Normallik testi ile değerlendirilmesi (Kolmogorov-Smirnov,  $P < 0,05$ )

Madde	Kolmogorov-Smirnov		
	İstatistik	sd.	Sig.
Bassiatin	,098	192	,000
Tamoksifen	,071	192	,019
Kombine	,144	192	,000

## Normal Q-Q Plot

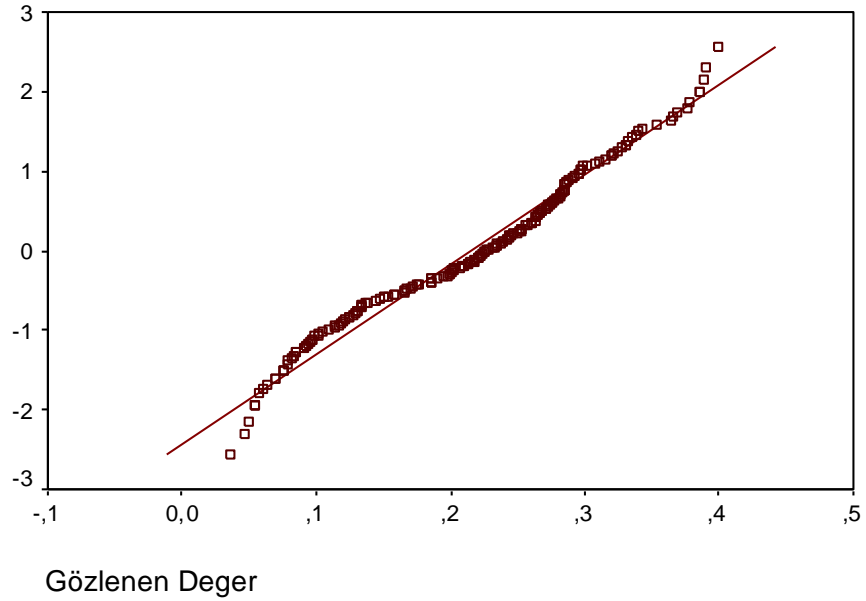
Bassiatin



Şekil 4.89. SVCT hücre hattı üzerinde bassiatin ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği

## Normal Q-Q Plot

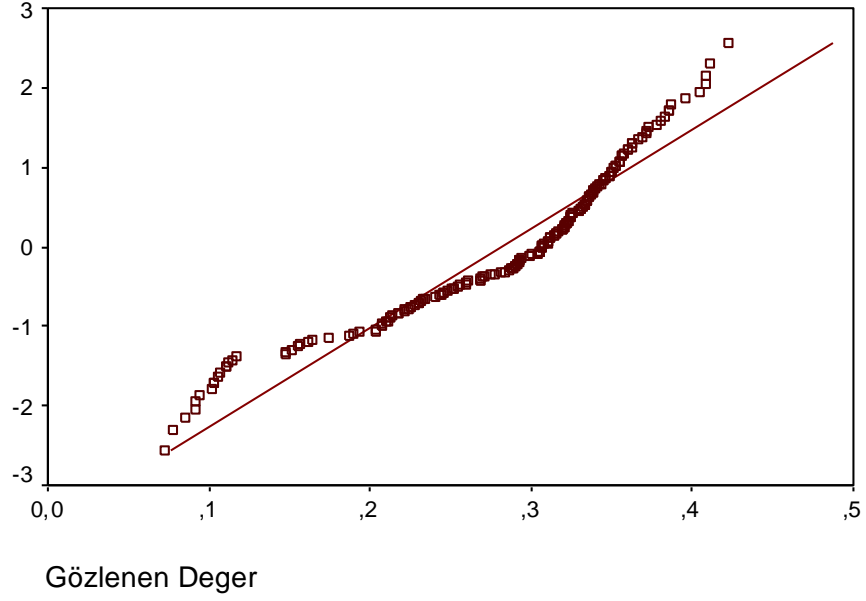
Tamoxifen



Şekil 4.90. SVCT hücre hattı üzerinde tamoksifen ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği

## Normal Q-Q Plot

Combine



Şekil 4.91. SVCT hücre hattı üzerinde kombine madde ile gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarında normal Q-Q plot grafiği

MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde sitotoksik özelliği açısından incelenen maddelerin her bir konsantrasyonu inkübasyon sürelerine göre değerlendirilmiş ve çoklu karşılaştırma yapılmıştır (Kruskal-Wallis test,  $P < 0,05$ ). Her madde için ayrı olarak karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.).



Çizelge 4.3. MCF-7 hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonların inkübasyon sürelerine göre karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>Bassiatin</b>	<b>Tamoksifen</b>	<b>Kombine</b>
<b>75</b>	2,818 ,244	6,731 ,035*	9,881 ,007*
<b>37,5</b>	6,500 ,039*	2,000 ,386	7,538 ,023*
<b>25</b>	7,883 ,019*	2,586 ,274	6,962 ,031*
<b>18,75</b>	4,769 ,092	6,000 ,050	7,538 ,023*
<b>12,5</b>	5,654 ,059	5,692 ,058	9,269 ,010*
<b>7,5</b>	7,538 ,023*	7,385 ,025*	7,538 ,023*
<b>6,25</b>	7,423 ,024*	4,192 ,123	6,500 ,039*
<b>5</b>	7,538 ,023*	8,346 ,015*	6,577 ,037*
<b>3,75</b>	5,692 ,058	4,192 ,123	6,962 ,031*
<b>3</b>	7,269 ,026*	7,269 ,026*	9,846 ,007*
<b>2,5</b>	9,269 ,010*	9,846 ,007*	7,565 ,023*
<b>2</b>	7,269 ,026*	7,385 ,025*	6,731 ,035*
<b>1,25</b>	8,346 ,015*	9,846 ,007*	9,269 ,010*
<b>0,5</b>	7,731 ,021*	8,000 ,018*	8,000 ,018*
<b>0,25</b>	8,769 ,012*	9,846 ,007*	7,731 ,021*

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.4. SVCT hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonların inkübasyon sürelerine göre karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>Bassiatin</b>	<b>Tamoksifen</b>	<b>Kombine</b>
<b>75</b>	2,508 ,285	7,528 ,023*	9,302 ,010*
<b>37,5</b>	2,094 ,351	6,615 ,037*	7,538 ,023*
<b>25</b>	,965 ,617	8,654 ,013*	9,846 ,007*
<b>18,75</b>	1,578 ,454	8,028 ,018*	7,320 ,026*
<b>12,5</b>	,473 ,789	8,000 ,018*	6,615 ,037*
<b>7,5</b>	6,269 ,044*	7,420 ,024*	4,962 ,084
<b>6,25</b>	,615 ,735	8,018 ,018*	4,962 ,084
<b>5</b>	1,636 ,441	7,449 ,024*	9,269 ,010*
<b>3,75</b>	3,126 ,209	6,986 ,030*	6,731 ,035*
<b>3</b>	2,432 ,296	3,846 ,146	8,346 ,015*
<b>2,5</b>	3,500 ,174	3,136 ,208	7,538 ,023*
<b>2</b>	,010 ,995	2,152 ,341	8,346 ,015*
<b>1,25</b>	1,654 ,437	2,113 ,348	7,269 ,026*
<b>0,5</b>	2,926 ,232	6,577 ,037*	1,196 ,550
<b>0,25</b>	1,077 ,584	8,375 ,015*	1,249 ,535

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde maddelerin her bir konsantrasyonu birbirleri arasında değerlendirilmiş ve çoklu karşılaştırma yapılmıştır (Kruskal-Wallis test, P<0,05). Her konsantrasyon ve inkübasyon süresi için ayrı olarak karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.5. MCF-7 hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>75</b>	7,592 ,022*	7,538 ,023*	7,269 ,026*
<b>37,5</b>	7,385 ,025*	8,769 ,012*	6,962 ,031*
<b>25</b>	7,385 ,025*	9,846 ,007*	7,423 ,024*
<b>18,75</b>	7,538 ,023*	2,885 ,236	5,115 ,077
<b>12,5</b>	6,000 ,050	8,769 ,012*	2,615 ,271
<b>7,5</b>	4,769 ,092	7,038 ,030*	8,000 ,018*
<b>6,25</b>	5,692 ,058	4,525 ,104	,462 ,794
<b>5</b>	6,500 ,039*	8,346 ,015*	9,846 ,007*
<b>3,75</b>	2,808 ,246	5,115 ,077	,731 ,694
<b>3</b>	2,000 ,368	7,652 ,022*	3,500 ,174
<b>2,5</b>	7,388 ,025*	8,769 ,012*	7,423 ,024*
<b>2</b>	4,892 ,087	4,962 ,084	9,846 ,007*
<b>1,25</b>	,038 ,981	7,423 ,024*	4,654 ,098
<b>0,5</b>	9,846 ,007*	5,538 ,063	7,654 ,022*
<b>0,25</b>	5,654 ,059	8,769 ,012*	3,962 ,138

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.6. SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin konsantrasyonlara göre karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>75</b>	9,846 ,007*	9,915 ,007*	9,881 ,007*
<b>37,5</b>	9,269 ,010*	9,846 ,007*	8,769 ,012*
<b>25</b>	3,231 ,119	9,881 ,007*	9,846 ,007*
<b>18,75</b>	9,335 ,009*	7,449 ,024*	8,375 ,015*
<b>12,5</b>	4,885 ,087	7,538 ,023*	9,846 ,007*
<b>7,5</b>	9,846 ,007*	7,385 ,025*	8,346 ,015*
<b>6,25</b>	3,231 ,119	7,731 ,021*	7,731 ,021*
<b>5</b>	8,375 ,015*	7,449 ,024*	7,538 ,023*
<b>3,75</b>	5,654 ,059	7,475 ,024*	9,846 ,007*
<b>3</b>	6,291 ,043*	7,497 ,024*	7,538 ,023*
<b>2,5</b>	6,615 ,037*	6,500 ,039*	7,538 ,023*
<b>2</b>	4,269 ,118	9,881 ,007*	7,654 ,022*
<b>1,25</b>	4,500 ,105	7,269 ,026*	1,077 ,584
<b>0,5</b>	5,115 ,077	7,538 ,023*	2,586 ,274
<b>0,25</b>	2,933 ,231	7,654 ,022*	,878 ,645

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Hem MCF-7 hem de SCVT hücreleri üzerinde bassiatin, tamoksifen ve kombine maddenin tüm konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası birbirleri ile Kruskal-wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.7. ve Çizelge 4.8.). MCF-7 için yapılan tüm karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunmuştur (P<0,05). SVCT için yapılan karşılaştırmada ise Bassiatinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarında konsantrasyonlar arası fark görülmezken (P>0,05) tamoksifen ve kombine maddenin konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (P<0,05).

Çizelge 4.7. MCF-7 hücre hattında maddelerin saatlere göre tüm konsantrasyonlar arasında karşılaştırılması (Kruskal Wallis, P<0,05)

<b>Madde</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>Bassiatin</b>	42,514 ,000*	27,434 ,025*	49,703 ,000*
<b>Tamoksifen</b>	33,405 ,004*	48,845 ,000*	43,539 ,000*
<b>Kombine</b>	40,717 ,000*	38,558 ,001*	54,973 ,000*

\*P<0,05'den küçük olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.8. SVCT hücre hattında maddelerin saatlere göre tüm konsantrasyonlar arasında karşılaştırılması (Kruskal Wallis, P<0,05)

<b>Madde</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>Bassiatin</b>	20,978 ,138	7,398 ,946	23,827 ,068
<b>Tamoksifen</b>	45,127 ,000*	48,563 ,000*	50,396 ,000*
<b>Kombine</b>	40,846 ,000*	55,732 ,000*	57,729 ,000*

\*P<0,05'den küçük olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Kruskal-Wallis testinde MCF-7 hücre hattında tüm konsantrasyonlar arasında, SVCT hücre hattında ise bassiatin dışındaki diğer maddelerin tüm konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunduğundan her maddenin kontrol ile konsantrasyonları arasındaki ikili karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir (Mann-Whitney U, P<0,05). İkili karşılaştırmalar sırasında doğru sonuçlar elde etmek için maddelerin inkübasyon sürelerine göre ayırım yapılarak istatistiksel çalışmalar yürütülmüştür (Çizelge 4.9., Çizelge 4.10., Çizelge 4.11., Çizelge 4.12., Çizelge 4.13. ve Çizelge 4.14.).

Çizelge 4.9. MCF-7 hücre hattı üzerinde bassiatinin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>75</b>	,000 ,020*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>37,5</b>	2,000 ,083	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>25</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>18,75</b>	,000 ,021*	4,000 ,248	,000 ,021*
<b>12,5</b>	,000 ,021*	8,000 1,000	,000 ,021*
<b>7,5</b>	1,000 ,043*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>6,25</b>	,000 ,021*	8,000 1,000	5,000 ,386
<b>5</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>3,75</b>	3,000 ,149	3,000 ,149	6,000 ,564
<b>3</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>2,5</b>	1,000 ,043*	3,500 ,191	,000 ,021*
<b>2</b>	,000 ,021*	4,000 ,248	6,000 ,564
<b>1,25</b>	1,000 ,043*	4,000 ,248	,000 ,021*
<b>0,5</b>	,000 ,021*	4,000 ,248	,000 ,021*
<b>0,25</b>	,000 ,021*	3,000 ,149	7,000 ,773

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.10. MCF-7 hücre hattı üzerinde tamoksifenin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>75</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>37,5</b>	2,000 ,083	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>25</b>	1,000 ,043*	,000 ,020*	,000 ,021*
<b>18,75</b>	4,000 ,248	,000 ,021*	3,000 ,149
<b>12,5</b>	4,000 ,248	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>7,5</b>	7,000 ,773	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>6,25</b>	6,500 ,663	,000 ,021*	2,000 ,083
<b>5</b>	7,000 ,773	,000 ,021*	7,000 ,773
<b>3,75</b>	6,000 ,564	3,500 ,191	2,000 ,083
<b>3</b>	3,000 ,149	,000 ,021*	7,000 ,773
<b>2,5</b>	8,000 1,000	3,000 ,149	5,000 ,386
<b>2</b>	5,000 ,386	,000 ,021*	2,000 ,083
<b>1,25</b>	3,000 ,149	2,000 ,083	5,000 ,386
<b>0,5</b>	6,000 ,564	7,000 ,773	6,000 ,564
<b>0,25</b>	4,000 ,248	6,000 ,564	5,000 ,386

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.11. MCF-7 hücre hattı üzerinde kombine maddenin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>75</b>	,000 ,020*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>37,5</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>25</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>18,75</b>	1,000 ,043*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>12,5</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>7,5</b>	1,000 ,043*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>6,25</b>	3,000 ,149	3,000 ,149	,000 ,021*
<b>5</b>	3,000 ,149	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>3,75</b>	4,000 ,248	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>3</b>	6,000 ,564	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>2,5</b>	,000 ,020*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>2</b>	3,000 ,149	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>1,25</b>	8,000 1,000	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>0,5</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>0,25</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.



Çizelge 4.12. SVCT hücre hattı üzerinde bassiatinin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>75</b>	3,000 ,149	8,000 1,000	2,000 ,083
<b>37,5</b>	2,000 ,083	6,000 ,564	1,000 ,043*
<b>25</b>	1,000 ,043*	8,000 1,000	1,000 ,043*
<b>18,75</b>	4,000 ,248	4,000 ,248	2,000 ,083
<b>12,5</b>	2,000 ,083	5,000 ,386	2,000 ,083
<b>7,5</b>	7,000 ,773	5,000 ,386	,000 ,021*
<b>6,25</b>	1,000 ,043*	8,000 1,000	2,000 ,083
<b>5</b>	,000 ,020*	6,000 ,564	1,000 ,043*
<b>3,75</b>	3,000 ,149	5,000 ,384	2,000 ,083
<b>3</b>	,000 ,020*	4,000 ,248	1,000 ,043*
<b>2,5</b>	6,000 ,564	6,000 ,564	1,000 ,043*
<b>2</b>	2,000 ,083	7,500 ,884	2,000 ,083
<b>1,25</b>	1,000 ,043*	5,000 ,386	,000 ,021*
<b>0,5</b>	,000 ,021*	5,000 ,386	2,000 ,083
<b>0,25</b>	4,000 ,248	6,000 ,564	,000 ,021*

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.13. SVCT hücre hattı üzerinde tamoksifenin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05)

Konsantrasyon (mM)	24 saat	48 saat	72 saat
75	,000 ,021*	,000 ,020*	,000 ,021*
37,5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
25	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
18,75	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,020*
12,5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
7,5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
6,25	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
5	,000 ,021*	2,000 ,081	,000 ,021*
3,75	,000 ,021*	,000 ,020*	,000 ,021*
3	,000 ,021*	2,000 ,083	,000 ,021*
2,5	,000 ,021*	2,000 ,083	,000 ,021*
2	,000 ,021*	4,000 ,248	,000 ,021*
1,25	,000 ,021*	4,000 ,248	2,500 ,110
0,5	,000 ,021*	4,000 ,248	3,000 ,149
0,25	,000 ,020*	3,000 ,149	2,000 ,083

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.14. SVCT hücre hattı üzerinde kombine maddenin kontrol grubu ile karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05)

Konsantrasyon (mM)	24 saat	48 saat	72 saat
75	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,020*
37,5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
25	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
18,75	,000 ,020*	,000 ,020*	,000 ,020*
12,5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
7,5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
6,25	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
3,75	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
3	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
2,5	3,000 ,149	,000 ,021*	,000 ,021*
2	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
1,25	,000 ,021*	,000 ,021*	1,000 ,043*
0,5	,000 ,021*	,000 ,021*	3,000 ,149
0,25	3,000 ,149	1,000 ,043*	6,000 ,564

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde yapılan bassiatin, tamoksifen ve kombine madde ile sitotoksisite çalışmaları sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda iki hücre hattı karşılaştırılmıştır (Mann-Whitney U, P<0,05). Bu karşılaştırmada her konsantrasyon ve inkübasyon süresi için ayrı ayrı değerlendirme yapılmıştır (Çizelge 4.15., Çizelge 4.16. ve Çizelge 4.17.).

Çizelge 4.15. Bassiatinin konsantrasyonlarına göre MCF-7 ve SVCT hücre hatlarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>75</b>	1,000 ,042*	,000 ,020*	1,000 ,043*
<b>37,5</b>	1,000 ,043*	1,000 ,043*	,000 ,021*
<b>25</b>	1,000 ,043*	1,000 ,043*	,000 ,021*
<b>18,75</b>	,000 ,020*	1,000 ,043*	,000 ,021*
<b>12,5</b>	1,000 ,043*	1,000 ,043*	1,000 ,043*
<b>7,5</b>	2,000 ,083	5,000 ,386	,000 ,021*
<b>6,25</b>	1,000 ,043*	5,000 ,386	6,000 ,564
<b>5</b>	,000 ,020*	,000 ,021*	4,000 ,248
<b>3,75</b>	5,000 ,386	4,000 ,245	2,000 ,083
<b>3</b>	,000 ,020*	4,000 ,248	1,000 ,043*
<b>2,5</b>	1,000 ,043*	2,000 ,083	,000 ,021*
<b>2</b>	1,000 ,043*	8,000 ,000	,000 ,021*
<b>1,25</b>	7,000 ,773	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>0,5</b>	5,000 ,386	7,000 ,773	,000 ,021*
<b>0,25</b>	3,000 ,149	8,000 ,000	,000 ,021*

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.16. Tamoksifenin konsantrasyonlarına göre MCF-7 ve SVCT hücre hatlarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05)

<b>Konsantrasyon (mM)</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>75</b>	2,000 ,083	2,000 ,083	2,000 ,083
<b>37,5</b>	1,000 ,043*	3,500 ,191	,000 ,021*
<b>25</b>	5,500 ,468	2,000 ,083	2,000 ,083
<b>18,75</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>12,5</b>	3,500 ,191	1,500 ,058	,000 ,021*
<b>7,5</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>6,25</b>	2,000 ,083	,000 ,021*	1,000 ,043*
<b>5</b>	3,000 ,149	2,000 ,083	,000 ,021*
<b>3,75</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>3</b>	7,000 ,773	4,000 ,248	,000 ,021*
<b>2,5</b>	1,000 ,043*	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>2</b>	3,000 ,149	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>1,25</b>	4,000 ,248	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>0,5</b>	1,500 ,058	,000 ,021*	,000 ,021*
<b>0,25</b>	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.17. Kombine maddenin konsantrasyonlarına göre MCF-7 ve SVCT hücre hatlarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U, P<0,05)

Konsantrasyon (mM)	24 saat	48 saat	72 saat
75	,000 ,020*	,000 ,021*	,000 ,021*
37,5	,000 ,021*	1,000 ,043*	1,000 ,043*
25	,000 ,021*	2,000 ,083	2,000 ,083
18,75	1,000 ,042*	,000 ,020*	,000 ,021*
12,5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
7,5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
6,25	4,000 ,248	5,000 ,386	,000 ,021*
5	4,000 ,248	,000 ,021*	2,000 ,083
3,75	4,000 ,248	,000 ,021*	,000 ,021*
3	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
2,5	,000 ,020*	4,000 ,248	,000 ,021*
2	,000 ,021*	,000 ,021*	1,000 ,043*
1,25	2,000 ,083	,000 ,021*	,000 ,021*
0,5	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*
0,25	,000 ,021*	,000 ,021*	,000 ,021*

\* P<0,05 olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

MCF-7 ve SVCT hücre hatları ile yapılan sitotoksisite çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre anlamlı farkı ve doğru karşılaştırmayı sağlayan madde konsantrasyonu 37,5 mM belirlenmiştir. Bu nedenle MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatları üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmalarında 25, 37,5 ve 75 mM konsantrasyonları seçilmiş ve çalışma yürütülmüştür. MDA-MB-231 ve SK-BR-3 ile yapılan sitotoksisite çalışmalarından elde edilen veriler, MCF-7 ve SVCT ile karşılaştırmalarda kullanılmıştır (Kruskal-Wallis test, P<0,05). Her konsantrasyon ve inkübasyon süresi için ayrı olarak karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.18.).

Çizelge 4.18. Bassiatin, tamoksifen ve kombine maddeye göre MCF-7, SVCT, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatlarının tüm konsantrasyonlar açısından karşılaştırılması (Kruskal-Wallis test,  $P<0,05$ )

<b>Madde</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>Bassiatin</b>	18,077 ,000*	15,076 ,002*	16,750 ,001*
<b>Tamoksifen</b>	2,656 ,448	16,125 ,001*	11,564 ,012*
<b>Kombine</b>	9,999 ,019*	5,327 ,217	7,432 ,096

\* $P<0,05$ 'den küçük olduğundan anlamlı bir fark bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA

Çağımızın hastalığı olarak görülen kanser, çevresel ve genetik faktörlere bağlı olarak farklı odaklarda meydana gelebildiğinden çeşitlilik göstermektedir. Dünya ortalamasına bakıldığında zaman, kadınlarda en sık görülen ve ölüm oranı yüksek olan kanser türünün meme kanseri olduğu bilinmektedir [191]. Meme kanserinin erken teşhis ve etkin tedavisi için önemli birçok gelişme kaydedilmesine karşın meme kanseri kaynaklı ölüm oranları son 30 yıl içerisinde artış göstermiştir [192].

Meme kanserinin etkin bir şekilde tedavisinin yapılabilmesi için, cerrahi müdahaleye bakılmaksızın hormonoterapi ya da kemoterapi kapsamında kullanılan ilaçların tek tek veya kombine halde hastaya verilmesinde bile, hastalık süreci ölümle sonuçlanabilmektedir [193]. Son yıllarda birçok hastalıkta olduğu gibi meme kanserinin tedavisinde de pek çok ilaç, aktif halde kullanılmaktadır. Bu ilaçlar arasında doksorubisin, dosetaksol, anastrozol ve tamoksifen gibi ilaçlar sayılabilmektedir [194]. Gerek bu ilaçlar, gerekse yeni keşfedilen spesifik sitotoksik ajanlar ile meme kanserinin tedavi yöntemi değişerek gelişmekte ve böylelikle meme kanseri üzerinde daha olumlu sonuçlar elde edilmektedir. Günümüz koşullarında meme kanserinin tedavisinde kullanılan protokoller ile genellikle başarılı sonuçlar elde edilirken, bazen tedavide kullanılan ilaçlar normal doku ve organlar üzerinde yan etkiler oluşturmakta ve metabolik aksaklıklara neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, yoğun ilaç kullanımı sonrası ilaca karşı direnç gelişimi de görüldüğünden tedavi başarısız olabilmektedir. Günümüzde kullanılan ilaçların elde edilme sürecinin maliyeti ve piyasa ederlerinin hayli yüksek olması da alternatif anti tümör ajanların keşfedilmesine yol açmıştır. Funguslar da antimikrobiyal ve anti-tümör etkiler gösteren geniş yelpazede doğal ürünler ürettiğinden dolayı endüstriyel olarak birçok fungal ürünün üretimi sağlanmaktadır [195]. Bu tez çalışması kapsamında yeni keşfedilen fungal bir ürün olan bassiatinin meme kanseri üzerinde olası anti tümör aktivitesi değerlendirilmiştir.

Meme kanseri hücreleri üzerinde etkisinin araştırıldığı bassiatinin elde edilmesi sürecinde, entomopatojen funguslardan *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* ve *Fusarium oxysporum* kullanılmıştır. Bassiatinin üretim aşamasından elde edilen veriler doğrultusunda çalışma sürdürülerek bassiatinin saf eldesi sağlanmıştır. Bassiatinin elde edilmesinde ilk aşama olan, kültürasyon ve ekstraksiyon kısımlarında *Paecilomyces fumosoroseus* türünün, bassiatin eldesi için uygun olmadığı görülmüştür. Her ne kadar beauverisin gibi diğer fungus türleri ile benzer ürünler ürettiği bilirse de bassiatin üretimi için uygun bir ajan olmadığı



tespit edilmiştir. *F. oxysporum* türünün bassiatin üretimi de çok az miktarlarda olduğundan, ilerleyen zamanlarda maddenin olası yaygın kullanımı için üretim sırasında sorun teşkil edeceği düşünülmüştür. Zaten NMR spektroskopisi sonuçları incelendiği zaman da elde edilen bassiatinin karışık bir durumda olduğu ve ayırma işleminin daha zorlu bir şekilde yapılacağı görülmüştür (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bassiatin üretimi sırasında *F. oxysporum* türü kullanılarak çalışmadaki 1. Besiyeri ile üretimi sağlanmıştı [3]. Bassiatin üretimi ve saf elde edilmesi sırasında ise *B. bassiana* ile 1. Besiyeri kullanılarak en çok verim elde edilmiştir. Bu durum Şekil 4.2. - 4.4.'deki H NMR ve Şekil 4.5. - 4.6.'daki C NMR sonuçları ile de görülmektedir. Kagamizono ve arkadaşları [174]; *B. bassiana* üretimi için bu çalışmada da kullanılan 2. Besiyerini tercih etmiştir. Ancak bu çalışma ile *B. Bassiana*, ilk defa 1. Besiyerinde üretilmiş ve yüksek verimde bassiatin elde edilmiştir. Elde edilen bu sonucun, ilerde olası seri bassiatin üretiminde izlenecek üretim ve saf madde eldesi çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bassiatinin ayırım ve saflaştırma basamakları değerlendirildiğinde; bassiatinin elde edilme süreci diğer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur [3,174]. Ancak birkaç farklı deney ile bassiatinin daha hızlı ve kolay elde edilebileceği bulunmuştur. TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) seri çalışması ile bazı solventler farklı oranlarda karıştırılarak etkin ayırım için denenmiş ve en etkili solvent bulunmuştur.  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (65:35) solventi ile silika jel kullanılarak kolon kromatografisinde bassiatinin daha saf bir şekilde ayrılması da HPLC ile bassiatinin daha kolay ve etkin bir şekilde elde edilmesini sağlamıştır (Şekil 3.10.). Nitekim Şekil 4.9.'da da görüldüğü gibi, en yüksek pik aralığına sahip bassiatinin dışında, sadece birkaç farklı düşük düzeyde pik tespit edilmiştir. Bu durum, HPLC sürecine kadar uygulanan aşamaların doğru olduğunu ispatlamaktadır.

Meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve normal meme epitel hücre hattı SVCT üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmalarından elde edilen mikroskopik görüntüler; bassiatin ve tamoksifenin hem tek başlarına hem de kombine halde (bassiatin + tamoksifen) yüksek konsantrasyonlarda MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Maddeler en yüksek konsantrasyon olarak 75 mM'dan başlanarak 0,25 mM'a kadar denenmiş ve her üçünün (bassiatin, tamoksifen, kombine) değerlendirilmesinde de kontrole kıyasla belli bir yoğunluğa kadar MCF-7 üzerinde toksik olduğu görülmüştür (Şekil 4.10.-4.16.). Bu durum halihazırda meme kanseri tedavisinde kullanılan östrojen reseptörünün inhibitörü olan tamoksifen için normal bir durumdur. Bu çalışmada, ilk defa tamoksifen ile bassiatin karşılaştırması yapılmıştır. Buna göre; her iki maddenin ayrı ayrı kullanımında

yakın oranlarda sitotoksik etki yaptığı görülmüştür. Ancak kombine maddenin MCF-7 hücre hattında daha yüksek oranda toksik etki yaptığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14.). Bu durum günümüz kanser tedavi yöntemleri ile de uyumludur. Çünkü günümüzde kanser tedavilerinde bazı ilaçların kombine edilerek verildiği hastalarda, ilaçların tek tek verildiği hastalara nazaran tedavi süreci daha kısadır ve daha çabuk olumlu sonuçlar alınmaktadır [99]. Pegram ve arkadaşlarının [196] yaptığı çalışmada, HER-2'yi aşırı ifade eden meme kanseri hücrelerinde, trastuzumab ile karboplatin, 4-hidroksisiklofosfamid, dosetaksol veya vinorelbin'in klinik olarak anlamlı konsantrasyonlarda tutarlı sinerjik etkileşimler gösterdiği ve bunların insan klinik deneylerinde test edilebilecek rasyonel kombinasyonlar olduğu gösterilmiştir.

SVCT hücre hattı üzerinde maddelerin sitotoksik etki durumu mikroskopik görüntülerle incelendiği zaman, en az toksik etkiyi bassiatinin yaptığı görülmüştür (Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.). Bassiatinin neredeyse tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre toksik etki göstermediği gözlenmiştir (Şekil 4.23.). Tamoksifenin, düşük konsantrasyonlarda dahi SVCT hücre hattında bassiatin ve kombine maddeye göre daha çok toksik etki yaptığı görülmüştür (Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.). Günümüzde meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifenin, normal meme epitel hücrelerindeki toksik etkisinin bulunması, tedavide hedef odaklı bir madde olarak görülemeyeceğini ve her ne kadar meme kanseri tedavisinde kullanılmaktaysa da, hastalarda birçok tahribata neden olabileceği değerlendirilebilmektedir. Bassiatinin MCF-7 üzerindeki yüksek toksisitesi ve normal meme epitel dokusunda çok az toksik etkiye sebep olması bassiatinin, olası yeni kanser ajanı olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Meng ve arkadaşlarının [3] yaptığı çalışmada, MCF-7 hücre hattı üzerinde bassiatin etkili bulunmuştur ancak bu araştırmacılar karşılaştırmalı olarak tamoksifen ile deney yapmamışlardır. Yaptığımız bu çalışmada, bassiatinin tamoksifene göre daha uygun bir ajan olabileceği ilk defa tespit edilmiştir. Ayrıca her iki maddenin kombine olarak kullanımının da uygunluğu ilk kez bu çalışmada sunulmuştur.

Sitotoksosite çalışmalarında MTT tayini kapsamında elde edilen veriler değerlendirilerek, hem bar hem de box-plot grafikleri ile karşılaştırmalar yapılmıştır. MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde her üç maddenin farklı konsantrasyonlarının saatlere göre inhibisyonu karşılaştırıldığı zaman; MCF-7 hücre hattı üzerinde 24 saat inkübasyon sonrası bassiatinin daha çok, 48 saat sonrası ise tamoksifenin daha çok etkili olduğu Şekil 4.24. ve Şekil 4.25.'deki bar grafikleri ile gösterilmektedir. Kombine maddenin ise her iki zaman diliminde de (24 ve 48 h) etkin olduğu görülmüştür. 72 saat inkübasyon sonucunda ise her üç madde

için de sitotoksik etkinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.26.). Bu durum inkübasyon süresi uzadıkça maddelerin etkinliğinin azaldığını düşündürmektedir. SVCT hücre hattı için bassiatinin toksik etkisi, az da olsa 24 saat inkübasyonda tespit edilmiştir (Şekil 4.27.). Tamoksifen ve kombine maddenin ise 48 saatlik inkübasyonda daha etkin bir şekilde toksik etki yaptığı görülmüştür (Şekil 4.28. ve Şekil 4.29). Nitekim istatistiksel çalışmalardan elde edilen veriler değerlendirildiğinde; MCF-7 hücre hattı üzerinde bassiatin ve tamoksifenin bazı dozlarının inkübasyon süreleri arasında önemli bir fark görülmezken ( $P>0,05$ ), bu maddelerin birçok dozunda ve kombine maddenin tüm dozlarında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $P<0,05$ )(Çizelge 4.3.). SVCT hücre hattında ise; bassiatinin etkinliği az olduğundan istatistiksel olarak karşılaştırılan bassiatinin tüm dozlarının inkübasyon sürelerinde anlamlı bir fark görülmemiştir ( $P>0,05$ ). Ancak tamoksifenin ve kombine maddenin bazı dozlarında fark anlamlı çıkmıştır ( $P<0,05$ )(Çizelge 4.4.).

MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde maddelerin konsantrasyonları box-plot grafikleri ile karşılaştırıldığında; MCF-7 hücre hattı üzerinde kontrole kıyasla tüm maddelerin etkin olduğu ve belirli dozlarda hücre proliferasyonunu engelleyebileceği görülmüştür. MCF-7 hücre hattı üzerinde neredeyse tüm dozlarda en etkili olan maddenin ise kombine madde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.30.-4.32.). SVCT hücre hattında ise, bassiatinin 24 saatlik inkübasyonda az da olsa gösterdiği inhibisyon dışında toksik etkisinin olmadığı, tamoksifenin ise özellikle 48 saatlik inkübasyon sonrası ciddi toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.33-4.36.). İstatistiksel sonuçlar değerlendirildiğinde; MCF-7 hücre hattı üzerinde her üç inkübasyon süresinde de maddeler arasında düşük dozlarda anlamlı bir fark olmamasına karşın ( $P>0,05$ ), yüksek dozlardaki maddelerin toksik etkileri arasında fark görülmektedir ( $P<0,05$ ) (Çizelge 4.5.). SVCT üzerinde ise 24 saatlik inkübasyonundaki bazı düşük dozlar dışında maddeler arasındaki fark önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ) (Çizelge 4.6.). Bu durumun tamoksifenin yüksek toksisitesinden kaynaklandığı, Şekil 4.34.'den de görülebilmektedir.

Bassiatin, tamoksifen ve kombine maddenin 15 farklı konsantrasyonunun MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerindeki etkinliği bar grafikleri ile değerlendirildiğinde; MCF-7 üzerinde kombine maddenin tüm konsantrasyonlarının her üç inkübasyon süresinde de etkili olabileceği, bassiatin ve tamoksifenin ise belirli dozlarda etkin inhibisyon etkisine sahip olabileceği görülmektedir (Şekil 4.36.-4.38.). SVCT üzerinde ise, bassiatinin yüksek dozlarda dahi toksik etkiye neden olmadığı görülmüşken tamoksifenin birçok konsantrasyonunun etkili bir şekilde inhibisyona neden olduğu saptanmıştır (Şekil 4.39.-

4.41.). Her maddenin kendi içinde, konsantrasyonlar arası farklılıkları Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildiğinde; MCF-7 üzerinde denenen maddelerin konsantrasyonları arasında tüm inkübasyon sürelerinde anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ( $P<0,05$ ) (Çizelge 4.7.). SVCT üzerinde denenen maddeler incelendiğinde; tamoksifen ve kombine maddenin konsantrasyonları arasında önemli fark tespit edilirken ( $P<0,05$ ), bassiatinin konsantrasyonları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $P>0,05$ ) (Çizelge 4.8.). Bassiatinin SVCT üzerinde yüksek dozlarda bile toksik etkisi olmadığı saptandığından, elde edilen istatistiksel sonuç, diğer verilerimiz ile uyumludur.

Sitotoksisite çalışmalarında maddelerin konsantrasyonları arasında anlamlı farklar tespit edildiğinden dolayı, her maddenin konsantrasyonları ile kontrol grubu karşılaştırmaları istatistiksel olarak yapılmıştır. Buna göre; MCF-7 hücre hattında bassiatinin her üç inkübasyon süresinde de birçok dozun kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlı çıkmıştır ( $P<0,05$ ). Ancak 48 saatlik inkübasyonda özellikle düşük dozlarda anlamlı fark görülmemesi, bassiatinin etkinliğini erken sürelerde göstermesi ile açıklanabilir (Çizelge 4.9.). Tamoksifenin 24 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, konsantrasyonların birçoğunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark tespit edilmemesine rağmen ( $P>0,05$ ), neredeyse tüm dozlarda 48 saatlik inkübasyonda fark anlamlı çıkmıştır ( $P<0,05$ ) (Çizelge 4.10.). Diğer verilerde de tamoksifenin 48 saatte etkin bir şekilde toksik etki yaptığı görüldüğünden, kontrol grubuna kıyasla fark görülmesi beklenen bir durumdur. Çizelgelerden yola çıkarak; MCF-7 hücre hattı üzerinde bassiatin ve tamoksifenin 3 mM'a kadar etkin olabileceği görülmüştür. Kombine maddenin ise, birkaç düşük doz dışında, üç inkübasyon süresinde de konsantrasyonların anlamlı farklar gösterdiği saptanmıştır ( $P<0,05$ ) (Çizelge 4.11.). Tamoksifen ve bassiatinin aksine, kombine maddenin düşük dozlarda dahi MCF-7 hücre hattında etkili olduğu bulunmuştur. SVCT hücre hattı üzerinde yapılan karşılaştırmalarda ise; bassiatinin bazı dozlar dışında tüm inkübasyon sürelerinde kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $P>0,05$ ) (Çizelge 4.12.). Tamoksifen ve kombine maddede ise, kontrole kıyasla neredeyse tüm konsantrasyonlarda anlamlı fark tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ) (Çizelge 4.13. ve Çizelge 4.14.). Tamoksifende beklendiği gibi kontrole kıyasla fark olmasının yanı sıra, kombine maddede böyle bir fark olmasının nedeni; kombine madde içerisindeki tamoksifen toksik etki oluştururken bassiatinin bu etkiyi azalttığı şeklinde açıklanabilir. Nitekim Şekil 4.39. ve Şekil 4.40'da da görüldüğü gibi, kombine maddenin tüm konsantrasyonlarının SVCT üzerindeki etkisi, bassiatin ile tamoksifenin etkilerinin arasında bulunduğundan, bu çıkarımın doğru olduğu düşünülebilir.

MVF-7 ve SVCT hücre hatları arasında maddelerin konsantrasyonları açısından karşılaştırmaları bar grafikleri ile gösterilmiştir. Bassiatinin SVCT hücre hattına göre, MCF-7 üzerinde toksik etkisinin her üç inkübasyon süresinde de fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.42.-4.44.). Tamoksifenin her iki hücre hattında da doz miktarı arttıkça toksik etkisinin arttığı saptanmıştır. Ancak SCVT hücre hattında MCF-7'ye göre daha fazla toksik etki yaptığı tespit edilmiştir (Şekil 4.45.-4.47.). Kombine maddenin iki hücre hattında da toksik olduğu görülmüşse de, etkinliğinin MCF-7 hücre hattında SVCT'ye göre çok daha fazla olduğu bulunmuştur (Şekil 4.48.-4.50.). Mann-Whitney U testi ile MCF-7 ve SVCT hücre hatları, maddelerin konsantrasyonlarına göre karşılaştırıldığında; bassiatinin tüm inkübasyon sürelerinde yüksek dozlarda anlamlı bir fark gösterdiği bulunurken ( $P < 0,05$ ), düşük dozlarda her iki hücre hattında da etkinliği azaldığından anlamlı bir fark görülmemiştir ( $P > 0,05$ ) (Çizelge 4.15.). Tamoksifenin bazı dozlarında anlamlı fark bulunsa da ( $P < 0,05$ ) özellikle 48 saatlik inkübasyon süresince yüksek dozlarda anlamlı bir fark görülmemesi ( $P > 0,05$ ), her iki hücre hattında da toksik etkisinin olduğunu belirtmektedir (Çizelge 4.16.). Kombine maddenin ise, tüm inkübasyon sürelerinde birçok dozunda anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ( $P < 0,05$ ) (Çizelge 4.15.). Bu fark, kombine maddenin birçok konsantrasyonunun SVCT hücre hattına nazaran MCF-7 üzerindeki toksik etkisinden kaynaklanmaktadır.

MVF-7 ve SVCT hücre hatları kullanılan maddelere göre box-plot grafikleri ile karşılaştırıldığı zaman; 24 saatlik inkübasyonda kombine maddenin MCF-7 üzerindeki etkinliği rahatlıkla görülebilmektedir (Şekil 4.54.). Tamoksifenin, MCF-7'ye göre SVCT hücrelerine daha çok toksik etki yaptığı, her üç inkübasyon süresinde de görülmektedir. 72 saatlik inkübasyonda ise, MCF-7 hücrelerine göre SVCT hücrelerinde toksik etki her üç madde için de geçerlidir. Ancak bu durum bassiatinde minimum iken tamoksifende yüksek düzeydedir (Şekil 4.56.).

MCF-7 ve SVCT hücre hatları ile yapılan sitotoksisite çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre; maddeler ve hücre hatları arasındaki anlamlı sonuçları bize en doğru bir şekilde veren konsantrasyonunun 37,5 mM olduğu görülmektedir. Bu nedenle devam eden çalışmalarda daha hızlı ve doğru sonuçlar elde edebilmek için 25, 37,5 ve 75 mM'lık madde konsantrasyonları ile deneyler sürdürülmüştür.

Bassiatinin farklı şekilde gelişen meme kanseri vakaları üzerine etkisi ve toksisitesinin daha iyi anlaşılması için farklı reseptör özellikleri taşıyan hücre hatları ile belirlenen dozlar kullanılarak sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, bassiatinin hücre

hatları üzerine etkisi değerlendirildiğinde, her üç inkübasyon süresinde de en çok toksik etkiyi MCF-7 üzerinde gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.54.-4.56.). Ancak her hücre hattı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman diğer meme kanseri hücre hatlarında da proliferasyonu engellediği görülmektedir. Meng ve arkadaşları [187] yaptıkları çalışmada; bassiatinin yeni bir antiöstrojenik madde olduğunu ve östrojen reseptörünün aktivasyonunu durdurduğunu belirtmişlerdir. Ancak yaptığımız bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, bassiatinin ER- olan hücre hatlarında da toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumda bassiatinin farklı reseptörleri de bloke edebileceği veya farklı mekanizmalarla kanser hücre hatlarının çoğalmasını durdurabileceği düşünülmektedir. Ancak, Üçlü-negatif (ER- ,PR-, EGFR-) MDA-MB-231 hücre hattında yeterince inhibisyonun görülmemesi ve üçlü-pozitif (ER+ ,PR+, EGFR+) MCF-7 hücre hattında en çok inhibisyonun görülmesi, bassiatinin reseptör temelli inhibisyon yaptığının göstergesidir. İstatistiksel çalışmalarda yapılan değerlendirmelerde de bassiatinin farklı hücre hatları arasındaki toksik etkisi, tüm inkübasyon sürelerinde de anlamlı bulunmuştur ( $P<0,05$ ) (Çizelge 4.18.).

Tamoksifenin farklı hücre hatları üzerine etkileri karşılaştırıldığında, kanser hücre hatlarına kıyasla en çok SVCT hücre hattında toksik etki yaptığı görülmüştür (Şekil 4.57.-4.59.). Bunun yanı sıra özellikle 48 saatlik inkübasyonda hem MDA-MB-231 hem de SK-BR-3 hücre hatlarında, MCF-7 hücre hattında gösterdiği toksik etkiyi göstermiştir (Şekil 4.58.). Bu durum, hormonoterapide östrojen reseptörünün aktivitesini durdurucu ajan olarak kullanılan tamoksifenin ER dışında farklı odakları da etkileyebileceğini göstermektedir. İstatistiksel olarak yapılan karşılaştırmalarda 48 ve 72 saatlik inkübasyonda hücreler arası anlamlı fark bulunması ( $P<0,05$ ), Tamoksifenin SVCT hücre hattındaki yüksek toksisitesinden kaynaklanmaktadır (Çizelge 4.18.).

Kombine maddenin belirlenen dozlarının hücreler üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında, 24 saatlik inkübasyonda tüm kanser hücre hatlarında SVCT'ye kıyasla yüksek toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.60.). 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda da kombine maddenin meme kanseri hücre hatlarındaki toksik etkisi sürerken, içerisindeki tamoksifenden dolayı SVCT üzerinde de inhibisyona neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.61. ve Şekil 4.62.). Nitekim istatistiksel karşılaştırmada da 24 saatlik inkübasyonda hücreler arasında anlamlı bir farklılık bulunurken ( $P<0,05$ ), 24 saatin ardından SVCT üzerinde de toksisitesini arttırdığı için hücreler arasındaki anlamlı fark ortadan kalkmıştır (Çizelge 4.18.).

Gerek MCF-7 ve SVCT hücre hatları arasında gerekse reseptör özellikleri açısından farklılık gösteren diğer meme kanseri hücre hatları arasında yapılan sitotoksosite çalışmaları değerlendirildiğinde; bassiatinin meme kanseri hücre hatları üzerinde tamoksifen kadar toksik etki gösterebileceği bulunmuştur. Tamoksifen ve bassiatinin 1:1 oranında kombine edilerek kullanıldığı çalışmalarda meme kanseri hücre hatlarında görülen yüksek sitotoksosite, günümüzde kanser tedavilerinde uygulanan kombine ilaç kullanımını prosedürleri ile uygun sonuçlar vermektedir. Ayrıca, normal meme epitel hücre hattındaki düşük sitotoksitesinden dolayı bassiatinin meme kanserinde bir ajan olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Östrojen reseptörü taşımayan SK-BR-3 meme kanseri hücre hattında da hem bassiatinin hem de içerisinde bulunduğu kombine maddenin toksik etki yaptığı görülmüştür. Bu durum, bassiatini östrojen reseptörü dışında farklı odakları da hedef alan bir ajan olarak değerlendirebileceğimizi göstermektedir. Üçlü-negatif MDA-MB-231 hücre hattında ise, diğer hücre hatlarına kıyasla düşük toksik etki görülmesi, bassiatinin reseptör bloke edici özelliğinin olduğunu ortaya koymaktadır.

Hücre siklusu analizlerinin değerlendirilmesinde akım sitometri cihazı kullanılarak elde edilen veriler, bar grafikleri ve histogramlarla gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerinde; 24 saatlik tamoksifen, bassiatin ve kombine madde inkübasyonu sonucunda kontrole kıyaslandığında G0/G1 fazında en çok bassiatin olmak üzere kullanılan maddeler azaltıma neden olurken, S fazında kombine madde dışında artıma neden olmuştur (Şekil 4.63.). G2/M fazında ise yine tüm ajanların G0/G1 fazında olduğu gibi azaltıma neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.67.-4.70.). 48 saatlik inkübasyon sonucunda kontrole göre kıyaslandığında, G0/G1 fazında tamoksifenin azaltıma neden olduğu bulunmuşken, S fazında tüm maddelerin azaltıma katkı sağladığı bulunmuştur (Şekil 4.64.). Buna karşılık, MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik tamoksifen, bassiatin ve kombine madde inkübasyonu sonucunda kontrole göre G2/M fazında artıma yol açtığı hücrelerin hücre siklusunda ilerlemesini sağladığı görülmektedir (Şekil 4.71.-4.74.). SVCT hücrelerinde ise; tamoksifen, bassiatin ve kombine madde ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda hücreler kontrol hücreleri ile kıyaslandığında, G0/G1 fazında tamoksifen azaltıma neden olurken, ayrı ayrı tamoksifen ve bassiatin hücreleri S fazına ilerletiyor ve S fazında artıma sebep oluyor (Şekil 4.65. ve Şekil 4.66.). G2/M fazında da kombine maddenin artıma neden olduğu bulunmuştur (Şekil 4.75.-4.82.).

MCF-7 ve SVCT hücrelerinde hem 24 hem de 48 saatlik tamoksifen, bassiatin ve kombine madde inkübasyonunun, hücrelerin hücre siklusu özellikleri üzerinde az da olsa etkileri olduğu bulunmuştur. MCF-7 hücre hattında G0/G1 fazında 24 saatlik inkübasyonda

bassiatinin, 48 saatlik inkübasyonda ise tamoksifenin azaltıma neden olduğunun bulunması, sitotoksiste çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Buna karşın; tamoksifen, bassiatin ve kombine inkübasyonun her iki hücre dizisinde de S fazında artıma yola açan ve böylece proliferasyon gösteren hücrelerin, hücre siklusunda ilerlemesinde etkili olduğunu görülmüştür. Meng ve arkadaşlarının [3] yaptığı çalışmada, bassiatinin zamana bağlı bir şekilde östrojen varlığında G0/G1 fazında MCF-7 hücre döngüsü tutuklanmasını indüklediği bulunmuştur. Bununla birlikte, östrojen yokluğunda bu etkinin çok az olduğu belirtilmiştir. Östrojenin kullanılmadığı hücre döngüsü analizlerimizde bassiatin kullanılarak elde ettiğimiz sonuçlar, bu çalışma ile uyumludur. Ayrıca, bassiatinin MCF-7 hücre döngüsü üzerindeki etkisinin, günümüzde meme ca terapisinde aktif olarak kullanılan tamoksifen ile benzer sonuçlara sahip olması, bassiatinin olası meme kanseri ajanı olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Kullanılan ajanların MCF-7 ve SVCT hücrelerinin hücre siklusunda yeterli inhibisyona sebep olmadığı görülmektedir. Her iki hücre dizisinde de tamoksifen, bassiatin ve kombine maddenin, inkübasyon sonucunda hücrelerde apoptozu yeteri kadar indüklediği gözlemlenmiştir. Bu durum yine östrojen yokluğu ile maddelerin yeterli apoptotik etki gösterememesi ile açıklanabilmektedir. Ayrıca, akım sitometri cihazının kullanıldığı bu yöntemde geç apoptozis değerlendirildiğinden, DNA fragmentasyonu 48 saatte tam olarak tespit edilememiş de olabilir. 72 saatlik inkübasyonlarda da geç apoptotik etki görülebilmektedir.

Çalışmada kullanılan bassiatin, tamoksifen ve kombine maddenin MCF-7 ve SVCT hücre hatları üzerinde reseptör bağlayıcılığı (ER, EGFR ve VEGFR) çalışmaları, ticari Eliza kitleri ile yapılmış ve elde edilen sonuçlar bar grafikleri ile değerlendirilmiştir. Östrojen reseptörü tespit çalışmalarından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; MCF-7 hücre hattında kontrol grubuna göre her üç maddenin de östrojen reseptörü ile etkileşerek hücre inhibisyonuna katkı sağladığı görülmüştür. Özellikle kombine maddenin uygulandığı hücrelerde serbest östrojen reseptör miktarının az ölçülmüş olması, bu şekildeki uygulamanın reseptör bağımlı inhibisyona katkı yaptığını göstermektedir (Şekil 4.83.). Meme kanseri gelişiminde başta östrojen olmak üzere hormonların etkin olduğu, MCF-7 gibi meme kanseri hücre hatları üzerinde östrojen reseptörünün tespiti ve etkilerinin bulunması ile açığa çıkarılmıştır [197,198]. Östrojen reseptörünü bloke edici ajanların meme kanseri tedavisinde çözüm olacağı düşünülmüştür. Tamoksifenin etki mekanizmasının östrojen reseptörüne bağlanarak, östrojenin hücreleri indüklemesini engellemek ve hücre



proliferasyonunun inhibisyonunu sağlamak olduğu bugüne kadar yapılan çalışmalarla bilinmekteydi [45,199]. Bassiatinin de MCF-7 hücre hattında östrojen reseptörüne bağlanarak etki ettiği bulunmuştı [3]. Fakat iki maddenin karşılaştırması ve kombine bir şekilde daha etkili olduğunun tespiti ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. SVCT hücre hattı çalışmasında ise, tüm madde inkübasyonlarının kontrol ile benzer sonuçlar verdiği görülürken tamoksifenin, inkübasyon sonucunda az da olsa östrojen reseptörü bağlayıcılığı yaptığı görülmüştür (Şekil 4.83.).

EGFR tespiti için yapılan çalışmalar, ER $\alpha$  çalışmaları ile benzer sonuçlar vermiştir. Bu durum, kombine maddenin östrojen reseptörünün yanı sıra, epitelyal büyüme faktörünün indüklediği reseptörlerini de inhibe ederek kanserli hücrenin çoğalmasını ve büyümesini durdurabileceğini göstermektedir (Şekil 4.84.). Epitelyal büyüme faktörünün de östrojende olduğu gibi, kanserli hücrelerin büyüüp çoğalmasını ve kanserin hızla, ileri safhaya geçmesini indüklediği bilinmektedir [189,200]. Her iki reseptörde de bassiatinin inhibisyonunun gösterilmesi, bassiatinin olası meme kanseri ajanı olarak düşünülmesini kuvvetlendirmektedir.

VEGFR tespit çalışmalarında kontrol dahil olmak üzere tüm karşılaştırmalarda reseptör miktarı az çıkmıştır. Bu durum her iki hücre hattında normalde de az miktarlarda bu reseptörün bulunması ile açıklanabilir. Yine de yapılan karşılaştırmalarda diğer reseptör çalışmalarına benzer sonuçlar elde edilerek, kombine maddenin vasküler endotelyal büyüme faktörünün indüklediği reseptörler üzerinde az da olsa inhibisyona neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.85.). Bu durum, tümör oluşumunda damarlanma gibi önemli bir aşamanın inhibisyonuna katkı yaptığını göstermektedir. Garvin ve arkadaşları [190], *in vivo* ortamda MCF-7 tümörlerinde tamoksifenin, östrojenle beraber serbest VEGFR miktarını da yüksek oranda azalttığını saptamışlardır. Bunun yanı sıra, sadece tamoksifen uygulaması ile az miktarda da olsa VEGFR miktarını azalttığının bulunması, sonuçlarımız ile uyumludur. Nitekim hücre döngüsü analizlerinde de, östrojen varlığında hücre inhibisyonunun daha fazla olabileceği yorumuna yer verilmiştir. Kadınlarda hormonal dengeye göre farklı düzeylerde salınan ve vücutta belirli yerlere iletilen östrojenin varlığı, *in vitro* çalışmalara göre *in vivo* ortamda gerek bassiatin ve tamoksifenin gerekse kombine maddenin etkisinin daha fazla olabileceğini, elde edilen sonuçlar düşündürmektedir.

Elde edilen veriler doğrultusunda aşağıdaki sonuçlara varabiliriz;

- Çalışmadan elde edilen bassiatinin meme kanseri hücre hattı üzerinde tamoksifene kıyasla daha etkili olduğu, bu durumu reseptör inhibisyonunu sağlayarak yaptığı ve tamoksifen ile bassiatinin kombine olarak kullanımının olası meme kanseri tedavisine uygun olabileceği, bu çalışma ile gösterilmiştir.
- Yapılan bu çalışmada normal meme epitel hücreleri üzerindeki maddelerin etkinliğinin de incelenmesi, ilerde hastalar üzerinde uygulanacak bir maddenin ne gibi zararlar oluşturabileceğini anlamamız için önem teşkil etmekteydi. Normal meme epiteli hücre hattı olan SVCT üzerinde bassiatinin tamoksifene göre etkinliğinin az olması, meme kanseri tedavi ajanı olarak değerlendirilebileceğini kesin kanıtlarla ortaya koymaktadır.
- Bassiatinin meme kanseri hücre hattındaki etkisinin reseptör inhibisyonu temelinde olduğunun bulunması, tamoksifen gibi, hormonoterapi sırasında kullanılabilceğini göstermektedir.
- Her ne kadar bassiatinin meme kanseri hücre hattındaki etkinliği bir kanser ajanından istenen özellikleri taşısa da bu çalışmanın *in vitro* koşullarda gerçekleştirildiği unutulmamalıdır. Çalışmanın bir sonraki aşamaya geçilmesi ve ticari olarak kanser tedavisinde bassiatinin kullanımı için gerekli ön deneyler ve çalışmaların yapılması sağlanarak farmasötik etkisine bakılması gerekmektedir. Böylece, bu çalışmadan elde edilen olumlu sonuçlar ile farmasötik ve *in vivo* madde etkinlik çalışmalarının sonuçları değerlendirilerek bassiatinin kanser tedavisine uygunluğunu ortaya konacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Konishi, M., Tabata, Y., Kariya, M., Suzuki, A., Mandai, M., Nanbu, K., Takakura, K., Fujii, S., In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel. *Journal of Controlled Release*, 92(3), 301-313, **2003**.
- [2] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101, 987 women without the disease, *The Lancet*, 358(9291), 1389-1399, **2001**.
- [3] Meng, L., Feng, B., Tao, H., Yang, T., Meng, Y., Zhu, W., Huang, C., A novel antioestrogen agent (3R,6R)-bassiatin inhibits cell proliferation and cell cycle progression by repressing cyclinD1 expression in 17 $\beta$ -oestradiol-treated MCF-7 cells, *Cell Biology International*, 35, 599-605, **2011**.
- [4] Van Zanden, J.J., Wortelboer, H.M., Bijlsma, S., Punt, A., Usta, M., Bladeren, P.J., Rietjens, I.M., Cnubben, N.H., Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2, *Biochemistry Pharmacology*, 69, 699-708, **2005**.
- [5] Topal, T., Öter, Ş., Korkmaz, A., Melatonin ve kanserle ilişkisi, *Genel Tıp Dergisi*, 19, 137-143, **2009**.
- [6] Öncel, M., Isı şok proteinleri ve kanser, *European Journal of Basic Medical Sciences*, 2, 16-23, **2012**.
- [7] Kutluk, T., Kars, A., Kanser konusunda genel bilgiler, **2013**, <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/kanser.pdf>
- [8] Aslan, G., Tümör immünolojisi, *Turkish Journal of Immunology*, 15, 7-13, **2010**.
- [9] Engelson, I.B., Stefansson, I.M., Beroukhim, R., Sellers, W.R., Meyerson, M., Akslen, L.A., Salveseni, H.B., HER-2/neu expression is associated with high tumor cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas, *International Journal of Oncology*, 32(2), 307-316, **2008**.
- [10] Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., *Genetik Kavramlar*, 8. baskı, (Çev: Öner, C.), Palme Yayıncılık, Ankara, **2009**.
- [11] Taylor, W.R., Stark, G.R., Regulation of the G2/M transition by p53, *Oncogene*, 20(15), 1803-1815, **2001**.
- [12] Massagué, J., G1 cell-cycle control and cancer, *Nature*, 432, 298-306, **2004**.

- [13] Arat, E., *Alchemilla l. cinsine ait bazı türlerden elde edilen ekstraktların MCF-7 kanser ve L929 fibroblast hücrelerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, **2012**.
- [14] Knudson, A.G., Two genetic hits (more or less) to cancer, *Nature Reviews Cancer*, 1(2), 157-162, **2001**.
- [15] Anonim, Kimball's Biology Pages, Oncogenes, <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/O/Oncogenes.html> (Kasım, **2016**).
- [16] Todd, R., Wong, D.T., Oncogenes, *Anticancer Research*, 19(6A), 4729-4746, 1999.
- [17] Mitchell, R.S., Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., *Robbins Basic Pathology*, 8. baskı, Saunders publishers, Philadelphia, **2007**.
- [18] Anonim, The Medical Biochemistry Page, Classification of oncogene function, <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/oncogene.html#classes> (Eylül, **2016**).
- [19] Felsher, D.W., Bishop, J.M., Reversible Tumorigenesis by MYC in Hematopoietic Lineages, *Molecular Cell*, 4(2), 199-207, **1999**.
- [20] Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., Hedge, P., Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients, *Science*, 253(5020), 665-669, **1991**.
- [21] Surget, S., Khoury, M.P., Bourdon, J.C., Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective, *Oncotargets and Therapy*, 7, 57-68, **2013**.
- [22] Goodrich, D.W., The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule, *Oncogene*, 25, 5233-5243, **2006**.
- [23] Read, A. P., Strachan, T., *Cancer Genetics*, Chapter 18, Human molecular genetics 2, Wiley, New York, **1999**.
- [24] Harms, K.L., Chen, X., The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant, *Molecular and Cellular Biology*, 25 (5), 2014-2030, **2005**.
- [25] Gilbert, S.F., *Developmental Biology*, 10. baskı, Sinauer Associates, Massachusetts, **2013**.
- [26] Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C., p53 mutations in human cancers, *Science*, 253(5015), 49-53, **1991**.
- [27] Yılmaz, E., Altunok, V., Kanser ve p53 geni, *Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1, 19-23, **2011**.

- [28] Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., Aggarwal, B.B., Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, *Pharmaceutical Research*, 25 (9), 2097-2116, **2008**.
- [29] Tolar, J., Neglia, J.P., Transplacental and other routes of cancer transmission between individuals, *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 25(6), 430-434, **2003**.
- [30] Kravchenko, J., Akushevich, I., Manton, K.G., *Cancer mortality and morbidity patterns in the U. S. population: an interdisciplinary approach*, 1. baskı, Springer, Berlin, **2009**.
- [31] Biesalski, H.K., Bueno de Mesquita, B., Chesson, A., Chytil, F., Grimble, R., Hermus, R.J., Köhrle, J., Lotan, R., Norpoth, K., Pastorino, U., Thurnham, D., European Consensus Statement on Lung Cancer: risk factors and prevention. Lung Cancer Panel, *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, 48(3), 167-176, **1998**.
- [32] Kuper, H., Boffetta, P., Adami, H.O., Tobacco use and cancer causation: association by tumour type, *Journal of Internal Medicine*, 252(3), 206-224, **2002**.
- [33] Kuper, H., Adami, H.O., Boffetta, P., Tobacco use, cancer causation and public health impact, *Journal of Internal Medicine*, 251(6), 455-466, **2002**.
- [34] Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı, Kanser önleme çalışmaları, **2014**, <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-onleme-ve-epidemiyojik-calismalar.html>
- [35] World Health Organization, Management of Substance Abuse, Alcohol, [http://www.who.int/substance\\_abuse/facts/alcohol/en/](http://www.who.int/substance_abuse/facts/alcohol/en/) (Aralık, **2016**)
- [36] Irigaray, P., Newby, J.A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., Belpomme, D., Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61(10), 640-658, **2007**.
- [37] Kushi, L.H., Byers, T., Doyle, C., Bandera, E.V., McCullough, M., McTiernan, A., Gansler, T., Andrews, K.S., Thun, M.J., American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity, *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, 56(5), 254-281, **2006**.
- [38] Kaidar-Person, O., Bar-Sela, G., Person, B., The Two Major Epidemics of the Twenty-First Century: Obesity and Cancer, *Obesity Surgery*, 21(11), 1792-1797, **2011**.
- [39] Parekh, N., Chandran, U., Bandera, E.V., Obesity in cancer survival, *Annual Review of Nutrition*, 32, 311-342, **2012**.

- [40] World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, *Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective*, AICR, Washington, DC, **2007**.
- [41] Pagano, J.S., Blaser, M., Buendia, M.A., Damania, B., Khalili, K., Raab-Traub, N., Roizman, B., Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation, *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 453-471, **2004**.
- [42] Parsonnet, J., Friedman, G.D., Orentreich, N., Vogelman, H., Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection, *Gut*, 40(3), 297-301, **1997**.
- [43] Samaras, V., Rafailidis, P.I., Mourtzoukou, E.G., Peppas, G., Falagas, M.E., Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4(5), 267-281, **2010**.
- [44] Little, J.B., Ionizing Radiation, Chapter 14, *Cancer medicine*, 6. Baskı, (eds: Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei, E.) Hamilton, Decker, Ontario: B.C., **2000**.
- [45] World Health Organization, *World Cancer Report 2014*, (eds: Stewart, B.W., Wild, C.P.), **2014**.
- [46] Roukos, D.H., Genome-wide association studies: how predictable is a person's cancer risk?, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 9(4), 389-392, **2009**.
- [47] Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., Starling, N., Colorectal cancer, *The Lancet*, 375(9719), 1030-1047, **2010**.
- [48] Henderson, B.E., Bernstein, L., Ross, R.K., Chapter 13: Hormones and the Etiology of Cancer, *Cancer Medicine*, 5. Baskı, (eds: Bast, R.C., Kufe, D.W., Pollock, R.E.), Decker, Hamilton, Ontario: B.C., **2000**.
- [49] McGuire, A., Brown, J.A., Malone, C., McLaughlin, R., Kerin, M.J., Effects of age on the detection and management of breast cancer, *Cancers*, 7(2), 908-929, **2015**.
- [50] Gölbaşı, Z., Çetin, R., Kalkan, S., Durmuş, T., Üniversite öğrencisi kızların meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi ile ilgili bilgi ve davranışları, *The Journal of Breast Health*, 6, 69-73, **2010**.
- [51] Stewart, B.W., Kleihues, P., *World Cancer Report*, IARC Press, Lyon, **2003**, <http://www.scribd.com/doc/2350813/World-Cancer-Report-2003-Stuart-e-Kleihues-WHO-e-IARC>
- [52] Lacey, J.V. Jr., Kreimer, A.R., Buys, S.S., Marcus, P.M., Chang, S.C., Leitzmann, M.F., Hoover, R.N., Prorok, P.C., Berg, C.D., Hartge, P., Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort, *BMC Cancer*, 9, 8, **2009**.

- [53] Giordano, S.H., Cohen, D.S., Buzdar, A.U., Perkins, G., Hortobagyi, G.N., Breast carcinoma in men: a population based study, *Cancer*, 101(1), 51-57, **2004**.
- [54] Breast Cancer in Men, Cancer Research UK, **2007**, <http://www.cancerhelp.org.uk/help/default.asp?page=5075>
- [55] Box, B.A., Russel, C.A., Breast Cancer, *Manual of clinical oncology*, (eds: Casciato, D.A.), Lippincott Williams&Wilkins, Philedelphia, 233-253, **2004**.
- [56] McPherson, K., Steel, C., Dixon, J.M., Breast cancer -Epidemiology, risk factors, and genetics, *British Medical Journal*, 321, 624-628, **2000**.
- [57] Campbell, J.B., Breast Cancer-Race, Ethnicity, and Survival: Aliterature Review, *Breast Cancer Research and Treatment*, 74, 187-192, **2002**.
- [58] Lowiitz, B.B., Casciato, D.A., *Klinik Onkoloji El Kitabı*, (çev: Manavoğlu, O.), Palme Yayıncılık, Ankara, **2004**.
- [59] Korkmaz, Ş., MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Soylarında Zeytin Yaprağı Ekstresinin Anti-Kanser İlaçlarla Kombinasyonunun Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa, **2012**.
- [60] Kelsey, J.L., Gammon, M.D., John, E.M., Reproductive factors and breast cancer, *Epidemiologic Reviews*, 15, 36-47, **1993**.
- [61] Chie, W.C., Hsieh, C., Newcomb, P.A., Longnecker, M.P., Mittendorf, R., Greenberg, E.R., Clapp, R.W., Burke, K.P., Titus-Ernstoff, L., Trentham-Dietz, A., MacMahon, B., Age at any full-term pregnancy and breast cancer risk, *American Journal of Epidemiology*, 151, 715-722, **2000**.
- [62] Unger, M.A., Weber, B.L., Recent advances in breast cancer biology, *Current Opinion in Oncology*, 12, 521-525, **2000**.
- [63] Henderson, B.E., Ross, R.K., Judd, H.L., Krailo, M.D., Pike, M.C., Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk?, *Cancer*, 56, 1206-1208, **1985**.
- [64] Berkey, C.S., Frazier, A.L., Gardner, J.D., Colditz, G.A., Adolescence and breast carcinoma risk, *Cancer*, 85: 2400-2409, **1999**.
- [65] MacMahon, B., Trichopoulos, D., Brown, J., Andersen, A.P., Cole, P., deWaard, F., Kauraniemi, T., Polychronopoulou, A., Ravnihar, B., Stormby, N., Westlund, K., Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk, *International Journal of Cancer*, 30(4), 427-431, **1982**.
- [66] Yang, L., Jacobsen, K.H., A systematic review of the association between breastfeeding and breast cancer, *Journal of Women's Health*, 17(10), 1635-1645, **2008**.

- [67] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease, *The Lancet*, 360(9328), 187-195, **2002**.
- [68] Yager, J.D., Davidson, N.E., Estrogen carcinogenesis in breast cancer, *New England Journal of Medicine*, 354(3), 270-282, **2006**.
- [69] Anothaisintawee, T., Wiratkapun, C., Lerdsitthichai, P., Kasapesup, V., Wongwaisayawan, S., Srinakaran, J., Hirunpat, S., Woodtichartpreecha, P., Boonlikit, S., Teerawattananon, Y., Thakkinstian, A., Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis, *Asian Pacific Journal of Public Health*, 25(5), 368-387, **2013**.
- [70] Böhm, I., Breast cancer in lupus, *Breast*, 20(3), 288-290, **2011**.
- [71] Değerli, Ü., Meme Kanseri, *Genel Cerrahi*, 6. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 288-296, **1998**.
- [72] Boffetta, P., Hashibe, M., La Vecchia, C., Zatonski, W., Rehm, J., The burden of cancer attributable to alcohol drinking, *International Journal of Cancer*, 119(4), 884-887, **2006**.
- [73] Kuper, H., Ye, W., Weiderpass, E., Ekblom, A., Trichopoulos, D., Nyren, O., Adami, H.O., Alcohol and breast cancer risk: the alcoholism paradox, *British Journal of Cancer*, 83, 949-951, **2000**.
- [74] Palmer, J.R., Rosenberg, L., Cigarette smoking and the risk of breast cancer, *Epidemiologic Reviews*, 15, 145-156, **1993**.
- [75] Johnson, K.C., Miller, A.B., Collishaw, N.E., Palmer, J.R., Hammond, S.K., Salmon, A.G., Cantor, K.P., Miller, M.D., Boyd, N.F., Millar, J., Turcotte, F., Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on tobacco smoke and breast cancer risk, *Tobacco Control*, 20(1), e2, **2009**.
- [76] Ambrosone, C.B., Shields, P.G., Smoking as a risk factor for breast cancer, *Breast cancer: molecular genetics, Pathogenesis, and Therapeutics*, (eds: Bowcock, A.M.), Human Press Inc., Totowa, New Jersey, 519-536, **1999**.
- [77] John, E.M., Kelsey, J.L., Radiation and other environmental exposures and breast cancer, *Epidemiologic Reviews*, 15, 157-162, **1993**.
- [78] Weiderpass, E., Pukkala, E., Kauppinen, T., Mutanen, P., Paakkulainen, H., Vasama-Neuvonen, K., Boffetta, P., Partanen, T., Breast cancer and occupational exposures in women in Finland, *American Journal of Industrial Medicine*, 36, 48-53, **1999**.
- [79] Feig, S.A., Hendrick, R.E., Radiation risk from screening mammography of women aged 40-49 years, *Journal of The National Cancer Institute Monographs*, 22(22), 119-124, **1997**.



- [80] Dorgan, J.F., Brock, J.W., Rothman, N., Needham, L.L., Miller, R., Stephenson, H.E., Schussler, N., Taylor, P.R., Serum organochlorine pesticides and PCBs and breast cancer risk: results from a prospective analysis (USA), *Cancer Causes & Control*, 10(1), 1-11, **1999**.
- [81] Brody, J.G., Rudel, R.A., Michels, K.B., Moysich, K.B., Bernstein, L., Attfield, K.R., Gray, S., Environmental pollutants, diet, physical activity, body size, and breast cancer: where do we stand in research to identify opportunities for prevention?, *Cancer*, 109(12), 2627-2634, **2007**.
- [82] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with Breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies, *The Lancet*, 347(9017), 1713-1727, **1996**.
- [83] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer, *The Lancet*, 350(9084), 1047-1059, **1997**.
- [84] Pike, M., Bernstein, L., Spicer, D., Exogenous hormones and breast cancer risk, *Current Therapy in Oncology*, (eds: Neiderhuber, J.), Decker, St. Louis, 292-302, **1993**.
- [85] Kahlenborn, C., Modugno, F., Potter, D.M., Severs, W.B., Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis, *Mayo Clinic proceedings, Mayo Clinic*, 81(10), 1290-1302, **2006**.
- [86] Iodice, S., Barile, M., Rotmensz, N., Feroce, I., Bonanni, B., Radice, P., Bernand, L., Maisonneuve, P., Gandini, S., Oral contraceptve use and breast ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers: a meta-analysis, *European Journal of Cancer*, 46(12), 2275-2284, **2010**.
- [87] Gaffield, M.E., Culwell, K.R., Ravi, A., Oral contraceptives and family history of breast cancer, *Contraception*, 80(4), 372-380, **2009**.
- [88] Reeves, G., Beral, V., Green, J., Gathani, T., Bull, D., Hormonal therapy for the menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis, *Lancet Oncology*, 7, 910-918, **2006**.
- [89] Scmizu, Y., Kato, H., Schull, W.J., Study on mortality of A bomb survivors, *Radiation Research*, 103, 121-141, **1990**.
- [90] Kayhan, Ö., Özkan, N., Malazgirt, Z., *Genel Cerrahi*, 1. Baskı, Taş Kitapçılık, Hacettepe, Ankara, **1996**.

- [91] Aceves, C., Anguiano, B., Delgado, G., Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland?, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(2), 189-196, **2005**.
- [92] Hunter, D.J., Willett, W.C., Diet, body size, and breast cancer, *Epidemiologic Reviews*, 15, 110-132, **1993**.
- [93] Anonim, Gain in Body Mass Index Increases Postmenopausal Breast Cancer Risk, National Cancer Institute, <http://benchmarks.cancer.gov/2010/04/gaininbodymassindexincreasespostmenopausalbreastcancerrisk> (Aralık, **2016**).
- [94] Kaiser, J., Cancer. Cholesterol forges link between obesity and breast cancer, *Science*, 342(6162), 1028, **2013**.
- [95] Lee, I.M., Shiroma, E.J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S.N., Katzmarzyk, P.T., Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden disease and life expectancy, *The Lancet*, 380(9838), 219-229, **2012**.
- [96] Biswas, A., Oh, P.I., Faulkner, G.E., Bajaj, R.R., Silver, M.A., Mitchell, M.S., Alter D.A., Sedentary time and its association with risk for disease incidence, mortality, and hospitalization in adults: a systematic review and meta-analysis, *Annals of Internal Medicine*, 162(2), 123-132, **2015**.
- [97] Winzer, B.M., Whiteman, D.C., Reeves, M.M., Paratz, J.D., Physical activity and cancer prevention: a systematic review of clinical trials, *Cancer Causes & Control*, 22(6), 811-826, **2011**.
- [98] Polyak, K., Breast cancer gene discovery, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4, 1-18, **2002**.
- [99] Sayek, İ., Meme Hastalıkları, *Temel Cerrahi*, 1. Cilt. 3. Baskı, Güneş kitabevi, Ankara, 864-872, **1996**.
- [100] Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D.T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., Sobol, H., Teare, M.D., Struwing, J., Arason, A., Scherneck, S., Peto, J., Rebbeck, T.R., Tonin, P., Neuhausen, S., Barkardottir, R., Eyfjord, J., Lynch, H., Ponder, B.A., Gayther, S.A., Zelada-Hedman, M., Genetic heterogeneity and Penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families, The Breast Cancer Linkage Consortium, *The American Journal of Human Genetics*, 62, 676-689, **1998**.
- [101] Dunning, A.M., Healey, C.S., Pharoah, P.D., Teare, M.D., Ponder, B.A., Easton, D.F., *A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk*, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 8(10), 843-854, **1999**.
- [102] Easton, D., Ford, D., Peto, J., Inherited susceptibility to breast cancer, *Cancer Survivors*, 83, 95-113, **1993**.

- [103] Gage, M., Wattendorf, D., Henry, L.R., Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes, *Journal of surgical oncology*, 105(5), 444-451, **2012**.
- [104] Kosir, M.A., Breast Disorders: Breast Cancer, *Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Merck Publishing, Rahway, New Jersey, **2003**.
- [105] Anonim, Breast cancer, symptoms, <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/symptoms> (Ocak, **2017**).
- [106] Watson, M., Assessment of suspected cancer, *InnoAiT*, 1(2), 94-107, **2008**.
- [107] Spiegel, D., Bloom, J.R., Pain in metastatic breast cancer, *Cancer*, 52(2), 341-345, **1983**.
- [108] Anonim, Paget's Disease of the Nipple: Questions and Answers, National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer> (Aralık, **2016**).
- [109] Lacroix, M., Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells, Endocrine-Related Cancer, *Bioscientifica*, 13(4), 1033-1067, **2006**.
- [110] Anonim, Metastatic Cancer: Questions and Answers, National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer> (Aralık, **2016**).
- [111] Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J., *WHO classification of tumours of the breast*, 4. baskı, IARC, Lyon, **2012**.
- [112] Wellings, S.R., Jensen, H.M., Marcum, R.G., An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions, *Journal of the National Cancer Institute*, 55, 231-273, **1975**.
- [113] Schnitt, S.J., Lakhani S.R., *Breast cancer*, World Cancer Report, (eds: Stewart, B.W., Wild, C.B.), Naturaprint, France, **2014**.
- [114] Kumar, Vinay., Abul, Abbas., *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, an imprint of Elsevier inc., Saunders, Philadelphia, **2010**.
- [115] Saini, K.S., Taylor, C., Ramirez, A.J., Palmieri, C., Gunnarsson, U., Schmoll, H.J., Dolci, S.M., Ghenne, C., Metzger-Filho, O., Skrzypski, M., Paesmans, M., Ameye, L., Piccart-Gebhart, M.J., de Azambuja, E., Role of the multidisciplinary team in breast cancer management: results from a large international survey involving 39 countries, *Annals of Oncology*, 23(4), 853-859, **2011**.
- [116] Anonim, Surgery Choices for Women with Early Stage Breast Cancer, *National Cancer Institute and the National Research Center for Women & Families*, **2004**, <http://www.stopcancerfund.org/wp/wpcontent/uploads/2009/12/booklet04bc.pdf>
- [117] Anonim, Breast Cancer: Breast Disorders: Merck Manual Professional, Merck.com, <http://www.merck.com/mmpe/sec18/ch253/ch253e.html#sec18ch253ch253e572> (Kasım, **2016**).

- [118] American College of Surgeons, Five Things Physicians and Patients Should Question", Choosing Wisely: an initiative of the ABIM Foundation, **2013**, <http://www.choosingwisely.org/wp-content/uploads/2015/02/ASTRO-Choosing-Wisely-List.pdf>
- [119] Rebbeck, T.R., Friebel, T., Lynch, H.T., Neuhausen, S.L., van 't Veer, L., Garber, J.E., Evans, G.R., Narod, S.A., Isaacs, C., Matloff, E., Daly, M.B., Olopade, O.I., Weber, B.L., Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group, *Journal of Clinical Oncology*, 22, 1055-1062, **2004**.
- [120] Anonim, Surgery Choices for Women with DCIS or Breast Cancer, *National Cancer Institute*, **2015**, <https://www.cancer.gov/types/breast/surgery-choices>
- [121] Massarut, S., Baldassare, G., Belletti, B., Reccanello, S., D'Andrea, S., Ezio, C., Perin, T., Roncadin, M., Vaidya, J.S., Intraoperative radiotherapy impairs breast cancer cell motility induced by surgical wound fluid, *Journal of Clinical Oncology*, 24(18S), 10611, **2006**.
- [122] Belletti, B., Vaidya, J.S., D'Andrea, S., Entschladen, F., Roncadin, M., Lovat, F., Berton, S., Perin, T., Candiani, E., Reccanello, S., Veronesi, A., Canzonieri, V., Trovò, M.G., Zaenker, K.S., Colombatti, A., Baldassarre, G., Massarut, S., Targeted intraoperative radiotherapy impairs the stimulation of breast cancer cell proliferation and invasion caused by surgical wounding, *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1325-1332, **2008**.
- [123] Anonim, Treatment Options, Breastcancer.org [http://www.breastcancer.org/treatment/planning/cancer\\_stage](http://www.breastcancer.org/treatment/planning/cancer_stage) (Ocak, **2017**)
- [124] Collaborative Group on Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials, Early Breast Cancer Trialists, *The Lancet*, 352, 930-942, **1998**.
- [125] Sausville, E.A., Longo, D.A., Principles of cancer treatment: surgery, chemotherapy and biological treatment, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, (eds: Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J.), McGraw-Hill Interamericana, Spain, **2009**.
- [126] Collaborative Group on Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials, Early Breast Cancer Trialists, *The Lancet*, 365, 1687-1717, **2005**.
- [127] Vaclavikova, R., Horsky, S., Simek, P., Gut, I., The paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioksidants, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 368, 200-209, **2003**.
- [128] Jahanzeb, M., Adjuvant trastuzumab therapy for HER2 positive breast cancer, *Clinical Breast Cancer*, 8(4), 324-333, **2008**.

- [129] Entrez Gene: ERBB2 v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian), **2015**.
- [130] Anonim, Herceptin (trastuzumab) Adjuvant HER2+ Breast Cancer Therapy Pivotal Studies and Efficacy Data, Herceptin.com, <http://www.herceptin.com/hcp/treatment/adjuvant/studies> (Aralık, **2016**).
- [131] Perez, E.A., Spano, J.P., Current and emerging targeted therapies for metastatic breast cancer, *Cancer*, 118, 3014-3025, **2012**.
- [132] Phan, L.D., *Characterization of FHL2 expression and function in breast cancer cell lines*, Master of Science Thesis, Simon Fraser University, Department of Science, Canada, **2012**.
- [133] Beatson, G.T., On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases, *The Lancet*, 2, 104-107, **1896**.
- [134] Ailen, E., Doisy, E.A., An ovarian hormone : Preliminary report on its localisation, extraction and partial purification and action in test animals, *The Journal of the American Medical Association*, 81, 819-821, **1923**.
- [135] Kathleen, I.P., Adjuvant endocrine therapies for pre-/perimenopausal women, *The Breast*, 14 (6), 547-554, **2005**.
- [136] Burstein, H.J., Temin, S., Anderson, H., Buchholz, T.A., Davidson, N.E., Gelmon, K.E., Giordano, S.H., Hudis, C.A., Rowden, D., Solky, A.J., Stearns, V., Winer, E.P., Griggs, J.J., Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update, *Journal of Clinical Oncology*, 32(21), 2255-2269, **2014**.
- [137] Vogel, V.G., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Cronin, W.M., Cecchini, R.S., Atkins, J.N., Bevers, T.B., Fehrenbacher, L., Pajon, E.R., Wade III, J.L., Robidoux, A., Margolese, R.G., James, J., Lippman, S.M., Runowicz, C.D., Ganz, P.A., Reis, S.E., McCaskill-Stevens, W., Ford, L.G., Jordan, W.C., Wolmark, N., Effects of Tamoxifen vs Raloxifene on the Risk of Developing Invasive Breast Cancer and Other Disease Outcomes The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial, *The Journal of the American Medical Association*, 295(23), 2727-2741, **2006**.
- [138] Bao, T., Rudek, M.A., The Clinical Pharmacology of Anastrozole, *European Oncology & Haematology*, 7(2), 106-108, **2011**.
- [139] Ma, W.D., Zou, Y.P., Wang, P., Yao, X.H., Sun, Y., Duan, M.H., Fu Y.J., Yu, B., Chimaphilin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway, *Food and Chemical Toxicology*, 70, 1-8, **2014**.

- [140] Camargo, M.S., Oliveira, M.T., Santoni, M.M., Resende, F.A., Oliveira-Höhne, A.P., Espanha, L.G., Nogueira, C.H., Cuesta-Rubio, O., Vilegas, W., varanda E.A., Effects of nemorosone, isolated from the plant *Clusia rosea*, on the cell cycle and gene expression in MCF-7 BUS breast cancer cell lines, *Phytomedicine*, 22, 153-157, **2015**.
- [141] Raghukumar, C., Raghukumar, S., Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean, *Aquatic Microbial Ecology*, 15(2), 153–163, **1998**.
- [142] Vaupotic, T., Veranic, P., Jenoe, P., Plemenitas, A., Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*, *Fungal Genetics and Biology*, 45(6), 994–1007, **2008**.
- [143] Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., *Introductory Mycology*, John Wiley and Sons, New York, **1996**.
- [144] Watanabe, T., *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi*, Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, 3. baskı, CRC Press, Boca Raton, **2010**.
- [145] Wang, D.Y.C., Kumar, S., Blair Hedges, S., Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi, *Proceedings of the Royal Society of London B*, 266, 163-171, **1999**.
- [146] Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., Blair Hedges, S., Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants, *Science*, 293, 1129-1133, **2001**.
- [147] Lücking, R., Huhndorf, S., Pfister, D.H., Plata, E.R., Lumbsch, H.T., Fungi evolved right on track, *Mycologia*, 101(6), 810-822, **2009**.
- [148] Berbee, M.L., Taylor, J.W., Dating the molecular clock in fungi e how close are we?, *Fungal Biology Reviews*, 24, 1-16, **2010**.
- [149] Hawksworth, D.L., The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation, *Mycological Research*, 95, 641-655, **1991**.
- [150] O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J.M., Vilgalys, R., Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples, *Applied Environmental Microbiology*, 71, 5544-5550, **2005**.
- [151] Blackwell, M., The fungi: 1, 2, 3, ... 5.1 million species?, *American Journal of Botany*, 98, 426-438, **2011**.
- [152] Hibbett, D.S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P., Nilsson, R.H., Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences, *Fungal Biology Reviews*, 25, 38-47, **2011**.

- [153] Ignoffo, C.M., Effects of entomopathogens on vertebrates, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 217, 141-172, **1973**.
- [154] Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J.J., Blackwell, M., Fungal Entomopathogens, Chapter 6, *Insect Pathology*, an imprint of Elsevier inc., Saunders, Philadelphia, **2012**.
- [155] Deacon, J., *Fungal Biology*, Blackwell Publishers, Cambridge, Massachusetts, **2005**.
- [156] Speare, A.T., On certain entomogenous fungi, *Mycologia*, 12, 62-76, **1920**.
- [157] Evans, H.C., Samson, R.A., Cordyceps species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems. I. The Cephalotes (Myrmicinae) complex, *Transactions of the British Mycological Society*, 79, 431-453, **1982**.
- [158] Jackson, M.A., Jaronski, S.T., Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects, *Mycological Research*, 113, 842-850, **2009**.
- [159] Read, N.D., Fleißner, A., Roca, M.G., Glass, N.L., Hyphal fusion, *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* (eds: Borkovich, K.A., Ebbole, D.J.), American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 260-273, **2010**.
- [160] Humber, R.A., Fungi: identification, *Manual of Techniques in Insect Pathology*, (eds: Lacey, L.A.), Academic Press, San Diego, 153-185, **1997**.
- [161] Kulp, K., *Handbook of Cereal Science and Technology*, CRC Press, Florida, USA, **2000**.
- [162] Anonim, Mantarların beslenmesi, fizyolojisi ve metabolizması, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF2C8B4054E89DE972> (Ocak, 2017)
- [163] Keiller, T.S., Whey-based fungal microfactory technology for enhanced biological pest management using fungi, UVM Innovations, **2008**, <https://www.uvm.edu/uvminnovations/industry/pdf/microfactory.pdf>
- [164] Goettel, M.S., Eilenberg, J., Glare, T., Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, *Comprehensive Molecular Insect Science*, , (eds: Lawrence, I.G., Kostas, I., Sarjeet, S.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, 361-406, **2005**.
- [165] Benz, G., Environment, *Epizootiology of Insect Diseases* (eds: Fuxa, J.R., Tanada, Y.), Wiley- Interscience, New York, 177-214, **1987**.
- [166] Hajek, A.E., Filotas, M.J., Ewing, D.C., Formation of appressoria by two species of lepidopteran-pathogenic Entomophthorales. *Canadian Journal of Botany*, 80, 220-225, **2002**.

- [167] Clarkson, J.M., Charnley, A.K., New insights into the mechanisms of fungal insect pathogenesis in insects, *Trends in Microbiology*, 4, 197-203, **1996**.
- [168] Shah, P.A., Pell, J.K., Entomopathogenic fungi as biological control agents, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 413-423, **2003**.
- [169] Smith, R.J., Grula, E.A., Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 37, 222-230, **1981**.
- [170] Bennett, J.W., Bentley, R., What's in a name?-Microbial secondary metabolism, *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, San Diego, 1-28, **1989**.
- [171] Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics, *Nature Reviews Microbiology*, 3, 937-947, **2005**.
- [172] Ngoka, L.C.M., Gross, M.L., Toogood, P.L., Sodium-directed selective cleavage of lactones: a method for structure determination of cyclodepsipeptides, *International Journal of Mass Spectrometry*, 182/183, 289-298, **1999**.
- [173] Hasumi, K., Shinohara, C., Iwanaga, T., Endo, A., Lateritin, A new inhibitor of ACYL-Coa: Cholesterol Acyltransferase produced by *Gibberella lateritium* IFO 7188, *The Journal of Antibiotics*, 46, 1782-1787, **1993**.
- [174] Kagamizono, T., Nishino, E., Matsumoto, K., Kawashima, A., Kishimoto, M., Sakai, N., He, B.M., Chen, Z.X., Adachi, T., Morimoto, M., Hanada, K., Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717, *The Journal of Antibiotics*, 48, 1407-12, **1995**.
- [175] Xu, Y., Orozco, R., Wijeratne, E.M., Gunatilaka, A.A., Stock, S.P., Molnar, I., Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, *Chemistry and Biology*, 15, 898-907, **2008**.
- [176] Pettit, R.K., Pettit, G.R., Xu, J-P., Weber, C.A., Richert, L.A., Isolation of Human Cancer Cell Growth Inhibitory, Antimicrobial Lateritin from a Mixed Fungal Culture, *Planta Medica*, 76, 500-501, **2010**.
- [177] Grove, J.F., Pople, M., The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex, *Mycopathologia*, 70, 103-105, **1980**.
- [178] Fornelli, F., Minervini, F., Logrieco, A., Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9), *Journal of Invertebrate Pathology*, 85, 74-79, **2004**.
- [179] Leland, J.E., McGuire, M.R., Grace, J.A., Jaronski, S.T., Ulloa, M., Park, Y., Plattner, R.D., Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* spp.)(Heteroptera: Miridae), *Biological Control*, 35, 104-114, **2005**.



- [180] Castlebury, L.A., Sutherland, J.B., Tanner, L.A., Henderson, A.L., Cerniglia, C.E., Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 119-121, **1999**.
- [181] Fukuda, K., Arai, M., Yamaguchi, Y., Masuma, R., New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity produced by *Beauveria* sp. FKI-1366, *Journal of Antibiotics*, 110-116, **2004**.
- [182] Xu, L., Wang, J., Zhao, J., Li, P., Shan, T., Wang, J., Li, X., Zhou, L., Beauvericin from the endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from *Dioscorea zingiberensis* and its antibacterial activity, *Natural Product Communications*, 5, 811-814, **2010**.
- [183] Lin, H., Lee, Y., Chen, B., Tsai, M., Lu, J., Chou, C., Jow, G., Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells, *Cancer Letters*, 230, 248-259, **2004**.
- [184] Jow, G., Chou, C., Chen, B., Tsai, J., Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: The causative role of calcium, *Cancer Letters*, 216, 165-173, **2004**.
- [185] Zhan, J., Burns, A.M., Liu, M.X., Faeth, S.H., Gunatilaka, A.A.L., Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*, *Journal of Natural Products*, 70, 227-232, **2007**.
- [186] Hughes, A.B., Sleebs, M.M., Total Synthesis of Bassiatin and Its Stereoisomers: Novel Divergent Behavior of Substrates in Mitsunobu Cyclizations, *The Journal of Organic Chemistry*, 70, 3079-3088, **2005**.
- [187] Meng, L., Tao, H., Dong, G., Yang, T., Zhang, W., Zhu, W., Huang C., ERK1/2 and Akt pathway activated during (3R,6R)-bassiatin(1)-induced apoptosis in MCF-7 cells, *Cell Biology International*, 36, 345-348, **2012**.
- [188] Deeb, D., Gao, X., Dulchavsky, S.A., Gautam, S.X., CDDO-me induces apoptosis and inhibits Akt, mTOR and NF-kappaB signaling proteins in prostate cancer cells, *Anticancer Research*, 27, 3035-3044, **2007**.
- [189] Karaca Güzel, G.P., *Meme kanser hücrelerinde ERBB reseptör dağılımı ve hücre proliferasyonunun immünohistokimyasal yöntem ile incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Kadir Has Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, **2005**.
- [190] Garvin, S., Nilsson, U.W., Dabrosin, C., Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells, *British Journal of Cancer*, 93, 1005-1010, **2005**.

- [191] Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., Global cancer statistics. CA: A, *Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90, **2011**.
- [192] Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 3983-3988, **2003**.
- [193] Muss, H.B., Case, L.D., Richards, F., White, D.R., Cooper, M.R., Cruz, J.M., Powell, B.L., Spurr, C.L., Capizzi, R.L., Interrupted versus continuous chemotherapy in patients with metastatic breast cancer, *The New England Journal Of Medicine*, 325, 1342-1348, **1991**.
- [194] Andre, F., Slimane, K., Bachelot, T., Dunant, A., Namer, M., Barrelier, A., Kabbaj, O., Spano, J.P., Marsiglia, H., Rouzier, R., Delalogue, S., Spielmann, M., Breast cancer with synchronous metastases: trends in survival during a 14-year period, *Journal Of Clinical Oncology*, 22, 3302-3308, **2004**.
- [195] Huang, B., Guo, J., Yi, B., Yu, X., Sun, L., Chen, W., Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Letters*, 30(7), 1121-1137, **2008**.
- [196] Pegram, M.D., Konecny, G.E., O'Callaghan, C., Beryt, M., Pietraz, R., Slamon, D.J., Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 96(10), 739-749, **2004**.
- [197] Brooks, S.C., Locke, E.R., Soule, H.D., Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma, *The Journal of Biological Chemistry*, 248(17), 6251-6253, **1973**.
- [198] Martin, A.M., Weber, B.L., Genetic and hormonal risk factors in breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1126-1135, **2000**.
- [199] Zhang, G-J., Kimijima, I., Onda, M., Kanno, M., Sato, H., Watanabe, T., Tsuchiya, A., Abe, R., Takenoshita, S., Tamoxifen-induced Apoptosis in Breast Cancer Cells Relates to Down-Regulation of bcl-2, but not bax and bcl-XL, without Alteration of p53 Protein Levels, *Clinical Cancer Research*, 5, 2971-2977, **1999**.
- [200] Fan, P., Wang, J., Santen, R.J., Yue, W., Long-term Treatment with Tamoxifen Facilitates Translocation of Estrogen Receptor A out of the Nucleus and Enhances its Interaction with EGFR in MCF-7 Breast Cancer Cells, *Cancer Research*, 67, 1352-1360, **2007**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Erkay Özgör

Doğum Yeri: Londra

Medeni Hali: Evli

E-posta: erkayozgor@gmail.com

Adresi: Çamlık Sok. Trio 2/8, Gönyeli, Lefkoşa, KKTC

## Eğitim

Lise: 20 Temmuz Fen Lisesi, 2002-2005

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2005-2010

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010-2012

Doktora: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010- devam ediyor

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, İyi derece

## Deneyim Alanları

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1. Fungal Kaynaklı Bassiatin'in (3R,6R) MCF-7 ve HMEC Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, Destekleyen Kuruluş: TÜBİTAK Araştırma Destek Projeleri Başkanlığı, 2016, Proje Bütçesi: 29,500 TL
2. Fungal Kaynaklı Bassiatinin Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, Proje No: 13202, Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi, 2017, Proje Bütçesi: 17.797,94 TL,

### Tezden Üretilmiş Yayınlar

### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ (UYGULAMALI BİYOLOJİ) ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 06/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: FUNGAL KAYNAKLI BASSİATİN'İN (3R,6R) MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 149 sayfalık kısmına ilişkin, 05/06/2017 tarihinde ~~şahsen~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~tablo~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygularıyla arz ederim.

Adı Soyadı: ERKAY ÖZGÖR  
Öğrenci No: N12145837  
Anabilim Dalı: BİYOLOJİ  
Programı: UYGULAMALI BİYOLOJİ  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

Tarih ve İmza

06.06.2017

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. NEVİN KESKİN