

*Apis mellifera* Arı Venom Bileşenlerinin İnsan Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki  
Antikanser ve Antimetastatik Etkilerinin Araştırılması

Dilber Ece Akgün

**DOKTORA TEZİ**

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Mayıs 2021

Investigation of the Anticancer and Antimetastatic Effects of  
*Apis mellifera* Bee Venom Components on Human Breast Cancer Cell Lines

Dilber Ece Akgün

**DOCTORAL DISSERTATION**

Department of Biotechnology and Biosafety

May 2021

*Apis mellifera* Arı Venom Bileşenlerinin İnsan Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki  
Antikanser ve Antimetastatik Etkilerinin Araştırılması

Dilber Ece Akgün

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalında  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Figen Çalışkan

Bu tez TÜBİTAK tarafından 118S396 no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Mayıs 2021

## ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Figen Çalışkan danışmanlığında hazırlamış olduğum, “*Apis mellifera* Arı Venom Bileşenlerinin İnsan Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Antikanser ve Antimetastatik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik, ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 18/05/2021

Dilber Ece Akgün  
İmza

## ÖZET

Anadolu bal arısı olarak bilinen *Apis mellifera anatoliaca*, Türkiye'nin kuzeydoğu ve güneydoğu bölgeleri hariç tüm orta ve kıyı kesimlerinde çok geniş yayılışa sahip olan bir ırktır. Bal arısı venomu uzun yıllardır geleneksel tıp uygulamaları ile tedavi amaçlı kullanılıyor olmasına karşın bal arısı venomlarının bileşenleri ile gerçekleştirilen biyokimyasal çalışmalar ırklar arasındaki farkları/benzerlikleri, moleküler çalışmalar ise bileşenlerin biyolojik etkilerinin etki mekanizmasını detaylı olarak ortaya koyacak nitelikte değildir.

Bu çalışma kapsamında *Apis mellifera anatoliaca* venomu bileşenleri kromatografik ve elektroforetik yöntemler ile ayrıştırılarak, tüm dünyada ve Türkiye'de kadınlar arasında görülme sıklığı ilk sırada yer alan meme kanseri tedavisinde kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla majör venom peptid bileşenlerinin sitotoksik ve anti-proliferatif etkinlikleri *in vitro* yöntemler ile taranmıştır. Ana 11 adı verilen bileşenin anti-proliferatif, anti-invasiv, apoptotik ve hücre döngüsü üzerindeki etkisi belirlenerek bu etkinin mekanizması transkripsiyonel ve translasyonel seviyede araştırılmıştır. Etkin peptidin moleküler ağırlığının 2846,45Da ve birincil yapısının GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub> olduğu kütle spektrometresi ve amino asit dizilemesi teknikleri ile ortaya çıkarılmıştır. Dizinin biyolojik veri tabanlarındaki karşılaştırmalı analizi ile bu peptidin melittin olduğu ve çalışma boyunca elde edilen kromatografik verilere göre *Apis mellifera anatoliaca* liyofilize venomu içindeki oranı %58,1 olarak belirlenmiştir.

Sunulan tez çalışmasının sonucunda ülkemiz doğal zenginlikleri arasında yer alan *Apis mellifera anatoliaca* venomunun *in vitro* anti-kanser ve anti-metastatik etkinliğinden sorumlu peptid bileşeni tanımlanmıştır. *Apis mellifera anatoliaca* kaynaklı melittinin çalışma kapsamında belirlenen anti-kanser ve anti-metastatik etkinliğinin *in vivo* çalışmalarla tedavi amaçlı kullanım için araştırılması çalışma sonuçlarının sürdürülebilirliğine katkı sağlayacaktır.

### **Anahtar kelimeler:**

*Apis mellifera anatoliaca*, venom, kromatografi, melittin, meme kanseri, apoptoz.

## SUMMARY

*Apis mellifera anatoliaca* as known as the Anatolian honey bee, is a race that has a very wide distribution in all central and coastal parts of Turkey, except for the northeastern and southeastern regions. Although honey bee venom has been used for therapeutic purposes for many years with traditional medicine applications, biochemical studies with components of honey bee venoms do not reveal the differences/similarities between races, and molecular studies do not reveal the mechanism of action of the biological effects of the components in detail.

Within the scope of this study, it was aimed to evaluate the utility of *Apis mellifera anatoliaca* venom components, by separating with chromatographic and electrophoretic methods, in the treatment of breast cancer, the incidence of which is the first among women in the world and also in Turkey. For this purpose, cytotoxic and anti-proliferative effects of major venom peptide components were screened by *in vitro* methods. The anti-proliferative, anti-invasive, apoptotic and cell cycle effects of the component Ana 11 was determined and the mechanisms of these effects were investigated at the transcriptional and translational level. The molecular weight of the effective peptide was revealed as 2846.45Da and the primary structure was GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub>, by mass spectrometric and amino acid sequencing techniques. By comparative analysis of the sequence in biological databases, this peptide was determined as melittin and its ratio in lyophilized venom of *Apis mellifera anatoliaca* was determined as 58.1% according to the chromatographic data obtained throughout the study.

As a result of the presented thesis the peptide component responsible for the *in vitro* anti-cancer and anti-metastatic activities of *Apis mellifera anatoliaca* venom, which is among the natural resources of our country, was identified. Investigating the anti-cancer and anti-metastatic activities of melittin isolated from *Apis mellifera anatoliaca*, determined within the scope of the study, for therapeutic use with *in vivo* studies will contribute to the sustainability of the results of this study.

### **Key words:**

*Apis mellifera anatoliaca*, venom, chromatography, melittin, breast cancer, apoptosis.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>vi</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>vii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xviii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xx</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Kanserın temel özellikleri .....	3
2.1.2. Dünya ve Türkiye epidemiyolojisi .....	6
2.1.3. Meme kanseri .....	7
2.2. Modern İlaç Keşfi Çalışmalarında Doğal Ürünlerin Rolü .....	11
2.2.1. Hayvansal venomlardan ilaç keşfi .....	13
2.2.2. Farmasötik ürünler olarak venom bileşenlerinin başarısı .....	14
2.3. Bal Arısı .....	16
2.3.1. Bal arılarının coğrafi dağılışı ve ırklaşma .....	18
2.3.1.1. <i>Apis mellifera anatoliaca</i> .....	20
2.3.2. Bal arılarında koloni savunması .....	21
2.3.3. Bal arısı venomu .....	24
2.3.4. Bal arısı venomunun terapötik özellikleri .....	26
2.3.4.1. Bal arısı venomu ve melittinin anti-kanser özellikleri .....	27
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>29</b>
3.1. Ham Venom Eldesi .....	29
3.1.1. Arılardan ham venom eldesi .....	29
3.1.2. Peptid karışımı eldesi, miktar tayini ve saklanması .....	30
3.2. Peptid Karışımının Kromatografik Yöntemlerle Fraksiyonlarına Ayrılması .....	30
3.2.1. Ters-faz HPLC .....	31
3.2.2. İyon-değişim Kromatografisi .....	31

## İÇİNDEKİLER (devam)

3.3. Peptid Karışımı ve Majör Fraksiyonların Elektroforetik Profilinin Belirlenmesi .....	32
3.3.1. Denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi.....	32
3.3.2. Elektroforez sonrası jelin görüntülenmesi.....	34
3.4. Hücre Kültürü .....	34
3.4.1. İnsan meme hücre hatlarının kültürü.....	34
3.4.2. Hücre sayısının belirlenmesi .....	35
3.4.3. Hücre büyüme eğrisinin çizilmesi.....	36
3.4.4. Hücre hatlarının saklanması .....	37
3.4.5. Saflaştırılmış peptidin hücrelere uygulanması .....	37
3.5. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu Üzerindeki Etkinin Belirlenmesi.....	38
3.5.1. Nötral kırmızısı testi .....	38
3.5.2. Sülforodamin B testi.....	39
3.6. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi.....	41
3.7. Hücre Hareketliliği Üzerindeki Etkinin Belirlenmesi.....	42
3.7.1. Lateral motilite testi.....	42
3.7.2. Transwell migrasyon testi .....	44
3.7.3. Transwell invazyon testi.....	45
3.8. Akış Sitometrisi ile Fonksiyonel Aktivitenin Belirlenmesi .....	46
3.8.1. Nükleer DNA miktarının belirlenmesi (Hücre döngüsü analizi) .....	47
3.8.2. Hücre ölüm modunun analizi .....	48
3.9. Fonksiyonel Aktivitenin Transkripsiyon Seviyesinde Analizi .....	49
3.9.1. Hücre kültüründen total RNA ekstraksiyonu .....	49
3.9.2. cDNA kütüphanesinin sentezi.....	50
3.9.3. Primer oligonükleotidlerin tasarımı.....	50
3.9.4. Kantitatif PCR (qPCR).....	51
3.10. Fonksiyonel Aktivitenin Translasyon Seviyesinde Analizi .....	54
3.10.1. Hücre kültüründen total protein izolasyonu .....	54
3.10.2. Western blot .....	55
3.11. Peptidin Biyokimyasal Yapı Tayini.....	56
3.11.1. Edman degradasyonu ile peptid birincil yapısının belirlenmesi .....	56
3.11.2. Kütle spektrometresi ile molekül ağırlığının belirlenmesi .....	57
3.11.3. Peptidin Biyoinformatik Olarak Kestiriminin Yapılması .....	57
3.12. Verilerin İstatistiksel Analizi .....	57
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>58</b>
4.1. Arılardan Ham Venom Elde Edilmesi .....	58
4.2. Arılardan Elde Edilen Ham Venomun Kromatografik Profilinin Belirlenmesi .....	62
4.3. Ham Venom ve Majör Fraksiyonların Elektroforetik Profilinin Belirlenmesi .....	65



## İÇİNDEKİLER (devam)

4.4. Çalışma Kapsamında Kullanılan Hücre Hatlarının Büyüme Eğrisinin Çizilmesi .....	71
4.5. “Ana” Fraksiyonların Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi .....	77
4.6. “Ana” Fraksiyonların Anti-proliferatif Etkisinin Belirlenmesi .....	94
4.7. Ana 11 Fraksiyonunun Anti-proliferatif Etkisinin Belirlenmesi .....	103
4.8. Ana 11 Fraksiyonunun Saflığının Belirlenmesi.....	107
4.9. Ana 11 Peptidinin Hemolitik Aktivitesinin Belirlenmesi .....	111
4.10. Ana 11 Peptidinin Hücre Hareketliliği Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi .....	111
4.10.1. Ana 11 peptidinin hücre lateral motilitesi üzerine etkileri .....	112
4.10.2. Ana 11 peptidinin hücre invazyonu üzerine etkileri .....	113
4.11. Akış Sitometrisi ile Ana 11 Peptidinin Fonksiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi .....	118
4.11.1. Ana 11 peptidinin hücre döngüsü üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	118
4.11.2. Ana 11 peptidinin hücre ölüm modu üzerine etkilerinin belirlenmesi .....	125
4.12. Fonksiyonel Aktivitenin Transkripsiyon Seviyesinde Analizi .....	132
4.13. Fonksiyonel Aktivitenin Translasyon Seviyesinde Analizi .....	136
4.14. Elde Edilen Fonksiyonel Aktivite Bulgularının Transkripsiyon ve Translasyon Seviyesindeki Analiz Bulguları ile Birlikte Değerlendirilmesi .....	141
4.14. Ana 11 Peptidinin Biyokimyasal Yapı Tayini .....	153
4.14.1. Ana 11 peptidinin moleküler ağırlığının belirlenmesi .....	153
4.14.2. Ana 11 peptidinin birincil yapısının belirlenmesi .....	156
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>158</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>161</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1.Kanser hücrelerinin, neoplastik gelişim sırasında kazandığı altı temel özellik.....	5
2.2. <i>Apis mellifera</i> ırklarının ve evrimsel kollarının Avrupa'daki yaklaşık olarak dağılımı.....	19
2.3. Anadolu'da yayılış gösteren bal arısı ırklarının dağılımı.....	20
2.4. Bal arısının sokma aparatı.....	23
3.1. Thoma lamı üzerindeki sayma alanı.....	36
3.2. Manuel olarak gerçekleştirilen yara iyileşme testinin şematik gösterimi.....	43
3.3. Yara iyileşme testi için kullanılan silikon kültür insertler ile hücresiz alan oluşturulması.....	43
3.4. Transwell migrasyon testinin şematik gösterimi.....	45
3.5. Transwell invazyon testinin şematik gösterimi.....	46
4.1. Tez çalışması kapsamında tasarlanan ve yaptırılan venom toplama aparatı ve şematik gösterimi.....	58
4.2. Ham arı venomunun toplanması.....	59
4.3. <i>Apis mellifera anatoliaca</i> ham venomunun 0 – 60 %B metoduyla ayrıştırılmış RP-HPLC kromatogramı.....	63
4.4. Tez çalışmasının bundan sonraki aşamalarında çalışmaya devam edilecek majör fraksiyonların venomda bulunma yüzdesi.....	65
4.5. <i>Apis mellifera anatoliaca</i> ham venomu SDS-PAGE profili.....	66
4.6. <i>Apis mellifera anatoliaca</i> ham venomundan elde edilen peptid karışımının kromatografik ayrımı süresince her 4 dakikada bir toplanan fraksiyonların (F1 – F15) denatüre edici Tris-Trisin SDS-PAGE görüntüleri.....	68
4.7. <i>Apis mellifera anatoliaca</i> ham venomundan elde edilen peptid karışımının kromatografik ayrımı süresince her 4 dakikada bir toplanan protein içeren fraksiyonların (F5 – F14) non-denatüre edici Tris-Trisin SDS-PAGE görüntüleri.....	69
4.8. Majör fraksiyon Ana 9, 10 ve 11'in denatüre edici Tricine-SDS PAGE görüntüleri.....	70
4.9. MDA-MB-231 hücre hattına ait büyüme eğrisi grafiği.....	72
4.10. MCF-7 hücre hattına ait büyüme eğrisi grafiği.....	73
4.11. MCF-10A hücre hattına ait büyüme eğrisi grafiği.....	74
4.12. MDA-MB-231 hücre hattına ait hücre sayısı OD korelasyon grafiği ve grafiğe ait doğru denklemi.....	75
4.13. MCF-7 hücre hattına ait hücre sayısı OD korelasyon grafiği ve grafiğe ait doğru denklemi.....	76

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.14. MCF-7 hücre hattına ait hücre sayısı OD korelasyon grafiği ve grafiğe ait doğru denklemi. ....	76
4.15. Ana 5 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	78
4.16. Ana 5 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	78
4.17. Ana 5 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	79
4.18. Ana 5 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	79
4.19. Ana 6 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	80
4.20. Ana 6 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	80
4.21. Ana 6 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	81
4.22. Ana 6 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	81
4.23. Ana 7 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	82
4.24. Ana 7 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	82
4.25. Ana 7 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	83
4.26. Ana 7 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	83
4.27. Ana 8 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	84
4.28. Ana 8 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	84
4.29. Ana 8 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	85
4.30. Ana 8 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	85
4.31. Ana 9 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	86
4.32. Ana 9 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	86
4.33. Ana 9 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	87
4.34. Ana 9 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	87

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.35. Ana 10 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	88
4.36. Ana 10 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	88
4.37. Ana 10 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	89
4.38. Ana 10 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	89
4.39. Ana 11 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	90
4.40. Ana 11 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	91
4.41. Ana 11 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	91
4.42. Ana 11 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği. ....	92
4.43. Ana 5 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	94
4.44. Ana 5 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	95
4.45. Ana 6 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	95
4.46. Ana 6 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	96
4.47. Ana 7 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	96
4.48. Ana 7 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	97
4.49. Ana 8 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	97
4.50. Ana 8 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	98
4.51. Ana 9 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	98
4.52. Ana 9 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	99
4.53. Ana 10 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	99
4.54. Ana 10 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	100
4.55. Ana 11 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	100
4.56. Ana 11 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. ....	101
4.57. Ana 11 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde a) 24 saat ve b) 48 saat sonundaki etkisinin normalize edilmiş veriler ile oluşturulmuş doz-cevap grafiği. ....	104
4.58. Ana 11 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerinde a) 24 saat ve b) 48 saat sonundaki etkisinin normalize edilmiş veriler ile oluşturulmuş doz-cevap grafiği. ....	105

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.59. Ana 11 fraksiyonunun MCF-10A hücre hattı üzerinde a) 24 saat ve b) 48 saat sonundaki etkisinin normalize edilmiş veriler ile oluşturulmuş doz-cevap grafiği.....	106
4.60. Ana 11 fraksiyonunun katyon değişim HPLC kromatogramı. ....	108
4.61. Ana 11 fraksiyonunun 15-55% B gradient RP-HPLC kromatogramı. ....	109
4.62. Ana 11 fraksiyonunun %10'luk Tris-Trisin SDS-PAGE analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	110
4.63. Ana 11 fraksiyonunun %16'luk Tris-Trisin SDS-PAGE analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	110
4.64. Ana 11 peptidinin hemolitik aktivitesini gösteren HC <sub>50</sub> grafiği. ....	111
4.65. MDA-MB-231 hücre hattına ait 24 ve 48 saat sonunda elde edilen % yara kapanma hızı grafiği. ....	112
4.66. MDA-MB-231 hücre hattına 1,5 µg/ml Ana 11 peptidi uygulaması yapılarak gerçekleştirilen lateral motilite testinin zamana bağlı fotoğrafları.....	114
4.67. Transwell invazyon testi için MDA-MB-231 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen optimum hücre sayısı denemesinin 10X ve 40X büyütme ile inverted mikroskop altında görüntülenmesiyle elde edilen fotoğraflar. ....	116
4.68. İki farklı dozda Ana 11 peptidi uygulanmış MDA-MB-231 hücre hattı ile gerçekleştirilen transwell invazyon deneyi sonucunda 10X ve 40X büyütme ile mikroskop altında görüntülenen membranların fotoğrafları. ....	117
4.69. İki farklı dozda Ana 11 peptidi uygulanmış MDA-MB-231 hücre hattı ile gerçekleştirilen transwell invazyon deneyi sonucunda elde edilen rölatif invazyon yüzdeleri. ....	118
4.70. MDA-MB-231 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi grafikleri... ..	119
4.71. MDA-MB-231 hücre hattının, artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra, akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerini gösteren bar grafiği. ....	120
4.72. MCF-7 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi grafikleri. ....	121
4.73. MCF-7 hücre hattının, artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra, akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerini gösteren bar grafiği. ....	122
4.74. MCF-10A hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi grafikleri.....	123
4.75. MCF-10A hücre hattının, artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra, akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	124
4.76. MDA-MB-231 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen apoptoz analizi grafikleri. ....	126

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.77. MDA-MB-231 hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, popülasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik bulunma yüzdelерinin bar grafiği.....	127
4.78. MCF-7 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen apoptoz analizi grafikleri..	128
4.79. MCF-7 hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, popülasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik bulunma yüzdelерinin bar grafiği.....	129
4.80. MCF-10A hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen apoptoz analizi grafikleri..	130
4.81. MCF-10A hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, popülasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik bulunma yüzdelерinin bar grafiği.....	131
4.82. MDA-MB-231 hücre hattına 2,5 µg/ml Ana 11 peptidi uygulanmış deney grubunda araştırılan genler için ekspresyon seviyesini gösteren bar grafiği.....	133
4.83. MCF-7 hücre hattına 3 µg/ml Ana 11 peptidi uygulanmış deney grubunda araştırılan genler için ekspresyon seviyesini gösteren bar grafiği.....	134
4.84. MCF-10A hücre hattına 2,5 µg/ml Ana 11 peptidi uygulanmış deney grubunda araştırılan genler için ekspresyon seviyesini gösteren bar grafiği.....	135
4.85. Sırasıyla; MDA-MB-231 kontrol, MDA-MB-231 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-7 kontrol, MCF-7 3 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-10A kontrol, MCF-10A 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması sonrası caspase 8 (üstte) ve aynı membranda B-aktin (altta) ekspresyonu.....	136
4.86. Her bir hücre hattı için Kaspaz-8 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş rölaf ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	137
4.87. Sırasıyla; MDA-MB-231 kontrol, MDA-MB-231 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-7 kontrol, MCF-7 3 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-10A kontrol, MCF-10A 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması sonrası E-cadherin (üstte) ve aynı membranda B-aktin (altta) ekspresyonu.....	137
4.88. Her bir hücre hattı için E-cadherin proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş rölaf ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	138
4.89. Sırasıyla; marker bant, MDA-MB-231 kontrol, MDA-MB-231 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması, marker bant, MCF-7 kontrol, MCF-7 3 µg/ml Ana 11 uygulaması sonrası Cox2 (üstte) ve aynı membranlarda B-aktin (altta) ekspresyonu.....	138
4.90. Her bir hücre hattı için Cox2 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş rölaf ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	139

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.91. Sırasıyla; MDA-MB-231 kontrol, MDA-MB-231 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-7 kontrol, MCF-7 3 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-10A kontrol, MCF-10A 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması sonrası Cyclin E1 (üstte) ve aynı membranda B-actin (altta) ekspresyonu.....	139
4.92. Her bir hücre hattı için Siklin E1 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş rölatif ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	140
4.93. Ökaryotik hücre döngüsü ve regülasyonunun şematik gösterimi.....	144
4.94. Melittinin moleküler mekanizmalarını özetleyen şema.....	150
4.95. Ana 11 peptidinin ESI – Ion trap kütle spektrometresi analizi sonucu elde edilen kütle kromatogramı.....	153
4.96. Ana 11 peptidinin MALDI-TOF-TOF kütle spektrumu.....	154
4.97. Ana 11'in tripsin enzimi ile yıkımı sonrasında triptik peptidlerin MALDI-TOF-TOF kütle spektrumu.....	154
4.98. Melittin peptidinin BLAST kullanılarak elde edilen benzerlik analizi .....	156

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b><u>Cizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Klinik kullanım için onaylanmış venom peptidleri veya türevleri .....	17
2.2. Arı venomunda en çok bulunan bileşenler ve venomda ağırlıkça bulunma yüzdeleri. ....	25
3.1. Tez çalışmasında kullanılmak üzere tasarlanan primer oligonükleotid dizileri. ....	52
3.2. Tez çalışması kapsamında kullanılan primer antikolar, büyüklükleri ve rol aldığı ilişkili yollar. ....	56
4.1. ANG Vakfi Orta Anadolu Arılığı'nda bulunan bal yapan toplam 10 koloninin sağılmasından elde edilen venom protein miktarları.....	60
4.2. MDA-MB-231 hücre hattının farklı başlangıç hücre yoğunluklarında popülasyon ikilenme süreleri.....	72
4.3. MCF-7 hücre hattının farklı başlangıç hücre yoğunluklarında popülasyon ikilenme süreleri. ....	73
4.4. MCF-10A hücre hattının farklı başlangıç hücre yoğunluklarında popülasyon ikilenme süreleri. ....	74
4.5. Sitotoksitesite değerlendirilen ham venom fraksiyonlarının zamana ve hücre hattına bağlı olarak belirlenen ETD değerleri. ....	93
4.6. Ana 10 fraksiyonu için farklı zaman noktalarında farklı hücre hatları için hesaplanan öncül GI <sub>50</sub> , TGI ve LC <sub>50</sub> değerleri. ....	101
4.7. Ana 11 fraksiyonu için farklı zaman noktalarında farklı hücre hatları için hesaplanan öncül GI <sub>50</sub> , TGI ve LC <sub>50</sub> değerleri. ....	102
4.8. Ana 11 fraksiyonunun tez çalışmasında kullanılan tüm hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkisini belirtilen GI <sub>10</sub> , GI <sub>50</sub> , GI <sub>90</sub> değerleri.....	103
4.9. MDA-MB-231 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin Sub-G1, G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.....	121
4.10. MCF-7 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin Sub-G1, G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.....	123
4.11. MCF-10A hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin Sub-G1, G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.....	125
4.12. MDA-MB-231 hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, popülasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik bulunma yüzdelerinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.....	127



**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

- 4.13. MCF-7 hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, popülasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik bulunma yüzdelerinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu. .... 130
- 4.14. MCF-10A hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, popülasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik bulunma yüzdelerinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu. .... 132

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Kısaltma</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
Da	Dalton
HCl	Hidroklorik asit
KCl	Potasyum klorür
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
U	Ünite
ER	Östrojen reseptör
PR	Progesteron reseptörü
ERBB2	Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2
HR	Hormon reseptörü
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu IARC 'in en son 2020 yılında açıklanan raporuna göre meme kanseri dünya çapında kadınlarda %47,8 insidans ve %13,6 mortalite oranı ile en sık görülen kanser türü olarak belirtilmiştir. Ülkemizde ise bu oranlar %46,6 insidans ve %12,9 mortalite olarak belinmektedir. Son yıllarda kanser teşhisi ve tedavisi yaklaşımları çok önemli bir gelişim göstermesine rağmen, bugün uygulanan cerrahi, radyasyon ve kemoterapi gibi klasik yöntemler rölatif olarak daha düşük başarı yüzdesine sahiptir ve yüksek tekrar etme riski taşımaktadır. Mevcut kemoterapötikler, tümör hücrelerine özgü yeterli seçiciliğin olmaması ve dolayısıyla sağlıklı hücrelerin non-spesifik olarak hedeflenmesi gibi etkinliklerini kısıtlayan zararlı yan etkilere sahiptir.

Arı venomu veya apitoksin, hayvanlar alemindeki eşsiz silahlardan biri olarak arı kolonisinin arthropodlardan vertebralılara kadar değişiklik gösteren predatörlerine karşı korunmasında primer rol alan kompleks bir karışımdır. En çok çalışılan venomlar arasında olan arı venomu ve ana bileşeni mellitinin; kanser hücre büyümesi ve/veya proliferasyonunun inhibisyonu, tümör metastazının baskılanması, apoptozun indüklenmesi gibi pek çok açıdan gösterdiği anti tümöral etki kanser yönetimi için arı venomunun kusursuz bir alternatif olabileceğini göstermektedir. Uzun zamandır bilinen ve faydalanılan anti-enflamatuar etkisinin yanı sıra son zamanlarda tümör tedavisinde kullanılan arı venomu kanserle savaşma potansiyeli olan biyolojik olarak aktif peptid moleküllerin umut vadeden bir kaynağıdır.

Bu çalışmada ilk olarak *Apis mellifera anatoliaca* alt türü arı venom bileşenleri farklı kromatografik mekanizmalarla fraksiyonlarına ayrıştırılmıştır. MDA-MB-231 ve MCF-7 kanser hücre hatlarının yanında sağlıklı meme epitel hücre hattı MCF-10A ile gerçekleştirilen biyolojik etkinlik çalışmaları sonucunda anti-kanser özellik gösterdiği belirlenen fraksiyonlardan etkin peptid saflaştırılarak Ana 11 ön adı ile isimlendirilmiştir. Ana 11 peptidinin 26 aminoasitten oluştuğu ve 2846,45 Da moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlenmiş, Edman degradasyonu ile elde edilen bilgilerden diziliminin GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub> olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ülkemiz

faunası içerisinde yer alan *Apis mellifera anatoliaca* alt türü arı venomunda mellitin peptidi izole edilerek birincil yapısı ve biyolojik etkileri ortaya çıkarılmıştır.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçların ülkemiz arıcılık sektörüne, ülke ekonomisine ve kanser tedavi yöntemlerine fayda sağlaması beklenmektedir. Bu tez çalışması 118S396 nolu proje ile TÜBİTAK tarafından sağlanan bütçe ile gerçekleştirilmiştir.

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1. Kanser

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi ile karakterize, ortak bir fenotipik özellik olarak diğer dokuları istila etme potansiyeli ile tanımlanan heterojen bir hastalık grubunu kapsamaktadır. Kanseroz büyüme diğer bir deyişle anormal bir görünüş ve proliferasyon motifine sahip hücrelerden oluşan benign veya malign tümörler neoplazi olarak da adlandırılmaktadır.

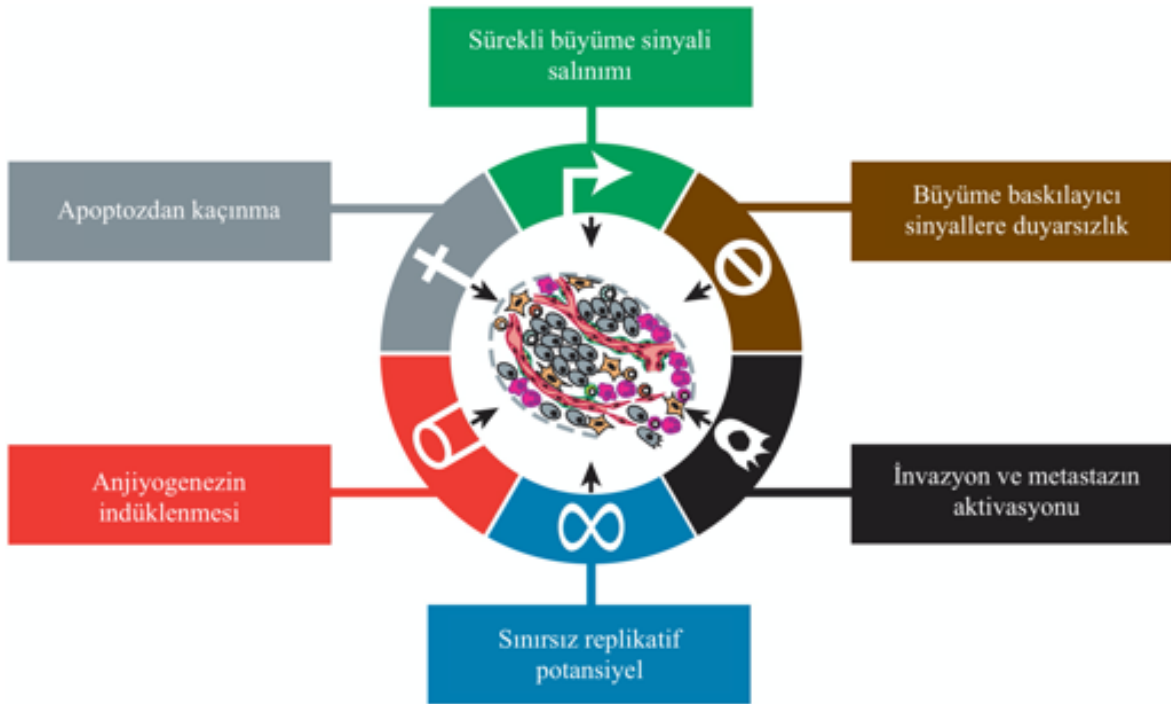
#### 2.1.1. Kanserin temel özellikleri

Olağanüstü çeşitliliğe sahip neoplastik hastalıkların mantıksal bir çerçeveye oturtularak anlaşılabilmesi için altı temel özelliğe sahip olduğu öne sürülmüştür: sürekli büyüme sinyali salınımı, büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçınma, sınırsız replikatif potansiyel, anjiyogenezin indüklenmesi, invazyon ve metastazın aktivasyonu (Şekil 2.1.) (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Normal dokularda, hücrenin büyüme ve bölünme döngüsüne girmesini indükleyen sinyallerin üretimi ve salınımı dikkatle kontrol edilmekte, böylece hücre sayısının homeostazı sağlanarak normal doku yapı ve fonksiyonu korunmaktadır. Kanser hücreleri ise, bu sinyallerin kontrolünü bozarak kronik olarak proliferasyonu sürdürür ve en karakteristik özelliklerini kazanırlar. Aynı zamanda kanser hücreleri, çoğunlukla tümör baskılayıcı genlerin aktivitesine dayalı olan, hücre büyüme ve çoğalmasını negatif olarak regüle eden mekanizmaları da atlamaktadır. Diğer yandan kanser hücreleri evrilirken, apoptoz ile gerçekleşen programlı hücre ölümü mekanizmalarından kaçınmak için birden fazla mekanizma geliştirmiştir. Neoplastik hücrelerin çoğalmasını önlemek için normal hücrelerde bulunan proliferasyon bariyerleri (senesens ve kriz durumunda apoptoz), nadir birkaç tane varyant kanser hücresi tarafından telomeraz aktivitesi ile aşılarak sınırsız replikatif özellik kazanması ile sonuçlanmaktadır. Embriyogenez sırasında vasküler sistemin oluşumu sırasında, yetişkinlerde yara iyileşme sürecinin ve dişi üreme döngüsünün bir parçası olarak anjiyogenez geçici olarak aktif olmaktadır. Buna karşın

tümör gelişimi sırasında, neoplastik gelişimi sürekli destekleyecek besin ve oksijen ihtiyacının karşılanması ve metabolik atıkların uzaklaştırılması amacıyla, anjiyogenez neredeyse sürekli aktif durumdadır. Kanseri gelişimi sırasında malignansi arttıkça, bölgesel olarak yakın dokulara yayılarak invazyon ve en sonunda bulunduğu primer bölgeden ayrılıp vücudun diğer bir bölgesinde sekonder olarak yayılarak metastaz gerçekleştirilmektedir.

Hanahan ve Weinberg'in (2000) bu ikonik ve ufuk açıcı makalesinde; normal hücrelerin, neoplastik duruma kademeli olarak evrimleştikçe, bahsi geçen özelliklerden bir dizi elde ettiği açıklanmış ve böylece çok basamaklı insan tümör patogenezi, gelişmekte olan kanser hücrelerinin bu özellikleri kazanma ihtiyacı sonucunda tümörjenik ve nihayetinde malign olması ile açıklanabilmiştir. Buradan yola çıkılarak, tümörlerin çoğalan kanser hücrelerinin oluşturduğu izole kitleler olmadığı, bunun yerine birbiriyle heterotipik etkileşimlere katılan çok sayıda farklı hücre tipinden oluşan karmaşık dokular olduğu belirtilmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Takip eden on yıl içinde bu temel özelliklerin kanser gelişimindeki yeri kesinleşmiş ve bunlara ilave bazı açıklamalar ve yeni özellikler önerilmiştir. Genom instabilitesi ve inflamasyonun altı temel özelliğin altında yatan, bu özelliklerin gelişimine pek çok yönden katkıda bulunan iki mekanizma olduğu açıklanmıştır. Bunun yanında enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün sistemin yıkımından kaçınma olmak üzere iki temel özellik daha önerilmiştir. Kanseri hücrelerinin karmaşık doğasının yanı sıra tümörlerin de "tümör mikro çevresi"ni oluşturarak bu karmaşıklığa yeni bir boyut kazandırdığı vurgulanmıştır (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2.1.Kanser hücrelerinin, neoplastik gelişim sırasında kazandığı altı temel özellik. (Hanahan ve Weinberg, 2000)

Malign hücrelerin metastatik yayılımı, bugün hala kanser sebebiyle ölümlerin %90'dan fazlasını oluşturmaktadır (Lambert vd., 2017). Metastaz, kanser biyolojisinin en gizemli özelliklerinden biridir. İnvazyon-metastaz kaskadı olarak adlandırılan, karmaşık, sıralı ve birbiriyle ilişkili bir süreç sonucunda primer bölgeden uzakta ikincil tümörlerin oluşumuna yol açmaktadır (Talmadge ve Fidler, 2010). Kanserinin genel özelliklerinin giderek daha fazla anlaşılması terapötik gelişime katkıda bulunmuş olsa da kalıcı olarak hastalık tedavi edilememektedir (Hanahan, 2014). Erken teşhis edilip cerrahi olarak uzaklaştırılmadığı sürece, kanserin spesifik özelliklerini hedefleyen terapiler sadece geçici olarak etkilidir. İnvazyon ve metastaz dışında, kanserin diğer beş temel özelliğinin ve hatta güncellenmiş diğer temel özelliklerinin benign tümörlerde de bulunması, bu özelliğin, malignitenin en tanımlayıcı özelliği olarak değerlendirilmesine sebep olmuştur (Lazebnik, 2010; Marino-Enriquez ve Fletcher, 2014). Ancak ne yazık ki, invazyon veya metastazı engellemek için özel olarak tasarlanmış herhangi bir onaylı ilaç bulunmamaktadır. Bunun yerine mevcut terapötik yaklaşımlar, diğer temel özellikleri hedefleyerek tümör hücresi canlılığını azaltmayı amaçlamaktadır (Meirson vd., 2020). Doğrudan hücre canlılığını etkileyen terapiler ile, kanser hücre popülasyonu kaçınılmaz bir şekilde Darwinci bir seçim baskısına ve evrime zorlanmaktadır. Tersine, invazyonu bloke etmek, hücrenin

hayatta kalmasını doğrudan etkilemediği için, yeni dirençli soylara yönelik seçici bir baskı uygulanması daha az olasıdır (Meirson, vd., 2020).

### 2.1.2. Dünya ve Türkiye epidemiyolojisi

Kanser, tüm dünya ülkelerinde önde gelen bir ölüm sebebi ve beklenen yaşam süresinin artmasının önünde duran önemli bir bariyer olarak değerlendirilen bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2019 yılı raporlarına göre, 183 ülkenin 112'sinde 70 yaş öncesi ölümlerin sebebi olarak birinci veya ikinci, diğer 23 ülkede ise üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır (World Health Organization, 2020). Çoğu ülkede, kansere kıyasla kalp krizi ve koroner kalp hastalığı sebebiyle gerçekleşen ölümlerdeki düşüşler, kanserin önde gelen bir ölüm sebebi olarak artan önemini yansıtmaktadır.

Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (International Agency of Research on Cancer, IARC)'nun en son 2020 yılında açıklanan raporuna göre dünya çapında 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 9,96 milyon kanser nedeniyle ölüm gerçekleşmiştir (Ferlay vd., 2020a). Büyük bir olasılıkla insan popülasyonunun sürekli artması, yaşlanma ve kanser için ana risk faktörlerinin yaygınlığı ve dağılımındaki değişiklik sebebiyle kanser insidansı ve ölüm oranları dünya çapında gittikçe artmaktadır. Global demografik istatistiklere bakılarak gerçekleştirilen tahminlere göre ise 2040 yılına kadar yeni kanser vakalarının sayısının %56,7 oranında bir artış göstererek 30,2 milyona ve ölüm oranının ise %63,7 artarak 16,3 milyona ulaşması beklenmektedir (Ferlay vd., 2020b).

Global kanser vakalarının %11,7'sini oluşturan meme kanseri ise 2020 yılında 2,3 milyon yeni vaka ile akciğer kanserini geride bırakarak birinci sıraya yerleşmiştir. 685 bin ölüm ile dünya çapında kanser mortalite sıralamasında beşinci sırada yer almaktadır. Kadınlar arasında meme kanseri, her 4 kanser vakasından birini ve 6 kanser sebepli ölümden birini oluşturmaktadır. Kadınlar arasında 185 ülkenin 159'unda kanser insidansı ve 110'unda mortalitesi için birinci sırada yer almaktadır (Ferlay, vd., 2020a; Sung vd., 2021).



### 2.1.3. Meme kanseri

İnsan tümörlerinin çok büyük bir kısmı epitel dokuda ortaya çıkmaktadır. Epitel doku, vücut boşluklarını ve kanalların duvarlarını veya vücudun dış yüzeyini kaplayan hücre tabakalarıdır. Epitel hücre katmanlarının altında bir bazal membran (bazal lamina) bulunur ve bu tabaka epitel dokuyu stroma olarak adlandırılan destekleyici bağ dokudan ayırır. Epitel dokuda ortaya çıkan kanserler, karsinom olarak adlandırılmakta olup kansere bağlı ölümlerin %80 inden sorumludur. Çoğu epitel, çevreledikleri kanala veya boşluklara (lumina) salgı yapan özel hücreler içermektedir. Bu tip epitel hücrelerin oluşturduğu kanserlere adenokarsinom adı verilmektedir (Weinberg, 2013).

Meme kanseri, malign hücrelerin meme epitel dokusundaki kontrolsüz büyümesi ve çoğalması ile karakterize bir hastalıktır. Dişilerde de erkeklerde de meme dokusu bulunduğu için, hastalık her iki cinsiyeti de etkileyebilmektedir. Ancak erkeklerde görülme sıklığı %1, mortalitesi ise %0,1'den düşüktür (Ferzoco ve Ruddy, 2016). Dişilerde meme, sinirler, kan damarları, lenf damarları ve nodları ile beslenen yağ doku ve 12 – 20 adet lob ve onların da daha küçük lobüllere ayrıldığı glandular dokulardan oluşmaktadır (Akram vd., 2017). Süt, lobüllerde üretildikten sonra meme ucuna süt kanalları ile taşınmaktadır.

Meme kanseri, lobüllerin ve süt kanallarının yüzeyini kaplayan epitel dokuda oluşan bir adenokarsinomdur. Meme tümörleri histolojik olarak köken aldığı bölgenin yerine göre sınıflandırılmaktadır. En yaygın meme kanseri histolojisini süt kanallarında oluşan invaziv duktal karsinom (hastaların %50- 70'i) ve onu takiben süt bezlerinde oluşan invaziv lobular karsinom (hastaların %5-15'i) oluştururken, duktal/lobular karsinom karışımı olan ve diğer nadir histolojiler ise hastaların kalanını oluşturmaktadır (Harris vd., 2014). Klinik olarak tümör evresinin belirlenmesi tedavi seçimi yönlendiren önemli bir faktördür. Yaygın olarak kullanılan evreleme sistemi, Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği (UICC) tarafından önerilmiş olan, malign tümörlerin Tümör-Düğüm-Metastaz (TNM) sınıflandırmasıdır. Bu sınıflandırmada tümörün primer ve bölgesel nodal boyutu ve metastazların yokluğu veya varlığı anatomik olarak değerlendirilerek 0'dan IV'e kadar değişen evreler belirlenmektedir (Banin Hirata vd., 2014; Donepudi vd., 2014).

Meme kanserinin gelişimi, hiperproliferasyon ile başlayan ardından *in situ* karsinom, invaziv karsinom ve son olarak da metastatik hastalığa dönüşen bir dizi süreci takip etmektedir. Sınıflandırmaya göre, *in situ* duktal karsinom gibi invaziv olmayan meme kanserleri 0. evre olarak değerlendirilmektedir. Anatomik olarak 2 cm'den küçük ve lenf nodu tutulumu olmayan meme tümörü olarak tanımlanan I. evre meme kanserlerinin 5 yıllık meme kanseri spesifik sağ kalım oranları HR+ için en az %99, ERBB2+ için en az %94 ve üçlü negatif alt-tip için en az %85'tir. Uzak bölgeye metastaz ile karakterize edilen IV. evre meme kanserlerinin genel sağ kalım oranları ise HR+ ve ERBB2+ için 5 yıl iken üçlü negatif alt-tip için ise 1 yıl olarak belirtilmektedir (Chavez-MacGregor vd., 2017; Waks ve Winer, 2019).

Meme kanserinin klinik ilerleyişindeki değişkenlik göz önüne alındığında, tümör davranışını tahmin edebilecek belirteçlerin belirlenmesi özellikle meme kanserinde oldukça önemlidir. Tümör belirteçlerinin belirlenmesi kanser hastalarının kliniğinin yönetimi sırasında, tanısal prosedürlere, evrelemeye, terapi modelinin belirlenmesinde, terapötik yanıtın değerlendirilmesinde, rekürans, uzak metastaz ve dolayısıyla prognozun saptanmasında oldukça faydalı bir araçtır (Banin Hirata, vd., 2014). ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) sözlüğünde biyobelirteç, kanda, diğer vücut sıvılarında veya dokularda bulunan, normal veya anormal bir sürecin veya bir durumun veya hastalığın işareti olan biyolojik bir molekül olarak tanımlanmaktadır (NIH, 2020). Bir biyobelirteç aynı zamanda vücudun tedaviye ne kadar iyi yanıt verdiğinin değerlendirilmesi için de kullanılmaktadır (NIH, 2020). Moleküler belirteç olarak da adlandırılan biyobelirteçlerin çoğu protein olmakla birlikte, tümör dokusunda tanımlanan gen ekspresyon paternleri, RNA ve DNA da tümör belirteçleri olarak öne çıkmaktadır (Mishra ve Verma, 2010).

Meme kanser patogenezinde yüksek riskli fenotiplerin belirlenmesi ve en etkin terapinin seçilmesi amacıyla iki ana moleküler belirteç tanımlanmıştır. Bunlardan biri, meme kanserlerinin yaklaşık %70'inde eksprese olan invaziv östrojen reseptörü  $\alpha$  (ER $\alpha$ )'dır. ER $\alpha$ , bir steroid hormon reseptörü ve östrojen ile aktive edildiğinde meme kanser hücrelerinde onkogenik büyüme yolaklarını aktive eden bir büyüme faktörüdür. ER $\alpha$  ile yakından ilişkili steroid hormon progesteron reseptörünün (PR) ekspresyonu da ER $\alpha$  sinyalizasyonunun bir belirteçidir (Joshi ve Press, 2018). Tümör dokusundaki

hücrelerin en az %1'inde östrojen reseptörü (ER) veya PR ekspresyonu olan tümörler hormon reseptörü pozitif (HR+) olarak sınıflandırılmaktadır (Hammond vd., 2010). Epitel dokunun özelliklerini koruyan iyi diferansiye tümörler oluşturmaktadırlar. Endokrin ajanlarla ER sinyalizasyonunun down-regülasyonu ER+ ve PR+ meme kanserleri için primer sistemik tedaviyi oluşturmaktadır (Waks ve Winer, 2019).

İkinci ana moleküler hedef ise, büyüme faktörü reseptör ailesinden bir reseptör kinaz olan ve meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde amplifiye olan veya fazla eksprese (overexpression) edilen, sistemik tedavi olmadığında kötü prognozla ilişkilendirilen, epidermal büyüme faktörü 2'dir (*ERBB2*, *HER2* veya *HER2/neu*) (Piccart-Gebhart vd., 2005). *ERBB2* genini amplifiye eden veya fazla eksprese (overexpression) eden tümörler *ERBB2+* olarak isimlendirilmektedir (Wolff vd., 2013). Bu tümörlerin tedavisinde anti-*ERBB2* antikoları (trastuzumab ve pertuzumab) ile *ERBB2* hedefli terapi yaklaşımlarından ve küçük molekül tirozin kinaz inhibitörlerinden (lapatinib ve neratinib) faydalanılmaktadır (Waks ve Winer, 2019).

ER, PR veya *ERBB2* moleküler hedeflerinin eksprese edilmediği üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ise meme tümörlerinin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır (Denkert vd., 2017). Üçlü negatif tümörler teşhisi takip eden 3 – 5 yıl içinde yüksek oranda uzak bir bölgede tekrar görülme riski taşımaktadır (Foulkes vd., 2010). Anti-*ERBB2* hedefli terapisi ve geleneksel sitotoksik kemoterapi bu alt tipin tedavisi için yetersiz görülmektedir. Epitel doku özelliklerini kaybetmiş, daha çok bazal ve mezenkimal özellikler gösteren tümörler oluşturmaktadır. Agresif klinik seyir, kötü prognoz ve spesifik tedavi seçeneklerinin eksikliği, bu tümör alt tipine olan ilgiyi yoğunlaştırmış olup, bu alt tipin spesifik moleküler patofizyolojisinin anlaşılabilmesi için kapsamlı bir araştırma çabası mevcuttur (Cho vd., 2011).

Tüm bunların yanında meme kanserlerinin biyolojik heterojenitelerinin, yukarıda açıklanan, klinikte prognostik tahminler ve tedavi seçimi için rutin olarak kullanılan ana klinik parametreler (yaş, nod durumu, tümör büyüklüğü, histolojik derecesi) ve moleküler patolojik belirteçler (ER, PR, *ERBB2*) ile tamamen anlaşılamayacağı düşünülmekte olup detaylı gen ekspresyon analizleri gerçekleştiren gruplar tarafından “meme kanserinin intrinsik alt tipleri” tanımlanmış ve o günden bu yana detaylı olarak çalışılmıştır (Perou

vd., 2000; Sørlie vd., 2003; Prat ve Perou, 2011). Bu çalışmalar ile luminal A, luminal B, HER2-zenginleştirilmiş, bazal-benzeri, normal meme-benzeri ve Claudin-low olmak üzere her biri farklı prognoza sahip en az 6 moleküler alt tip belirlenmiştir. Bu alt tiplerin belirlenmesinde de klasik ER, PR, ERBB2 belirteçleri kullanılmış ancak bunların yanında Ki67, EGFR, CK5, CK8 ve CK17 gibi çeşitli sitokeratinler, P-cadherin, caveolin 1, CD44, claudin, E-cadherin gibi birden fazla ve çok çeşitli moleküler belirteçten faydalanılmıştır (Eroles vd., 2012).

#### **2.1.4. Kanser tedavisi ve karşılaşılan güçlükler**

Kemoterapi, cerrahi ve radyoterapi günümüzde mevcut olan en yaygın kanser tedavisi yöntemleridir. Son yıllarda immünoterapi önemli bir terapötik alternatif ve hatta birçok durumda ilk tercih edilen seçenek haline gelmiştir. Bazen de cerrahi müdahalelerin yapılamadığı durumlarda tüm bunların kombinasyonu kullanılmaktadır. Yine de pek çok tedavinin spesifik olmamasının yanında pek çok sınırlamasının ve yan etkilerinin olması kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerin etkinliklerine meydan okumaktadır (Arruebo vd., 2011). Bazı kanserlerin kullanılan kemoterapötiklere kademeli olarak direnç kazandığı veya hiç cevap vermediği gösterilmiştir (Pezzella vd., 2019). Bunun yanında radyoterapi de vasküler hasar, fibroz, hormonal bozukluklar, infertilite ve sekonder maligniteler gibi yan etkilere sebep olabilmektedir (Dilalla vd., 2020). Bunların aksine, kanser immünoterapisi, kanser hücrelerinin spesifik olarak ortadan kaldırılması için büyük umut vaatetmiş olsa da hayati tehlikesi olan immün-ilişkili bazı bozukluklara sebep olabilmektedir (Hegde ve Chen, 2020).

Kanser tedavisi, sadece tedavilerin etkisizliği ve yan etkileri nedeniyle değil, aynı zamanda birçok vakada tam iyileşme gerçekleşmemesi nedeniyle tarih boyunca inişler ve çıkışlarla karakterize edilmiştir. Sonuç olarak, etkin, ancak yüksek oranda hedefli etkilere sahip olan yeni antikanser ajanların tanımlanmasına sürekli ihtiyaç vardır. Bu sebeple *de novo* veya doğal bileşiklerden türevlenmiş daha spesifik ve seçici anti-kanser ilaçların araştırılması yakın gelecekte oldukça aktif bir alan olmayı sürdürecektir.

Pek çok doğal bileşik, hedefine yüksek ölçüde seçicilik ile bağlanabilmesini sağlayan yapısal bir karmaşıklığa sahiptir. Bunun yanında sentetik benzerleri ile kıyaslandığında vücutta çok daha kolay emilmekte ve metabolize edilmektedir (Carlson, 2010). Bu nedenle anti-kanser ilaç adaylarının doğal kaynaklardan araştırılması ve geliştirilmesi modern tıpta büyük umut vaat etmektedir (Jin-Jian ve Yi-Tao, 2020). Bugüne kadar Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve başarıyla ticarileştirilmiş doğal kaynaklardan türetilen pek çok kemoterapötik bulunmaktadır. Nitekim, 1946 yılından bu yana modern tıbbın kullanımı için onaylanmış 321 adet antikanser ajanın, %68'i doğal ürünler (%27), doğal ürünlerin yarı-sentetik türevleri (%20), doğal ürünlerden türevlenmiş moleküllerden (%21) oluşmaktadır (Newman ve Cragg, 2020). Yeni antikanser ilaçların kaynağı olarak faydalanılan organizmaların en büyük taksonomik sınıflarını eklembacaklılar, yüksek bitkiler, deniz omurgasızları ve mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Bunlar arasında deniz tunikatından izole edilmiş trabectedin (*Ecteinascidia turbinata*), Pasifik porsuk ağacı kabuğundan izole edilmiş paclitaxel (PTX) (*Taxus brevifolia*), Madagaskar deniz salyangozu bitkisinden (*Catharanthus roseus*) izole edilmiş vinblastin ve vincristin, bir bakteriden izole edilmiş daunorubicin ve doxorubicin (*Streptomyces peucetius*) bulunmaktadır (Elrayess ve El-Hak, 2019).

## 2.2. Modern İlaç Keşfi Çalışmalarında Doğal Ürünlerin Rolü

Biyomedikal araştırmanın bir hedefi olan yeni farmasötik ürünlerin keşfi, bilimsel, ekonomik ve sosyal olarak oldukça büyük bir öneme sahiptir. Yeni farmasötik ürünlerin tanımlandığı bir proses olan ilaç keşfi, validasyon, test ve pazarlama çalışmalarının gerçekleştirildiği ilaç geliştirme ile birlikte farmasötik bilimin en önemli faaliyetlerinden birini oluşturmaktadır. 2018 yılında gerçekleştirilen bir çalışma, 2010 ile 2016 yılları arasında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH)'ne sağlanan bütçenin kabaca %20'sinin 210 adet yeni ilaç molekülünün keşfi ve geliştirilmesi çalışmalarına ayrıldığını göstermiştir (Galkina Cleary vd., 2018).

Modern ilaç keşfi çalışmalarında informatik ve hesaplamalı biyoloji alanındaki gelişmeler ile ilaç keşif hattındaki üretkenlik artırılmıştır. Ancak ilaç keşfi alanındaki teknolojik ilerlemelere rağmen, bu çalışmaların büyük ölçüde küçük moleküllere

dayandırılması sebebiyle, yeni terapötik ilaçların onaylanması son yıllarda önemli ölçüde yavaşlamıştır. Örneğin, 1996 ile 2007 yılları arasında, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ilaç olarak onaylanan yeni moleküler yapıların sayısı 50 yıl öncesiyle aynı seviyeye erişmiş olup, yılda 53'ten 17'ye düşmüştür (Munos, 2009).

Kimyasal uzaydaki eşsiz olasılıkların sayısının şu an bilinen evrendeki yıldızların sayısından fazla olduğu düşünülse de bugüne kadar geniş ölçüde araştırılmış olan küçük molekül ilaç adaylarından daha karmaşık yapıların keşfedilmesi için mevcut yöntemler sınırlı kalmaktadır. Klinik önceliği bulunan hastalıkların etiyolojilerinin karmaşık olması sebebiyle potansiyel ilaç adaylarıyla eşleştirilmesinin zorluğu da bu düşüşün bir diğer sebebi olarak görülmektedir. Bu problemlerin doğal ve basit çözümü ise küçük moleküller dışında yeni potansiyel ilaç sınıflarına odaklanmaktır (Romano ve Tatonetti, 2019; Tong ve Deng, 2020).

Antik Mezopotamya'nın sofistike ilaç sistemine kadar dayanan, binlerce yıldır hastalıkların tedavi edilmesi için kullanılan bileşiklerin kaynağını oluşturan doğal ürünlerin bu ihtiyaca cevap verebileceği düşünülmüştür (Dias vd., 2012). Bitki metabolitleri, mikroorganizma sekonder metabolitleri, hayvansal toksinler ve immünolojik bileşenler gibi doğal ürünler, kimyasal sentezle erişilmesi mümkün olmayan, oldukça geniş yapısal ve fonksiyonel çeşitliliğe sahip biyoaktif bileşenlerin kaynağıdır (Romano ve Tatonetti, 2019).

Biyomedikal araştırmaların ilaç keşfi çalışmalarında doğal ürünlere yönelik ilgisinin yenilenmesi, ilaç endüstrisinde önemli gelişmelerle sonuçlanmıştır. Uluslararası Farmakope (Ph. Int.)'nin dokuzuncu baskısı kapsamındaki 371 farmasötik maddenin 80'den fazlası doğal ürünler veya doğal ürün türevleri olarak belirtilmiştir (World Health Organization, 2019). 1981 ile 2014 yılları arasında onaylanan toplam 1562 yeni ilacın %69'unun doğal kökenli veya doğal ürün türevleri olduğu bildirilmiştir (Newman ve Cragg, 2016). 2019 yılında FDA tarafından onaylanan 48 ilacın 10'unun doğal ürün kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (de la Torre ve Albericio, 2020).

### 2.2.1. Hayvansal venomlardan ilaç keşfi

Venom, bir hayvanda özel bir bezde üretilen, üreten hayvanın beslenme veya savunmasını kolaylaştırmak için normal fizyolojik veya biyokimyasal süreçleri bozan moleküller içeren ve bir yara açılarak hedef hayvana verilen salgı olarak tanımlanmaktadır (Fry vd., 2009). Venom içeren hayvanlar dünya üzerinde hemen hemen her kıtada, her iklimde ve hava, su ve toprak olmak üzere tüm alanlarda yayılım göstermektedir. Bu hayvanların, bu kadar çeşitlilik içinde yayılım göstermesinin en temel sebebi ise; bu mekanizmanın evrimsel olarak av-avcı ilişkisinden doğmuş olması, yani av olacak olan venomöz hayvanın avcısını hareketsiz hale getirip kaçmak veya avcı olarak avını öldürmek veya hareketsiz hale getirmek amacıyla geliştirdiği bir sistem olmasıdır. Bu durum, venom sistemine sahip olmanın sağladığı ekolojik avantajın kanıtı olarak değerlendirilmektedir.

Evrimsel süreçte, venom içeriği 8 farklı filumda bağımsız olarak en az 100 defa evrimleşmiştir (Schendel vd., 2019). Dünya üzerinde hayvan biyoçeşitliliğinin yaklaşık %15'ini temsil eden annelidler, sölenler (deniz anemonu, deniz anası, hidra), ekinodermiler (deniz keşanesi ve yıldızı), yumuşakçalar (koni salyangozu ve ahtapot), eklembacaklılar (örümcek, karınca, kırkayak, arı, yaban arısı, akrep, sivrisinek, kene) gibi omurgasızlardan balık, kurbağa, yılan, kertenkele, kuş ve memeliler gibi omurgalılara kadar uzanan çeşitlilikte 220.000'den fazla venomöz tür olduğu tahmin edilmektedir (Herzig vd., 2020).

Hayvansal venomların bileşimi her hayvanda değişiklik göstermektedir. Ancak çoğu venom yüzlerce hatta binlerce birbirinden farklı protein (>10 kDa), peptid (2-10 kDa), düşük moleküler ağırlıklı organik moleküller ve inorganik tuzlardan oluşmuş bir biyoaktif moleküller birleşimidir (King, 2011). Venom içeren sayısız hayvan olduğu ve her birinin venom içeriğinin birbirinden farklı olduğu göz önüne alındığında, henüz keşfedilmemiş binlerce biyoaktif molekülü içeren olağanüstü büyüklükte bir kütüphane bulunmaktadır (Prashanth vd., 2017). Üstelik venom üretiminin yüksek metabolik maliyeti, evrimsel süreç boyunca yalnızca en etkili bileşenlerin seçimini sağlamıştır. Bu sebeple venomların oluşturduğu doğal biyoaktif bileşen kütüphanesinin yüksek oranda optimize edildiği düşünülebilmektedir (Morgenstern ve King, 2013).

Venomöz türlerin son derece farklı filetik kökenleri ve aynı şekilde hedef organizmalarının çeşitliliği göz önüne alındığında, venom toksinlerinin son derece çeşitli moleküler hedefleri modüle etmesi beklenmektedir. Venomöz hayvanlar, avın yakalanmasını veya avcılara karşı savunmayı kolaylaştırmak amacıyla sinir, kas-iskelet veya kardiyovasküler sistemlerden birini veya hepsini hedefleyen toksinler geliştirerek kurbanlarının doğal biyolojik karmaşıklığından faydalanmıştır (King, 2011).

Çoğu venom avına veya avcısına parenteral olarak diken, diş, iğne, kıskaç, zıpkınlar yoluyla verilmektedir. Dolayısıyla venom protein ve peptidleri, degrade olmadan ve vücuttan atılmadan, etki edecekleri bölgeye ulaşana kadar stabilitelerini korumak zorundadır (Fry, vd., 2009; King, 2011). Bu baskı, venomda proteazlar tarafından degradasyona dirençli olan oldukça kararlı moleküler yapıların bulunması ile sonuçlanmıştır. Sonuç olarak venom proteinlerinin büyük bir çoğunluğu bir veya daha fazla disülfid köprüsüne ve iyi tanımlanmış tersiyer yapılara sahiptir (Mouhat vd., 2004).

Sonuç olarak venom protein ve peptidlerinin etkinliği, özgüllüğü ve stabilitesi, bu molekülleri ilaç keşfi için değerli bir doğal ürün kaynağı haline getirmiştir.

### **2.2.2. Farmasötik ürünler olarak venom bileşenlerinin başarısı**

Tarihsel olarak bakıldığında, ham venomlar, memeli biyolojik sistemleri üzerindeki güçlü etkileri nedeniyle astım, kanser, çocuk felci, multipl skleroz gibi geniş bir hastalık yelpazesinin tıbbi tedavisi için kullanılmıştır (King, 2011). Bununla birlikte, terapötiklerin geliştirilmesine öncülük eden venom veya venom bileşenlerinin araştırılması yalnızca son on yıllarda önemli bir ivme kazanmıştır. Bu anlamda en iyi bilinen başarı öykülerinden biri kaptoprildir. Nitekim kaptoprilin ticari başarısı, venomlardan ilaç geliştirilmesi kavramının temelini atmıştır (Pennington vd., 2018).

Kaptopril, hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, diyabetik nefropati ve miyokard sonrası enfarktüslerin tedavisinde kullanılan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörlerinin kurucu üyesi olarak keşfinden bu yana kan dolaşımı fizyolojisinde ACE'ların rolünün aydınlatılmasını sağlamış ve pek çok hayat kurtarmıştır. Bradikinin-güçlendirici peptid olarak adlandırılan kaptoprilin peptidik prekürsörü, Brezilya engerek



yılanı *Bothrops jararca* venomundan izole edilmiştir (Ferreira vd., 1970; Linz vd., 1995). Bradikinin ve anjiyotensin I'in degradasyonunu bozan yılan venom peptidleri ailesine ait olan bu peptid, envenomasyon sonrasında önemli ölçüde hipotansiyona sebep olmaktadır. Bu biyolojik etki, nihai olarak ACE inhibitörleri olarak adlandırılan küçük molekül analogların tasarlanması için kullanılmıştır (Ondetti vd., 1977; Camargo vd., 2012).

Benzer şekilde epifibatid ve tirofiban, koagülasyonu ve pıhtı oluşumunu önlemek amacıyla glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) integrin reseptörleri üzerinde etkili peptidik yılan zehiri öncülerinden geliştirilmiştir. Epifibatid, cüce çingiraklı yılan olarak da adlandırılan *Sistrurus miliarus barbour*'dan ekstrakte edilen daha büyük barbourin peptidinin işlevini taklit eden kimyasal olarak sentezlenmiş siklik bir heptapeptittir (Scarborough vd., 1993). Tirofiban ise çöl engereği olarak bilinen *Echis carinatus* venomunda bulunan 49 a.a. uzunluğundaki echistatin peptidi baz alınarak sentezlenmiş küçük bir moleküldür (Gan vd., 1988). Klinikte akut koroner hastalığı olanlarda ve koroner operasyon geçiren hastalarda kullanılmaktadır (King vd., 2016).

Avrupa'da oldukça popüler olan medikal sülük tedavisi sırasında hasta kanının pıhtılaşmadığının fark edilmesi üzerine gerçekleştirilen biyokimyasal analizler ile hayvanın tükürüğünden izole edilen hirudin peptidi (Markwardt, 1955), kan pıhtılaşma enzimi trombinin son derece güçlü bir inhibitörüdür. Yapısı tamamen aydınlatıldıktan sonra, hirudin peptidi üzerinde gerçekleştirilen iki küçük modifikasyonla lepirudin peptidi, rekombinant olarak üretilmiş ve enjeksiyonluk ilaç olarak pazara sunulmuştur (Petros, 2008). Üretici firma tarafından üretimi durdurulduktan sonra, hirudin peptidi baz alınarak tasarlanan diğer bir hirudin sentetik analogu bivalirudin, 2000 yılında FDA tarafından perkütan koroner anjiyoplasti geçiren hastalarda antikoagülan olarak kullanılmak üzere onaylanmıştır (Warkentin vd., 2008).

Nörolojik hedefler üzerinde etkili olan venom bileşenleri de başarıyla farmasötik pazara girmiştir. Büyülü koni de denilen bir deniz salyangozu olan *Conus magus* venomundan izole edilen  $\omega$ -konotoksin MVIIA peptidinin sentetik analogu zikonotid (SNX-111), N-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanallarının ( $Ca_v2.2$ ) oldukça spesifik alt tip-seçici bir inhibitörüdür. 25 a.a. uzunluğundaki bu peptid, omurilikte pro-nosiseptif

nörotransmitter salımını inhibe ederek ağrının iletimini engelleyerek aktivitesini göstermektedir (McGivern, 2007).

Dünya üzerindeki nadir venomöz kertenkelelerden biri olan Gila canavarı da denilen *Heloderma suspectum* venomundan ise exendinler adı verilen bir grup peptid izole edilmiştir (Eng vd., 1992). Bu peptidlerden exendin-4, glukagon-benzeri peptid 1 (GLP-1) ile gösterdiği yüksek yapısal benzerlik ve proteaz direnci sebebiyle tip 2 diyabetin tedavisi için geliştirilmiştir. Peptid, GLP-1 reseptörlerine bağlanarak insülin salımını uyararak aktivite göstermektedir. Sentetik analogu exenatid 2005 yılında FDA onayı almış ve farmasötik pazara girmiştir. Bunu takiben, stabilitesi ve salım özellikleri değiştirilmiş türevleri de farklı firmalar tarafından geliştirilerek onay almıştır (Furman, 2012; Elkinson ve Keating, 2013; Pennington, vd., 2018).

İlaç keşfi için venomların sahip olduğu potansiyele rağmen, venom içeriğindeki kimyasal çeşitlilik çok büyük ölçüde keşfedilmeyi beklemektedir. Biyoaktif peptid keşfini ve venom bileşiminin karakterizasyonunu kolaylaştırarak venom tabanlı ilaç keşfi çalışmalarını, analiz teknolojilerindeki devam eden ilerlemelerin hızlandıracağı düşünülmektedir (Vetter vd., 2011).

### 2.3. Bal Arısı

Var oluşları Mezozoik çağdaki Kretase dönemine kadar uzanan ve günümüzde yaklaşık 20.000 türü bulunan arılar, kapalı tohumlu bitkilerin döllenmesini sağlayan böceklerin en önemli grubu olarak değerlendirilmektedir. İnsan diyetinin üçte birinin hayvan kaynaklı tozlaşmaya dayanan meyveler, sebzeler ve tohumlardan oluşması sebebiyle ayrıca büyük bir ekonomik öneme sahiptir (Klein vd., 2007).

Günümüzde var olan arılar, hayvanlar aleminin Arthropoda şubesi, Hymenoptera takımına ait olup 7 aileye ayrılmaktadır. Hem morfolojik hem de moleküler verilere göre açıkça monofiletik bir grup olduğu belirlenmiştir (Michener, 2007). 5.700'den fazla tanımlanmış tür ile arıların en büyük ailesini Apidae familyası oluşturmaktadır. Bal arıları ise sadece bu familyanın altında yer alan *Apis* cinsine aittir (Danforth vd., 2013).

Çizelge 2.1. Klinik kullanım için onaylanmış venom peptidleri veya türevleri

Venom peptidin izole edildiği tür	Etken peptid	Ticari adı	Etki mekanizması	Endikasyonu	Onay durumu/ yılı
<i>Bothrops jararaca</i>	Kaptopril	Capoten®	ACE inhibitörü	Hipertansiyon	FDA, 1980
<i>Sistrurus miliarius barbour</i>	Epifibatid	Integrilin®	Fibrinojenin GPIIb/IIIa reseptörüne bağlanmasını inhibe eder	Akut koroner sendrom	FDA, 2001
<i>Echis carinatus</i>	Tirofiban	Aggrastat®	GPIIb/IIIa reseptörüne bağlanan fibrinojen antagonisti	Akut koroner sendrom	FDA, 1999
<i>Hirudo medicinalis</i>	Lepirudin	Refludan®	Direk trombin inhibitörü	Venöz trombozın engellenmesi, Antikoagülan	FDA, 1998
<i>Hirudo medicinalis</i>	Bivalirudin	Angiomax®	Geri dönüşümlü direk trombin inhibitörü	Venöz trombozın engellenmesi, Antikoagülan	FDA, 2000
<i>Hirudo medicinalis</i>	Desirudin	Iprivask®	Geri dönüşümsüz trombin inhibitörü	Venöz trombozın engellenmesi, Antikoagülan	FDA, 2003
<i>Conus magus</i>	Zikonotid (SNX-111)	Prialt®	Voltaj kapılı kalsiyum kanalı (Cav2.2) blokleri	Kronik ağrı	FDA, 2004
<i>Heloderma suspectum</i>	Exenatid	Byetta®	GLP-1 reseptör agonisti	Tip 2 diyabet	FDA, 2005
<i>Heloderma suspectum</i>	Exenatid, salımı uzatılmış	Bydureon®	GLP-1 reseptör agonisti	Tip 2 diyabet	FDA, 2014
<i>Heloderma suspectum</i>	Lixisenatid	Lyxumia® ve Adlyxin®	GLP-1 reseptör agonisti	Tip 2 diyabet	FDA, 2016

*Apis* cinsine ait 10 adet bal arısı türü mevcuttur. Çekirdek DNA'sı ve mitokondriyal DNA (mtDNA) belirteçlerine dayanılarak gerçekleştirilen filogenetik analizlere göre bal arıları; kavitelere yuva yapan arılar (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nulensis*), dev arılar (*A. dorsata*, *A. laboriosa*, *A. binghami*, *A. nigrocincta*) ve cüce arılar (*A. florea*,

*A. andreniformis*) olmak üzere birbirinden belirgin ölçüde farklılık gösteren 3 ana gruba ayrılmaktadır (Arias ve Sheppard, 2005; Raffiudin ve Crozier, 2007). *A. mellifera* dışındaki diğer türlerin hepsinin yayılışı Asya ile sınırlıdır. Ekonomik, tarımsal ve çevresel öneme sahip bir tür olan ve Avrupa bal arısı veya batı bal arısı olarak bilinen *A. mellifera*, arıcılık faaliyetleri ile şu an bütün dünyaya yayılmış olsa da doğal yayılışı Avrupa, Asya ve Orta Doğu'yu kapsayacak genişliktedir (Han vd., 2012; Danforth, vd., 2013).

### 2.3.1. Bal arılarının coğrafi dağılışı ve ırklaşma

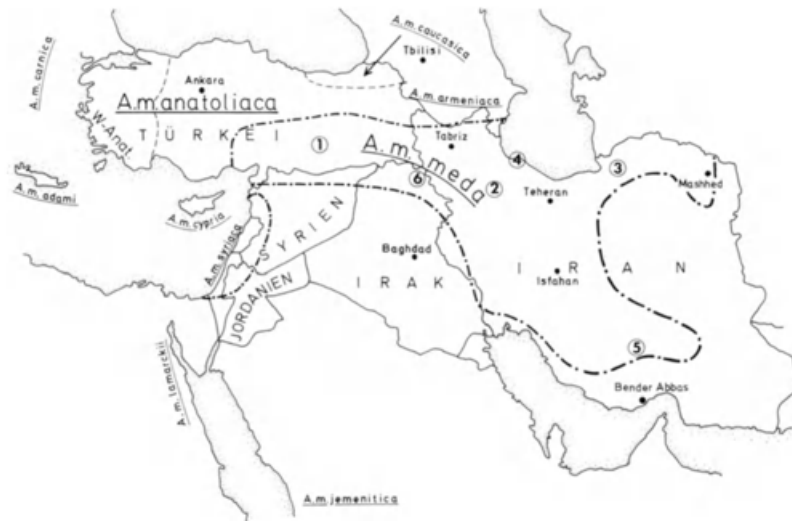
*Apis mellifera* türünün, kuzeyde güney İskandinavya'dan güneyde Ümit Burnu'na, batıda Dakar'dan Urallar'a, Meşhed'e ve doğuda Umman kıyılarına kadar uzanan, çok geniş bir coğrafyada yayılış göstermektedir (Ruttner vd., 1978). Bu kadar geniş bir coğrafyaya yayılmış olan türün coğrafi izolasyonlardan ve ekolojik adaptasyonlardan köken alan pek çok farklı "tipi" bulunduğu, ancak bunların birbiriyle tüm doğurganlıkla melezlenebildiği yani tek bir türe ait olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (Ruttner, vd., 1978). 20. yüzyılın başında bu tiplerin çeşitliliğini anlatmak üzere trinomial bir sistem tanımlamıştır (Buttel-Reepen, 1906). Biyolojide kabul gören nomenklatüre uygun olarak; ilk iki ismin sırasıyla cins ve tür ismi (*Apis mellifera*), üçüncü ismin ise coğrafi ırk veya varyeteyi belirlemek için kullanılması (*Apis mellifera ligustica*) önerilmiştir. Başlarda "coğrafi ırk" tanımı sadece renk ve büyüklük ile yapıldığından oldukça belirsiz olmasına karşın, biyometrik ölçüm kavramının ve yeni morfolojik karakterlerin ırk tanımlaması amacıyla kullanılmaya başlamasından sonra bu sorun aşılmıştır (Goetze, 1940; Alpatov, 1948). Bu çalışmalarda kullanılan az sayıda karakter, Avrupa ırklarını tanımlamakta yeterli olsa da *Apis mellifera*'nın doğal yayılışı göz önüne alındığında yetersiz kalmış, 1978 yılında yeni karakterler tanımlanarak Afrika, Avrupa ve Orta Doğu'daki ırklar 3 ana kol tanımlanarak birbirinden ayrılmıştır (Ruttner, vd., 1978).



Şekil 2.2. *Apis mellifera* ırklarının ve evrimsel kollarının Avrupa'daki yaklaşık olarak dağılımı (De la Rúa vd., 2009).

Bunlar Afrika ırklarını (*A. m. lamarckii*, *A. m. yemenitica*, *A. m. litorea*, *A. m. scutellata*, *A. m. monticola*, *A. m. adansonii*, *A. m. unicolor*, *A. m. capensis*) içeren A kolu; kuzey Avrupa (*A. m. mellifera*), İspanya ve Portekiz (*A. m. iberica*) ve kuzey Afrika (*A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis*, *A. m. major*) ırklarını içeren M kolu; doğu Avrupa, kuzey Akdeniz ve Orta Doğu'daki ırkları kapsayan C kolu olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.2.). Takip eden çalışmalarla C kolu, C ve O olmak üzere iki kola ayrılmıştır. İtalya (*A. m. ligustica*), Avusturya ve Yugoslavya (*A. m. carnica*), kuzey Yunanistan ve Bulgaristan (*A. m. macedonica*), güney Yunanistan (*A. m. cecropia*) ve Sicilya (*A. m. sicula*) bölgelerindeki ırklar C kolunu oluşturmaktadır; Kafkaslar (*A. m. caucasica*), Ermenistan (*A. m. armeniaca*), İran, Irak, Suriye ve Türkiye (*A. m. meda*), Türkiye (*A. m. anatoliaca*), Suriye (*A. m. syriaca*), Kıbrıs (*A. m. cypria*) ve Girit (*A. m. adami*) bölgelerinde bulunan ırklar O kolunda bulunmakta ve tür için bazal grubu oluşturmaktadır (Ruttner, 1988; 1992; Arias ve Sheppard, 1996). Ekolojik, fizyolojik ve davranışsal özellik analizlerine ek olarak takip eden morfometrik ve genetik çalışmalar sonucunda ise günümüzde *A. mellifera*'nın 4 ana kola ayrılmış olan 29 alt türü veya ırkının bulunduğunu göstermektedir (Ruttner, 1988; Engel, 1999; Franck vd., 2001; Sheppard ve Meixner, 2003; Miguel vd., 2011).

Anadolu coğrafyasında ise birbirinden farklı ırkların yüksek morfolojik farklılık göstererek evrimleştiği ve bölgenin bu ırkların genetik merkezi olduğu ileri sürülmüş (Ruttner, 1988); daha sonra bu görüş genetik (allozim varyasyonları, mtDNA ve tüm genom dizilemesi ile SNP analizi) ve morfometrik çalışmalarla desteklenmiştir (Kandemir ve Kence, 1995; Kandemir vd., 2000; Kandemir vd., 2006; Han vd., 2012; Wallberg vd., 2014). Türkiye'yi içine alan bu bölgede doğu Karadeniz kıyısı boyunca *A. m. caucasica*, Trakya bölgesinde *A. m. carnica*, güneydoğuda *A. m. meda*, güney sınırında *A. m. syriaca* olmak üzere geri kalan tüm bölgelerde *A. m. anatoliaca* ırkları çeşitli ekotipleri ile yayılış göstermektedir (Şekil 2.3.) (Ruttner, 1988; Smith vd., 1997; Guler, 2010; Tozkar vd., 2015).



Şekil 2.3. Anadolu'da yayılış gösteren bal arısı ırklarının dağılımı (Ruttner, 1988).

### **2.3.1.1. *Apis mellifera anatoliaca***

Anadolu bal arısı olarak da isimlendirilen *Apis mellifera anatoliaca*, Türkiye'nin kuzeydoğu ve güneydoğusu dışında kalan Orta Anadolu bölgesinde yayılış göstermektedir. Orta Anadolu bölgesinde Eskişehir'den Sivas'a, Çankırı'dan Niğde ve Nevşehir'e kadar olan bölge içerisinde dağılım gösteren Anadolu arısı, Orta Anadolu'nun yanı sıra Ege, Akdeniz boyunca ve Karadeniz bölgesinin büyük bir bölümünde de bulunmaktadır (Koca ve Kandemir, 2013; Fuchs vd., 2015). Bunun yanı sıra, Anadolu arısının yayılış gösterdiği coğrafyadaki varyasyonlar sebebiyle bal verimi, morfolojik, fizyolojik ve davranış

özellikleri açısından birbirinden farklı ekotipleri (Muğla ve Orta Anadolu ekotipleri) bulunmaktadır (Sıralı, 2017).

Türkiye’de son 20-30 yıllık bir arıcılık uygulaması olarak, Akdeniz ve Ege bölgelerinde kışlatılan koloniler, yaz ve sonbahar aylarında Orta ve Doğu Anadolu’ya taşınarak gezici arıcılık yapılmaktadır (Özkırım, 2018). Bu uygulamaların Türkiye coğrafyasında yayılış gösteren ırklar arasındaki gen akışını teşvik edebileceği ve Anadolu bal arısı gen havuzunun homojenleşmesine sebep olabileceği düşünülmektedir (Kandemir vd., 2000). Ticari kaygılarla gerçekleştirilen bazı arıcılık uygulamalarının da genetik kirlenmeye sebep olabileceği düşünülmekte, ülkemiz balarısı ırk ve ekotip çeşitliliğinin korunması gerekliliğinin hem günümüz hem gelecek için önemi vurgulanmaktadır (Kence, 2006).

### **2.3.2. Bal arılarında koloni savunması**

Bal arısı (*Apis mellifera*) ösosyal, gerçek sosyal yaşam süren, bir böcektir. Topluluklarının merkezinde; kraliçe (üreme özelliği gösteren tek dişi), damızlıklar (genç işçi arıların bakımını yaptığı), toplayıcı işçi arılar tarafından toplanan nektardan üretilen bal, polen depoları ve ayrıca ilk sürü koloni yuvasına taşındığında yapılan balmumu tarakları olmak üzere koloninin tüm kaynaklarını içeren yuva bulunmaktadır. Bu nedenle, bu yuvayı ve ondan çıkan ana yemleme yollarını savunmak tür için çok önemlidir. Aynı zamanda, koloninin tüm iş gücünü tüketmeden, binlerce arının, potansiyel bir tehdit karşısında etkin bir cevap verebilmek için eylemlerini koordine etmesi gerekmektedir (Nouvian vd., 2016).

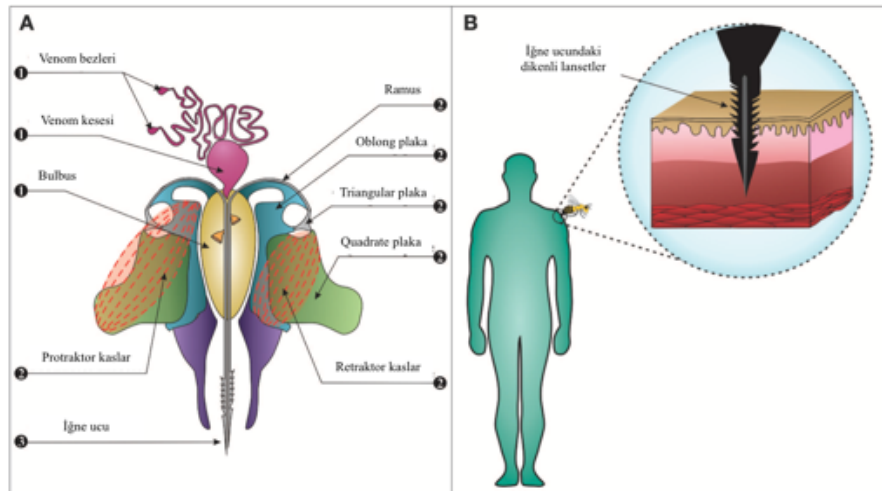
Bal arısı kolonileri, her bireyin farklı yaşlarda farklı görevleri üstlendiği, geçici sosyal sınıflar şeklinde organize olmaktadır. Muhafızlar (guard bee) ve askerler (soldier, stinger) olmak üzere yuvayı savunan iki arı popülasyonu vardır. Diğer ösosyal böceklerin aksine ilginç olarak bal arılarında savunma görevini yapan bu iki arı popülasyonunu diğer arılardan morfolojik olarak ayırmak mümkün değildir. Yuva savunması davranışı arılarda özellikle yiyecek arayışı (foraging) olmak üzere diğer görevlerle çakışmakta, bu sebeple savunma işini gerçekleştiren bireyler sık sık değişmektedir (Nouvian, vd., 2016).

Savunma genellikle kovan içi görevlerden yiyecek arama görevine geçiş aşamasında olan, 2-3 haftalık arılar ile gerçekleştirilmekte ve sayıları işçi popülasyonunun sadece %10-15'ini oluşturmaktadır. Muhafız arılar, bir uyarı olmadığı zaman, ön ayakları havada ve antenleri ileri gösterecek şekilde karakteristik bir duruş sergilerken, uyarıldıklarında alt çeneleri açık ve kanatları açık bir şekilde herhangi bir yabancının üzerine uçmaya hazır bir şekilde kovan girişinde beklerler. Muhafız arılar, kovana gelen arıların kendi kovanlarına mı ait olduğunu kontrol etmek ve koloniyi bir predatör varlığına karşı uyarıdır. Koloni girişindeki muhafız arıların sayısı, o sırada kovanın verdiği savunma cevabının şiddetine göre değişir. Ancak bu arıların çok az bir kısmı sokma cevabına katılır. Dolayısıyla bu arıların görevi genel olarak tehdidin algılanması ve kovanın uyarılmasıdır. Asker arılar olarak isimlendirilen diğer popülasyon ise, genellikle kovana tehdit eden unsuru rahatsız etmekte görevlidir. Kanatlarındaki aşınma diğerleriyle kıyaslandığında çok az olduğundan, bu arıların daha çok kovan içinde vakit geçirdiği düşünülmektedir. Ancak herhangi bir tehdit söz konusu olduğunda hızlıca kovan girişinde lokalize olmaktadır. Bununla birlikte sokmaya yatkınlık genetik faktörler ve yaş ile belirlenmektedir (Nouvian, vd., 2016).

Kovan, kovana ait olmayan diğer bal arılarına, oportünistik karıncalara, *Varroa destructor*, balmumu güvesi, kovan böceği gibi parazitik böceklere ve predatörleri olan eşek arılarına, kuş, fare, rakun, ayı ve insan gibi daha büyük predatörlere karşı korunmaktadır. Böcek düşmanlarının sert kütikula tabakası sebebiyle genellikle sokarak değil farklı türde geliştirdikleri davranışlarla kovana savunmaktadır. Diğer büyük predatörlere karşı kovan savunmasında muhafız arılar ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Kovan yakınındaki olası tehditleri fark etmek için uçarlar ve genellikle koyu renkler, hızlı hareketler, memeli kokuları ve pürüzlü dokular tarafından tetiklenirler. Muhafız arılar, büyük predatörlere karşı savunmada tek başlarına yeterli olmadıklarından predatörle karşılaştıklarında bir kısım muhafız arı direk tehdit üzerine uçarken, diğer kısmı iğnesini çıkarıp, abdomenini kaldırıp, alarm feromonlarını yaymak üzere kovan içinde kanat çırpmaya başlar ve kolonideki diğer arıları savunmaya çağırır. Savunma görevine katılan diğer işçi arılar etraftaki potansiyel tehditi aramaya başlarlar. Hareketten ve diğer arıların hedef üzerinde bıraktıkları feromondan direk olarak uyarılarak harekete geçerler. Çoğunun verdiği ilk tepki sokmak olmayıp, etrafında uçup rahatsız edici bir ses çıkaracak şekilde kanat çırparak predatörü tehdit etmektir (Nouvian, vd., 2016).



Memeli dokusu elastik olduğu için, sokma esnasında, sokma aparatı (venom kesesini içerir) (Şekil 2.4.) ve ilişkili kas grubu iğne üzerindeki dikenli lansetler ve abdomenin diğer kısmıyla olan zayıf bağlantısı sebebiyle yara üzerinde kalırken arının kendisi ayrılır. Bu, yaraya enjekte edilen venom miktarını artırarak tek bir sokmanın çok sayıda enjeksiyona eş değer olmasını sağlamaktadır. Sakatlanan arının ölümüyle sonuçlanan bu fenomene ototomi denir ve üreme yeteneği olmayan tek bir işçi arı kaybının türün üreme başarısı açısından etkisiz olduğu ösosyal böcekler arasında görülmektedir. Bununla birlikte, yaygın inanışın aksine, sokma aparatını kaybeden arı hemen değil 18-114 saat sonra ölmekte ve bu süre içinde kovan savunmasına takip ederek ve rahatsızlık vererek katkıda bulunmaktadır.



Şekil 2.4. Bal arısının sokma aparatı. A) Venom aparatının oluştuğu 3 fonksiyonel bölüm; venom ile ilişkili kısım, motor kısım, delici kısım, sırasıyla 1,2,3 olarak şekil üzerinde gösterilmiştir. B) İğne ucundaki dikenler, sokma aparatını deriye sabitler ve geri çıkmasına izin vermez. (Pucca vd., 2019)

Ortalama olarak bir arının sokması ile 140 – 150 µg venom enjekte edilmektedir. İnsan için bal arısı venomunun medyan lethal dozu (LD<sub>50</sub>) 2,8 – 3,5 mg venom/kg olduğu için alerjisi olmayan ortalama ağırlıkta bir insanın 1.000 – 1.500 arı tarafından aynı anda sokulması ile %50 ölme şansının olduğu söylenebilmektedir (Pucca, vd., 2019). Ancak yine de sokmanın şiddeti yaş, vücut ağırlığı, sokma sayısı ve kurbanın fizyolojik karakteristiklerine bağlı olarak değişebilmektedir (Toledo vd., 2018).

### 2.3.3. Bal arısı venomu

Bal arısının abdominal kavitesinde bulunan venom bezinde üretilen, predatörlerine karşı bir savunma aracı olarak kullanılan arı venomu veya apitoksin, 4,5 – 5,5 pH değerinde, kokusuz, şeffaf bir sıvıdır. Pek çok biyolojik aktivitesi rapor edilmiş bileşenlerin kompleks bir karışımıdır. Bileşiminde amino asitler (amino-bütirik asit,  $\alpha$ -amino asitler), peptidler (melittin, apamin, adolapin, mast hücresi degranüle edici peptid, secapin, procamin, proteaz inhibitör peptid, terciapin, ve diğer küçük peptidler), proteinler, enzimler (fosfolipaz A2, hyaluronidaz, fosfomonoesteraz, lizofosfolipaz,  $\alpha$ -glukozidaz), şekerler (glukoz, früktoz), fizyolojik olarak aktif aminler (histamin, dopamin, noradrenalin), uçucu bileşenler, fosfolipidler ve feromonlar bulunan bu kompleks karışımın %80'i sudan oluşmaktadır (Moreno ve Giralt, 2015; Sobral vd., 2016).

2014 yılına kadar 30 adet venom bileşeni tanımlanmış ve bunlardan 16'sı kütle spektrometresi ile doğrulanmış olsa da LC-FT-IR kütle spektrometresi analizi ile gerçekleştirilen çalışmada 83'ü daha önce arı venomunda hiç tanımlanmamış 102 adet protein ve peptidin varlığı gösterilmiştir (Van Vaerenbergh vd., 2014). Arı venomunda en çok bulunan bileşenler ve bunların bulunma yüzdeleri Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Arı venomunda en çok bulunan iki bileşen melittin ve fosfolipaz A2 (PLA2)'dir. Kuru venom ağırlığının %40 – 60'ını oluşturan melittin peptidi, arı venomu içeriğinde en çok bulunan bileşendir. Aynı zamanda bugüne kadar melittinin pek çok biyolojik aktivitesi belirtilmiş, önemli klinik ve terapötik etkileri gösterilmiştir. Ancak diğer yandan arı venomu içeriğindeki en toksik bileşen olarak da değerlendirilmektedir (Raghuraman ve Chattopadhyay, 2007).

Arı venom içeriğinde en çok bulunan ikinci bileşen, kuru ağırlığın yaklaşık %10 – 12'sini oluşturan PLA2 enzimidir. Bu enzim, alerjik hastaların %57 – 97'sinde alerjik duyarlılık yaratan venom bileşimindeki en alerjen faktördür. Arı venomundaki diğer bileşenlerin bulunma yüzdesi çok düşük olmasına rağmen önemli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır.

Çizelge 2.2. Arı venomunda en çok bulunan bileşenler ve venomda ağırlıkça bulunma yüzdeleri (Aufschnaiter vd., 2020).

Molekül sınıfı	Apitoksin bileşeni	Kuru venomda ağırlıkça bulunma yüzdesi (%)
Küçük protein ve peptidler	Melittin	40 – 60
	Apamin	1 – 3
	MCD peptid	1 – 3
	Adolapin	0,1 – 1
	Tertiapin	0,1
	Cardiopep	0,7
	Procamine A, B	1 – 2
	Secapine	0,5 – 2
	Minimine	2 – 3
	Pamine	1 – 3
Enzimler	Fosfolipaz A2	10 – 12
	Fosfolipaz B	1
	Asit fosfomonoesteraz	1
	Hyaluronidaz	1 – 3
	Lizofosfolipaz	1
	$\alpha$ -Glukozidaz	0,6
Aminler	Histamin	0,5 – 2
	Dopamin	0,13 – 1
	Noradrenalin	0,1 – 0,7
Şekerler	Glukoz, fruktoz	2 – 4
Mineraller	Fosfat, kalsiyum, magnezyum	3 – 4

Bunlardan 18 a.a. uzunluğundaki apamin,  $Ca^{+2}$  ile aktive edilmiş  $K^{+}$  kanallarını bloke eden nörotoksik bir peptittir (Mourre vd., 1997). 22 a.a. uzunluğundaki mast hücresi degranüle edici (MCD) peptid kuru ağırlığın %1 – 3'ünü oluşturmakta ve güçlü anti-enflamatuar etkiler göstermektedir (Banks vd., 1990). Secapin peptidinin anti-fibrinolitik, anti-elastolitik ve anti-mikrobiyal özellikleri bulunmaktadır (Lee vd., 2016). Adolapin, anti-enflamatuar ve analjezik etkileri bulunan bir polipeptittir (Shkenderov ve Koburova, 1982). Venom içeriğindeki hyaluronidaz ise ekstraselüler matriks bileşimindeki hyaluronik

asiti degrade ederek diğer bileşenlerin kan dolaşımına nüfuz etmesini sağlamakta, böylece bir “yayılma faktörü” görevi üstlenmektedir. (Marković-Housley vd., 2000).

#### **2.3.4. Bal arısı venomunun terapötik özellikleri**

Arı venomu terapisi veya apiterapi, hastalıkların tedavisi için vücuda arı venomu uygulaması olarak geleneksel Doğu tıbbında M.Ö. 1000 – 3000’den bu yana kronik ağrı, artrit ve romatizma gibi enflamatuar hastalıklar ve bazı deri hastalıklarının tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Son vd., 2007; Zhang vd., 2018). Nitekim sıklıkla arılar tarafından sokulan arıcıların, çok nadiren artrit veya eklem kas hastalıklarından muzdarip olmaları da arı venom terapisini destekleyen bir bulgu olmuştur (Bellik, 2015).

Tamamlayıcı ve alternatif tıp yaklaşımı olarak, doğrudan arı sokma aparatının kasa uygulanması, ekstrakte edilen venomun vücuda enjeksiyonu veya arı venomu akupunkturu şeklinde uygulanmaktadır. Akupunktur yönteminde arı venomu, canlı arı veya enjeksiyonla akupunktur noktalarına uygulanmaktadır. Bu yöntemin hem akupunktur noktalarının mekanik uyarımı hem de venom içeriğindeki biyolojik olarak aktif moleküllerin etkisi sebebiyle daha etkili olduğu düşünülmektedir (Zhang, vd., 2018).

Giderek artan sayıda kanıt, arı venom terapisinin anti-enflamatuar, anti-apoptotik, anti-fibroz, anti-artroskleroz etkilere sahip olduğunu göstermiş ve mekanizmaları detaylıca incelenmiştir (Son, vd., 2007; Sobral, vd., 2016; Zhang, vd., 2018). Son yıllarda, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), multipl skleroz (MS) ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların ve dolaşım bozukluklarının tedavisinde etkili olabileceğini öneren çalışmalar yayınlanmıştır (Zhang, vd., 2018). Bunun yanında anti-fungal, anti-mikrobiyal, anti-viral (Bellik, 2015; Wehbe vd., 2019), radyoprotektif (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2009) etkileri de gösterilmiştir. Arı venomunun diğer terapötik özelliklerine olduğu gibi anti-kanser özellikleri de son yıllarda ilgi odağı olmuş ve yaygın olarak çalışılmıştır (Oršolić, 2012).

### **2.3.4.1. Bal arısı venomu ve melittinin anti-kanser özellikleri**

Bugüne kadar elde edilen çok sayıda bulgu arı venomunun, hepatoselüler karsinom (Hu vd., 2006), servikal karsinom (Ip vd., 2008b; Kim vd., 2020), melanoma (Liu vd., 2002; Tu vd., 2008), prostat (Park vd., 2011), akciğer (Jang vd., 2003; Choi vd., 2014; Kollipara vd., 2014), kolon (Zheng vd., 2015), meme (Oršolić vd., 2003; Ip vd., 2008a), ovaryum (Jo vd., 2012), mesane kanseri (Jo, vd., 2012) ve lösemi (Moon vd., 2006) dahil olmak üzere pek çok farklı insan kanser hücre hattı üzerinde ilgi çekici anti-kanser etkileri olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar arı venomunun anti-kanser etkisinin apoptoz, nekroz, sitotoksisite ve proliferasyonun inhibisyonu gibi mekanizmalar aracılığı ile olduğunu göstermiştir. In vitro çalışmaların yanı sıra in vivo çalışmalar ile de solid tümörlerin büyümesi ve metastazının inhibe edildiği gösterilmiştir (Liu, vd., 2002; Oršolić, vd., 2003; Huh vd., 2010). Genel olarak, arı venomu kanser tedavisi için umut verici bir kaynak olarak görülmektedir. Bununla birlikte arı venomunun anti-kanser etkinliği büyük ihtimalle melittinin sinerjik etkisinden kaynaklandığından, bu anti-kanser peptid ham arı venomu yerine daha iyi bir seçenek olarak görülmektedir (Oršolić, 2012).

Melittin, 26 a.a. uzunluğunda, suda çözünebilen, lineer, katyonik ve amfifilik bir peptittir. N-terminal bölgesi 4 pozitif yük içerdiğinden hidrofobik, C-terminal bölgesi 2 pozitif yük içerdiğinden hidrofilik olup fizyolojik pH'da toplamda 6 pozitif yük ile yüklüdür. Kapalı kimyasal formülü  $C_{131}H_{228}N_{38}O_{32}$  olan melittinin moleküler ağırlığı 2847,5 Da'dur (Habermann, 1972). Yapılan çalışmalar melittinin tüm prokaryotik ve ökaryotik hücre zarlarını seçici olmayan bir şekilde fiziksel ve kimyasal olarak hasara uğratabilecek şekilde etki gösteren bir sitolitik peptid olduğunu göstermiştir. Negatif yüklü hücre membranı yüzeyine bağlanarak, fosfolipid tabakada por oluşumuna ve sonuçta hücre lizisine sebep olmaktadır. Kanser hücrelerinin membran potansiyelinin normal hücrelere kıyasla daha yüksek olması ve por oluşumuna karşı direnç oluşturma olasılığının düşük olması sebebiyle, melittin, anti-kanser uygulamalar için ilgi çekici bir alternatif olarak görülmüştür (Schweizer, 2009). Bunun yanında melittinin sadece hücre zarı hasarına sebep olmadığı, endositoz yoluyla sitoplazmaya alındığı ve çeşitli hücre içi hedefleri etkilediği bildirilmiştir (Kohno vd., 2014).

Çok sayıda çalışma, artmış hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu, ölüm reseptörleri (DR) ekspresyonunda artış, mitokondri-aracılı apoptoz yolağının ve IRE- $\alpha$  (inozitol-gerektiren kinaz-  $\alpha$ )-aracılı katlanmamış protein cevabı (UPR) yolağının aktivasyonu, NF- $\kappa$ B ve Akt sinyal yolaklarının inaktivasyonunun melittin ile indüklenen apoptoza eşlik eden mekanizmalar olduğunu göstermiştir (Chu vd., 2007; Moon vd., 2008; Wang vd., 2009; Fan vd., 2014; Kong vd., 2016). Aynı zamanda melittinin Rac1, ERK, JNK down-regülasyonu, MMP-9 ekspresyonu inhibisyonu, PI3K/Akt/mTOR yolağı inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalarla invazyon ve metastaz üzerinde potansiyel olarak etkili olduğu gösterilmiştir (Liu vd., 2008; Jeong vd., 2012; Jeong vd., 2014). Bunun yanında melittinin tümörlerde VEGF ekspresyonunu inhibe ederek potansiyel bir anti-anjiyojenik etkiye sebep olduğu gösterilmiştir (Huh vd., 2012; Shin vd., 2013; Zhang vd., 2016). Tüm bunların yanında melittinin kanser hücrelerinin büyümesini, hücre döngüsü ilerleyişini farklı evrelerde durdurarak engellediği de literatürde rapor edilmiştir (Zhang vd., 2014; Wu vd., 2015; Tipgomut vd., 2018).

Birden çok in vitro ve in vivo çalışma melittinin proliferasyon, apoptoz, metastaz, anjiyogenez ve hücre döngüsü gibi kanser hücrelerinin hücre fonksiyonları üzerinde çeşitli etkileri olduğunu göstermiştir. Kanser tipine bağlı olarak bu süreçlerin düzenlenmesinde çeşitli sinyal yolakları, genler ve moleküller aktive olmuş veya modüle edilmiştir. Sonuç olarak, melittinin anti-kanser etkisini çeşitli kanser hücresi ölüm mekanizmaları aracılığıyla göstermesi sebebiyle terapötik bir peptid olarak faydalı olabileceği düşünülmektedir (Liu vd., 2016).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında kullanılan materyal ve yöntemler bu bölüm kapsamında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

#### 3.1. Ham Venom Eldesi

Tez çalışması süresince kullanılan ham venom, daha önce genetik yapısı Wallberg vd. (2014) tarafından detaylı olarak çalışılmış olan ve Orta Anadolu Arısını (*A.m. anatoliaca*) Belirleme, Koruma ve Yaygınlaştırma Projesi (TAGEM/12/AR-GE/15) kapsamında ANG Vakfı ve Macahel A.Ş. işbirliği ile belirlenmiş ve izole edilmiş olan *Apis mellifera anatoliaca* ırkı bal arılarından elde edilmiştir. Ham venom, ANG Vakfı Orta Anadolu Ana Arı Üretim Tesisi Arılığ, Ankara'da (40°14'11.5"N 32°41'10.3"E izole olarak bulunan *Apis mellifera anatoliaca* bal arılarının saf damızlık erkek kolonilerinden ve ANG Vakfı Orta Anadolu Arılığ, Ankara'da (40°18'06.1"N 32°24'35.3"E) bulunan bal yapan kolonilerden elektriksel stimülasyon yoluyla sağılarak elde edilmiştir. Sağımın sonra elde edilen ham venom Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı'na taşındıktan sonra, içeriğindeki protein ve peptidler elde edilmiş ve ileri çalışmalar için depolanmıştır.

##### 3.1.1. Arılardan ham venom eldesi

Ham venom eldesi, arıların aktif olarak uçuş yaptığı temmuz ve ağustos aylarında gerçekleştirilmiştir. Arılardan ham venom eldesinde Benton vd. (1963) tarafından önerilen elektriksel stimülasyonla sağma yöntemi, üzerinde ufak modifikasyonlar yapılarak takip edilmiş ve tez çalışması kapsamında bir venom toplama aparatı tasarlanmıştır. Sağım sırasında standart bir arı kovanının ölçülerine göre tasarlanan venom toplama aparatı, kovan uçuş tahtasına yerleştirilmiştir. Venom toplama tablası üzerine alternatif olarak yerleştirilmiş olan paslanmaz çelik tellerden, devre 2 saniyelik aralıklarla 2 saniye boyunca durdurulacak şekilde (2sn/2sn), 1 saat süreyle 12 V akım geçirilmiştir. Bu sırada tellerin üzerine konan arılar ile devre tamamlanmış, kısa bir süre elektrik ile uyarılmış ve tellerin altında bulunan cam hazne üzerine bir miktar venom bırakmıştır. İşlem sonunda, venom

toplama aparatının cam haznesi çıkarılmış ve üzerinde beyaz kristaller halinde kurumuş olan venom, yüzeyden bir jilet yardımı ile kazınarak mikrosantrifüj tüp içinde toplanmıştır. Tüpler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanana kadar laboratuvara buz üzerinde transfer edilmiştir. Sağılacak her bir kovan için cihaz %70 etil alkol ve saf su ile temizlendikten sonra bu işlemler tekrar edilmiştir. Venom bezindeki venomun yenilenebilmesi için her kovan minimum 48 saat aralıklarla işleme alınmıştır (Owen, 1978).

### **3.1.2. Peptid karışımı eldesi, miktar tayini ve saklanması**

Çalışmalarda kullanılmak üzere stoklardan alınan ham bal arısı venom örnekleri, distile su içinde çözüldükten sonra 15 dakika süresince  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir (Hettich, Micro 200R). Santrifüj sonrasında peptid bileşenleri içeren süpernatant alınarak vakum konsantratörde kurutulmuş (Labconco, Centri Vap Concentrator) ve ileriki çalışmalarda kullanılıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır (Caliskan vd., 2006).

HPLC ayırım çalışmalarında cihaza yüklenecek miktarlar hassas terazide (SHIMADZU AU X 220) ham venom stoğundan tartım yolu ile elde edilmiştir. Ancak HPLC ile ayırım sonrası terazi ile belirlenemeyecek kadar küçük miktarlarda olan peptid miktarının belirlenmesinde ultraviyole absorpsiyon metodu kullanılacak olup, proteinlerin 280 nm 'de 1 mm'lik dalga yoluna sahip kuartz yol içerisinde 1 absorbans ünitesinin 1 mg/cm<sup>3</sup>'e eşit olduğu kabul edilerek spektrofotometrik olarak (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) veya HPLC kromatogramında elde edilen pik alanları hesaplanarak, çalışmalar için gerekli peptid miktarların ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.2. Peptid Karışımının Kromatografik Yöntemlerle Fraksiyonlarına Ayrılması**

Elde edilen peptid karışımı içeriğinde bulunan peptidler, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile, kullanılan ayırıştırma mekanizmasına bağlı olarak, fraksiyonlar halinde elde edilmiştir.



### 3.2.1. Ters-faz HPLC

Ham venomdan elde edilen peptid karışımı, birincil ayırım için, 0-60%B ters faz gradient metodu kullanılarak, hareketli fazın akış hızı 1ml/dk olacak şekilde ve 60 dakika süresince 230 nm'de absorbans izlenerek fraksiyonlarına ayrılmıştır. Bunun için ESOĞÜ Venom Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan SPD-M20A DAD (Shimadzu) HPLC cihazı ve 250 mm uzunluğunda 5 µm partikül büyüklüğü ve 4.6 mm çapında analitik bir C18 kolon kullanılmıştır (GL Sciences).

Ters faz ayırmalarda; hareketli faz doğrusal gradient olarak uygulanmış, hareketli faz olarak A ve B ile tanımlanan iki farklı çözelti kullanılmıştır. Tampon A çözeltisi; %0.12 (v/v) derişimli trifloroasetik asitin (TFA) sudaki çözeltisi, Tampon B çözeltisi; %0.10 (v/v) derişimli trifloroasetik asitin asetonitril içindeki çözeltisi olarak kullanılmıştır.

HPLC kolonuna her ayırma işlemi öncesinde 1-1.5 mg kuru peptid karışımı hassas terazide tartılıp Tampon A içinde çözülerek yüklenmiştir. HPLC ile kromatografik ayırma işlemi sonrası alıkonma sürelerine (retention time,  $R_T$ ) göre elde edilen peptid fraksiyonlar, her bir fraksiyon ayrı tüplerde olmak üzere, kolondan geri toplanmıştır. Ham venomun her bir kromatografik ayırımı sonrası vakum konsantratörde kurutulmuş fraksiyonlar, protein miktar tayinine kadar -20°C'de saklanmıştır (Caliskan vd., 2012).

### 3.2.2. İyon-değişim Kromatografisi

Ters-faz kromatografik mekanizma ile elde edilen fraksiyonun ileri saflaştırılması amacıyla iyon-değişim kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak 10-50% B gradient ayırım metoduyla 40 dakika boyunca 1,5ml/dk akış hızıyla katyon değişim kromatografisi yapılmıştır. Etkin fraksiyondan alınan 0,5mg, 7.5 x 75mm boyutlarındaki TSKgel SP-5PW (Tosoh Bioscience) kolonuna yüklenmiş ve 280 nm'de absorbans izlenerek kromatografik ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. İyon (katyon) değişim kromatografide, çözücü A olarak 1 M asetik asit, çözücü B olarak 2 M amonyum asetat kullanılmıştır (Caliskan, vd., 2012).

İyon değişim kromatografisinden kaynaklanan tuzların uzaklaştırılması için, etken peptid 0-0-60%B gradient ayırım metoduyla yeniden ters faz sıvı kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bunun için C18 ters-faz analitik kolon kullanılmış ve hareketli fazın akış hızı dakikada 1 ml olacak şekilde 70 dakika süresince 230 ve 280 nm'de absorbans izlenerek ayırım gerçekleştirilmiştir. İlk 10 dakika sadece Tampon A çözeltisi kullanılarak, iyon-değişim kromatografisinden kalan amonyum asetat tuzunun peptitten ayırımı gerçekleştirilmiştir (Caliskan, vd., 2012).

### **3.3. Peptid Karışımı ve Majör Fraksiyonların Elektroforetik Profilinin Belirlenmesi**

Proteinlerin tek boyutlu jel elektroforezi, kompleks protein/ peptid karışımlarının saflığının araştırılması, bileşiminde bulunan protein ve peptidlerin moleköl ağırlıklarının ve alt ünitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan analitik bir yöntemdir. Genellikle elektroforetik yöntemler, ham bir protein karışımından belirli bir proteinin saflaştırılması amacıyla konvansiyonel kolon kromatografisi veya HPLC yöntemlerinin ardından uygulanmaktadır.

Tez çalışması kapsamında, denatüre edici sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), ham venomdan elde edilen peptid karışımının bileşiminin belirlenmesi ve HPLC ile elde edilen majör fraksiyonların saflığının kontrol edilmesi amacıyla aşağıda detayları açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3.1. Denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi**

SDS-PAGE yöntemi, ilk defa Laemmli tarafından önerilmiş olan sistem olup (Laemmli, 1970), basit, esnek ve sağlam bir teknik olarak günümüzde de protein/peptid karışımlarının ayrılması amacıyla en birincil araç olarak kullanılmaktadır.

Poliakrilamid jel, cam levhalar arasında, bir ayırma jeli ile üzerine yerleştirilmiş bir yükleme jeli olmak üzere iki ayrı jel olarak hazırlanmıştır. Ayırma jeli, %12 akrilamid/bisakrilamid karışımı, %0,1 SDS, 0,375 M Tris (pH: 8.8), %0,1 APS ve %0,04 TEMED ile hazırlanmış ve cam levhalar arasında polimerizasyonu sağlanmıştır. Ardından, yükleme jeli, %5 akrilamid/bisakrilamid karışımı, %0,1 SDS, 0,127 M Tris (pH: 6.8),

%0,1 APS ve %0,1 TEMED ile hazırlanmıştır. Cam levhalar arasındaki ayırma jeli üzerine dökülerek polimerizasyonu sağlanmıştır. Örnekler yüklenmeden önce jel, 0,025M Tris, 0,25 M glisin ve %2 SDS ile hazırlanmış olan 1X yürütme tamponu içine alınmıştır. Örnekler jele yüklenmeden önce, 100mM Tris, %4 SDS, %0,04 bromofenol mavisi, %20 gliserol ve 200 mM DTT içeren 2X örnek yükleme tamponu (pH: 6,8) ile hazırlandıktan sonra 3 dakika süreyle kaynayan suda inkübe edilmiştir. Örneklerle birlikte protein marker (Protein Marker, Broad Range, 2-212 kDa, NEB P7702) da üreticisinin önerdiği şekilde jele yüklenmiştir. Örnekler yükleme jelinden ayırma jeline geçene kadar 80 V ile, ayırma jeline geçtikten sonra 120V ile oda sıcaklığında yürütülmüştür.

Molekül ağırlığı 20 kDa'dan daha küçük olan protein ve peptidlerin, tris-glisin sistemi olarak da adlandırılan geleneksel Laemmli sistemi ile ayrılması mümkün olmamaktadır. Bu boyutlardaki protein ve peptidlerin ayrımı sırasında, SDS ve küçük proteinlerin jel üzerinde aynı hızla göç etmesi sebebiyle çözünürlük çok düşmektedir. SDS ve peptidlerin birbirinden ayrılması ve sonuç olarak çözünürlüğün artırılması amacıyla Tris-trisin elektroforez sistemi ile, modifiye edilmiş tampon çözeltiler kullanılmaktadır. Tris-SDS-PAGE 1-100 kDa büyüklüğündeki proteinleri ayırmak için kullanılmakta olup, genellikle 20 kDa'dan daha küçük proteinlerin, çözünürlüğü yüksek olarak ayrılması için tercih edilen bir elektroforez sistemidir.

Tez çalışması sırasında, düşük moleküler ağırlıklı peptidleri içeren fraksiyonların elektroforetik analizi amacıyla klasik Laemmli tris-glisin sisteminin yeterli olmadığı durumlarda, çözünürlüğün artırılması amacıyla tris-glisin sistemi kullanılmıştır (Schägger, 2006). Ayırma jeli, %10 akrilamid/bisakrilamid karışımı, %0,1 SDS, 1 M Tris (pH: 8,45), %0,05 APS ve %0,05 TEMED ile hazırlanmış ve cam levhalar arasında polimerizasyonu sağlanmıştır. Ardından, yükleme jeli, %4 akrilamid/bisakrilamid karışımı, %0,1 SDS, 1 M Tris (pH: 8,45), %0,075 APS ve %0,075 TEMED ile hazırlanmıştır. Örnekler, %3 SDS, %1,25 beta-merkaptolanol, %7,5 gliserol, %0,0125 Coomassie Blue G-250, 150 mM Tris-HCl (pH: 7,0) içeren örnek yükleme tamponu içinde hazırlanmış ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. 0,1 M Tris-HCl (pH: 8,9) içeren anot tamponu ve 0,1 M Tris, 0,1 M Trisin, %0,1 SDS (pH: 8,25) içeren katot tamponu, dikey jel ünitesinde ilgili bölgelere doldurulmuştur. Daha sonra, katot tamponu içindeki jele örnekler yüklenerek, yükleme

jelinden ayırma jeline geçene kadar 50 V ile, ayırma jeline geçtikten sonra 200 V ile oda sıcaklığında yürütülmüştür.

### **3.3.2. Elektroforez sonrası jelin görüntülenmesi**

Elektroforez işleminin ardından protein/peptid bantlarının görüntülenmesi amacıyla Coomassie Brilliant Blue R-250 ile jelin boyanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, elektroforez sonrasında cam plakalar arasından çıkarılan jel sırasıyla; %25 isopropanol, %10 asetik asit, %0.05 Coomassie Brilliant Blue içeren Çözelti A, %25 isopropanol, %10 asetik asit, %0.02 Coomassie Brilliant Blue içeren Çözelti B, %10 isopropanol, %10 asetik asit, %0.002 Coomassie Brilliant Blue içeren Çözelti C içinde 15'er dakika süreyle, oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcıda inkübe edilerek boyanmıştır. Boyama sonrasında jel %5 metanol, %7,5 glacial asetik asit içeren Destain Tamponu içine alınarak arka plan boyanması temizleninceye kadar oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Bu işlemlerin ardından jel %7 glacial asetik asit içeren 2X Clear Tamponu içine alınarak görüntülenene kadar saklanmıştır.

## **3.4. Hücre Kültürü**

### **3.4.1. İnsan meme hücre hatlarının kültürü**

Tez çalışmasında kullanılan hücre hatları; insan meme adenokarsinom hücre hatlarından östrojen reseptörü pozitif (ER+) olan MCF-7 (ATCC® HTB-22), üçlü negatif olan (ER-, PR-, HER2-) MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26) ve sağlıklı insan meme epitel hücre hattı MCF-10A (ATCC® CRL-10317) olup, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den temin edilmiştir. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları, yapılacak uygulamaya göre fenol kırmızısı içeren veya içermeyen, 1 g/l glukoz, 4 mmol/l L-glutamin, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 Penicillin/Streptomycin antibiyotik çözeltisi içeren DMEM besi yerinde büyütülmüştür. MCF-10A hücreleri ise 4 mmol/l L-glutamin, 5% at serumu, 10 µg/ml insülin, 5 µg/ml hidrokortizon, 20 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF) ve 100 ng/ml kolera toksini içeren DMEM/Nut mix F-12 besi yerinde büyütülmüştür. Tüm hücreler 37°C, %100 nem, %5 CO<sub>2</sub> koşullarındaki inkübatörlerde kültüre edilmiştir (Fraser vd., 2005).

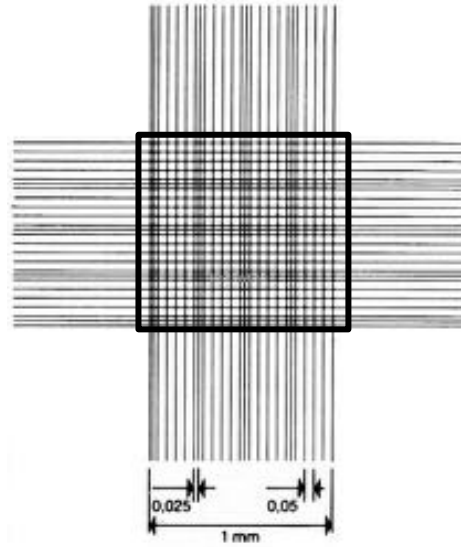
Hücreler kültüre alınmış ve gerekli yoğunluğa ulaştıktan sonra hücre hatları %0,25 (w/v) Tripsin-0.53 mM EDTA çözeltisi ile yüzeyden kaldırılarak ATCC tarafından önerilen oranlarda alt kültüre alınmıştır.

### 3.4.2. Hücre sayısının belirlenmesi

Hücre sayısının belirlenmesi için derinliği 0,1mm, yüzey alanı 0,0025mm<sup>2</sup> olan Thoma lamı ile mikroskopta hücre sayımı yöntemi kullanılmıştır (Marienfeld-Superior, Almanya). Kullanmadan önce alkolle temizlenmiş cam Thoma lamı ve lamelinin hafifçe nemlendirilerek uygun bir şekilde birbirine yapışması sağlanmıştır. Flask yüzeyinden kaldırılarak santrifüj tüpü içinde toplanmış hücre süspansiyonu içinden, çökmesine izin verilmeden 100-200µl alınarak steril bir mikrosantrifüj tüpü içine alınmıştır. Örneklenen hücre süspansiyonu üzerine 1:1 oranda %0,4 Trypan Blue Çözeltisi (Sigma-Aldrich) ilave edilerek karıştırılmıştır. Yaklaşık 1 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 100µl örnek alınarak, Thoma lamı ile lameli arasına yavaşça pipetlenmiştir. Kapiler hareket ile boyanmış hücre süspansiyonu alanın tamamını kapladıktan sonra lam, inverted mikroskop ile 10X büyütme altında görüntülenmiştir.

Şekil 3.1.'de gösterilen sayma alanı içindeki hücreler sayılmıştır. Ölü olduğu için Trypan Blue boyasına geçirgen olan hücreler mavi renk ile boyanmıştır ve canlı hücre sayımına dahil edilmemiştir. Thoma lamı üzerinde bulunan iki adet sayma alanı da ayrı ayrı sayılmış ve çıkan sonuç ortalamasının alınması amacıyla ikiye bölünmüştür. Sayım alanının hacmi 0,1 mm<sup>3</sup> yani 0,1 µl olduğundan 1ml içindeki hücre sayısının bulunması amacıyla sayım sonucu bulunan sayı 10<sup>4</sup> ile ve Trypan Blue ile yapılan boyama sonucu dilüsyon faktörü 2 ile çarpılmıştır.

$$\text{Canlı hücre sayısı/ml} = \left[ \frac{\text{Sayım 1} + \text{Sayım 2}}{2} \right] \times 10^4 \times 2 \quad (3.1.)$$



Şekil 3.1. Thoma lamı üzerindeki sayma alanı

### 3.4.3. Hücre büyüme eğrisinin çizilmesi

Kullanılan hücre hatları ile çalışılırken, mevcut çalışma koşullarındaki büyüme trendinin ve uygulanacak testler için kullanılacak optimal hücre konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla her bir hücre hattı için büyüme eğrisi çizilmiştir. Optimal konsantrasyonun belirlenmesi için mevcut koşullarda en kısa popülasyon ikilenme süresinin seçilmesi amaçlanmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için; 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5,  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu ve MCF-10A hücre hattı için 0,5, 1, 1,5 ve  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu olmak üzere farklı yoğunluklarda hücreler 96 kuyulu kültür plakasına 6'şar tekrarlı olmak üzere ekilmiştir. Her hücre hattı için 0, 24, 48, 72, 96 saat zaman noktalarında örneklenmek üzere 5 paralel plaka hazırlanmıştır. Örneklenen zaman noktalarında hücre yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla 3.4.2.'de anlatılan proliferasyon testi (SRB testi) kullanılmıştır.

Spesifik büyüme hızı (k) ml'deki hücre sayısının zamana karşı çizilen grafiğinin eğiminden tanımlanmaktadır. Hücre popülasyonunun bir hücre döngüsünü tamamlayarak sayıca iki katına çıktığı süreyi tanımlayan ikilenme zamanı ( $T_d$ ) Denklem 3.2.'ye göre GraphPad Prism 8 yazılımı ile hesaplanmıştır.

$$Td = \frac{\ln(2)}{k} \quad (3.2.)$$

#### 3.4.4. Hücre hatlarının saklanması

Çalışma boyunca alt kültür sayısı 25'i aşmamıştır. Hücre devamlılığını sağlamak üzere ikinci alt kültür sırasında hücreler kryo vialler içine yaklaşık  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde alınmıştır. Kanser hücre hatları %5, sağlıklı hücre hattı %7,5 (v/v) DMSO/ büyüme ortamı olacak şekilde hazırlanmış ve dış haznesinde izopropanol içeren dondurma kabı içine alınarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece bırakılmıştır. Ertesi gün tüpler sıvı azot ( $\sim -200^{\circ}\text{C}$ ) içine alınarak saklanmıştır.

Stoklanmış hücreler tekrar kültüre alınırken, dondurulmuş hücre viali alkollenerek steril kabin içine alınmıştır. Stok besi yeri içindeki DMSO'nun hızlıca uzaklaştırılması ve hücrelerin ısı şoku yaşamaması amacıyla vial içeriği, hacminin 5 katı kadar soğuk medium içeren santrifüj tüpü içine alınarak santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti  $37^{\circ}\text{C}$  besi yeri içinde kültür flaskına alınarak inkübatöre kaldırılmıştır.

#### 3.4.5. Saflaştırılmış peptidin hücrelere uygulanması

HPLC ile saflaştırılmış ve vakum konsantratör ile kurutulmuş peptid fraksiyonlar, hücrelere uygulamadan önce steril distile su içinde son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde çözülmüştür. Daha sonra uygun hacimlerde mikrosantrifüj tüplerine bölünerek kullanılana kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Her bir tüp sadece bir defa çözülmüş ve hemen kullanılmıştır, peptid stabilite ve yapısal bozulması üzerinde henüz nasıl bir etki bırakacağı bilinmediğinden ikinci bir dondurma-çözme işlemi yapılmamıştır.

### 3.5. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu Üzerindeki Etkinin Belirlenmesi

#### 3.5.1. Nötral kırmızısı testi

Nötral kırmızısı (NR) testi, genotoksik olmayan *in vitro* testlerden biri olarak sitotoksitenin değerlendirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılan testlerden biridir. Bu yöntemde kısaca, supravital NR boyası hücrelere uygulandığında canlı hücrelere bağlanıp, hücre içine difüze olup, lizozomlarında konsantre olmakta ve daha sonra asidik etanol çözeltisiyle çözünür hale getirilmektedir. Ölü hücrelerde ise boya tutulmamaktadır. Sonuç olarak tutulan boya miktarı canlı hücre sayısı ile orantılı olmaktadır. NR testi; sıklıkla kullanılan diğer sitotoksikite testlerine göre daha ucuz, hassas ve tetrazolyum tuzlarının (MTT, XTT vb.) kullanıldığı testlerde olduğu gibi kararsız kimyasal kullanımını gerektirmeyen bir test olup, hücre ölümünü tahmin eden laktat dehidrogenaz (LDH) gibi testlere kıyasla daha basittir ve daha az ekipman gerektirmektedir.

Ham venomun alıkonma zamanlarına ( $R_T$ ) göre ayrılmış HPLC fraksiyonlarının farklı dozlarına karşı insan meme hücre hatlarının her 24 saatte bir verdiği cevap ölçülecek şekilde 48 saat süre içinde verdiği cevaplar belirlenmiştir. Bunun için en az üç farklı fraksiyon dozu (yarım log basamaklı) denenmiştir.

Flasklarda kültüre edilmekte olan hücreler PBS ile yıkanıp Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırıldıktan sonra  $1 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde 96'lık plakalara ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması ve eksponansiyel büyüme fazına geçmesi için gece boyu (16 saat) inkübe edilmiştir. Ertesi gün, her bir kuyuya, hücrelerin kendi besi ortamı içinde istenilen konsantrasyonda test edilecek peptid fraksiyonunu içeren "uygulama çözeltileri" verilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Uygulama çözeltileri her 24 saatte bir tazelenerek inkübasyonuna devam edilmiştir. Uygulamanın verildiği zaman noktası 0. saat olarak kabul edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ölçüm alınacak her plakanın kuyularında bulunan besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücre tabakası üzerine, stok çözeltisinden (4 mg/ml) besi ortamı ile seyreltilerek hazırlanmış 100 µl NR çözeltisi (40 µg/ml) uygulanarak 2 saat süreyle CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyular 3'er kere PBS ile yıkanmış ve 150'şer µl "Destain Çözeltisi" (%50 etanol, %49 deiyonize su, %1 glasiyal asetik asit) ile 10 dakika süreyle orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında



inkübe edilmiştir. Mikroplaka okuyucu spektrofotometre (BioTek, Epoch 2) ile her bir kuyunun 540 nm'deki optik dansitesi belirlenmiştir. Denklem 3.3.'e göre doz-cevap eğrileri çizilerek, en yüksek tolere edilen doz (ETD) belirlenmiştir. Deney en az 3 farklı zamanda tekrar edilmiştir (Repetto vd., 2008).

$$\text{Canlılık (\%)} = 100 \times \frac{\text{OD}_{540}(\text{örnek})}{\text{OD}_{540}(\text{kontrol})} \quad (3.3.)$$

### 3.5.2. Sülförödamın B testi

Hücre proliferasyonunun belirlenmesi için Sülförödamın B (SRB) testi kullanılmıştır. Bu test ilk defa büyük ölçekli anti-kanser ilaç tarama çalışmalarında ilaç kaynaklı sitotoksisite ve hücre proliferasyonunu ölçmek amacıyla geliştirilmiştir (Skehan vd., 1990). SRB testi hücre yoğunluğunu hücrel protein içeriği ile orantılı olarak ölçen bir testtir. Temel olarak; SRB boyasının, trikloroasetik asit (TCA) ile fikse edilmiş hücre proteinlerinin bazik rezidülerine elektrostatik ve pH bağımlı bir şekilde bağlanmasına ve bazik koşullarda hücrelerden ekstrakte edilip ölçüm için çözünmesine dayanmaktadır. SRB testinin sonunda kolorimetrik ölçüm alınmaktadır. %1-200 yoğunluktaki hücreler için hücre sayısı ve hücrel protein miktarının doğrusal olduğu SRB testi sonuçlarıyla gözlenmiştir (Skehan, vd., 1990).

Her bir ham venom fraksiyonu için NR testi sonucuna göre belirlenen ETD'nin altında kalmak üzere en az 3 farklı doz belirlenmiş ve SRB testi ile proliferasyon üzerinde etkili olan dozlar belirlenmiştir.

Farklı dozlardaki peptid fraksiyonları ile 0, 24 ve 48 saat inkübe edilen hücreler besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra %10 TCA ile 1 saat süreyle 4°C'de fikse edilmiştir. Daha sonra plakalar soğuk deiyonize su ile 3 kere yıkanarak havada kurutulmuştur. Her bir kuyuya 100 µl %1 asetik asit sulu çözeltisi (v/v) ile hazırlanmış % 0,4 (w/v) SRB çözeltisi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bağlanmayan SRB %1 asetik asit ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırılmış, bunu takiben plakalar havada kurutulmuştur. 200 µl 10 mM Tris-baz (pH: 10,5) her kuyuya eklenerek, 10 dakika boyunca oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda çalkalanmış, böylece bağlanmış boya ekstrakte edilerek homojenize edilmiş

ve 510 nm’de absorbans değeri mikropilaka okuyucu spektrofotometrede ölçülmüştür (Vichai ve Kirtikara, 2006).

*In vitro* sitotoksitesiyi tanımlamak için çoğunlukla IC<sub>50</sub> değeri kullanılmaktadır. IC<sub>50</sub>, ilaç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla %50 daha az hücreye sebep olan konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. Bunun yerine; Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) ilaç tarama programında, %50 büyüme inhibisyonuna sebep olan doz olarak GI<sub>50</sub> tanımlanmıştır. GI<sub>50</sub> başlangıçtaki (T<sub>0</sub>) hücre sayısı ile doğrulanmakta ve Denklem 3.4.’de verildiği gibi hesaplanmaktadır (Shoemaker, 2006).

$$100 \times \left[ \frac{(T - T_0)}{(C - T_0)} \right] = 50 \quad (3.4.)$$

T: Belirli bir konsantrasyonda ilaç uygulandıktan sonra T zamanında ölçülen OD, T<sub>0</sub>: Uygulamaya başlandığında -0 zaman noktasında- ölçülen OD, C: Kontrol grubunun OD değeri.

GI<sub>50</sub> test maddesinin büyüme inhibe edici gücünü ortaya koyan bir değer iken, total büyüme inhibisyonu değeri (TGI), test maddesinin sitostatik etkisini ortaya koymakta ve aşağıdaki gibi (Denklem 3.5.) hesaplanmaktadır.

$$100 \times \left[ \frac{(T - T_0)}{(C - T_0)} \right] = 0 \quad (3.5.)$$

Denklem 3.6.’da hesaplama yöntemi verilen lethal doz (LC<sub>50</sub>) değeri ise başlangıçtaki hücre popülasyonunun %50’sini öldüren doz olarak sitotoksik etkiyi vurgulamaktadır.

$$100 \times \left[ \frac{(T - T_0)}{T_0} \right] = -50, \quad T < T_0 \quad (3.6.)$$

Bu yöntemle, sitotoksik etkisi belirlenen venom fraksiyonları için belirlenen ETD'den düşük olmak üzere aralıklar daraltılarak yeni konsantrasyonlar test edilmiş (en az 3 nokta) ve GI<sub>50</sub>, TGI ve LC<sub>50</sub> değerleri SRB testi sonucunda oluşturulan doz-cevap eğrisinden ekstrapolasyon ile hesaplanmıştır.

Sağlıklı meme epitel hücre hatlarının kültür ortamı çok pahalı ve bu hücrelerin kültürü çok uzun zaman aldığı için bu testler öncelikle kanser hücre hatları ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bulunan etkili doz aralığı sağlıklı meme epitel hücre hattı üzerinde denenmiştir. İleriki basamaklarda GI<sub>50</sub> değerinin altında, sağlıklı hücreye zarar vermeyen/en az zarar veren ancak kanser hücre hatlarını maksimum etkileyen dozun kullanılması planlanmıştır.

### **3.6. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi**

Arı venomu da dahil olmak üzere pek çok hayvansal venomun hemolitik aktivitesi olduğu literatürde sayısız defa rapor edilmiştir. Bu sebeple, biyolojik aktivitesi ileriki aşamalarda test edilecek peptid fraksiyonun hemolitik aktivitesi belirlenmiş ve çalışılacak konsantrasyonların belirlenen hemolitik dozun altında kalmasına dikkat edilmiştir. Hemolitik aktivitenin belirlenmesi için direk hemoliz testi uygulanmıştır. Gönüllü, sağlıklı insan donörden alınan tam kan 5000xg hızda 5 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki plazma fazı ve beyaz kan hücrelerinin oluşturduğu orta faz, alttaki eritrosit (RBC) içeren fazdan ayrılmıştır. Saf bir eritrosit süspansiyonu elde etmek amacıyla alt faz, 20 mM Tris-HCl ve 150 mM NaCl sulu çözeltisi olan TBS tamponu (pH: 7,4) ilave edilerek 15 ml'ye tamamlanmıştır. 5000xg hızda 5 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. TBS tamponu ile yıkama işlemi bir kez daha tekrar edilmiştir. Daha sonra 1 ml RBC, 9 ml TBS tamponu ile sulandırılarak %10'luk bir çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti 40 kat daha sulandırılarak %0,25'lik bir stok RBC çözeltisi oluşturulmuştur. 120 µl RBC stok çözeltisi, 15 µl TBS tamponu (pH: 7,4) ve 15 µl örnek çözeltisi ile karıştırılarak 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Örnek çözeltileri test edilecek peptid fraksiyonun 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyondaki sulu çözeltileri olarak hazırlanmıştır. Ardından tüpler 1500xg hızda 5 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. 30 µl süpernatant 100 µl TBS tamponu (pH: 7,4) ile sulandırıldıktan sonra 414 nm dalga boyundaki optik dansitesi

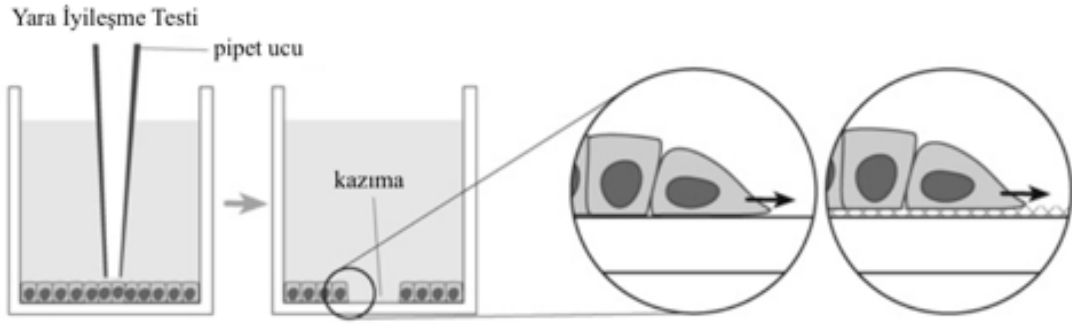
spektrofotometre ile ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak TBS tamponu (%0 hemoliz), pozitif kontrol olarak %1 Triton X-100 çözeltisi (%100 hemoliz) kullanılmıştır. Deney, 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Eritrositlerin %50'sini lizise uğratan doz olarak tanımlanan hemolitik doz 50 (HC<sub>50</sub>), OD414 değerlerine karşılık test edilen peptid fraksiyon dozları ile oluşturulan lineer olmayan eksponansiyel eğriden ekstrapolasyon yoluyla hesaplanmıştır (Al-Badri vd., 2008).

### 3.7. Hücre Hareketliliği Üzerindeki Etkinin Belirlenmesi

Hücre migrasyonu; her bir hücrenin, hücre tabakaları ve kümelerinin bir noktadan diğer noktaya hareketi olarak tanımlanmaktadır. Kanser patolojisinin merkezinde yer alan süreçlerden biridir. Hücre invazyonu; hücrelerin ekstraselüler matrikse (ECM) penetre olmasını sağlayan 3-boyutlu migrasyonunu tanımlar ve kanser hücre metastazi prosesi ile tipik olarak ilişkilidir. Bu iş paketinde etkin peptidin (ilgili doz ve sürede) kanser hücre hatları metastatik hücre davranışları üzerindeki işlevsel etkisi; lateral motilite testi ve invazyon testi ile belirlenecektir.

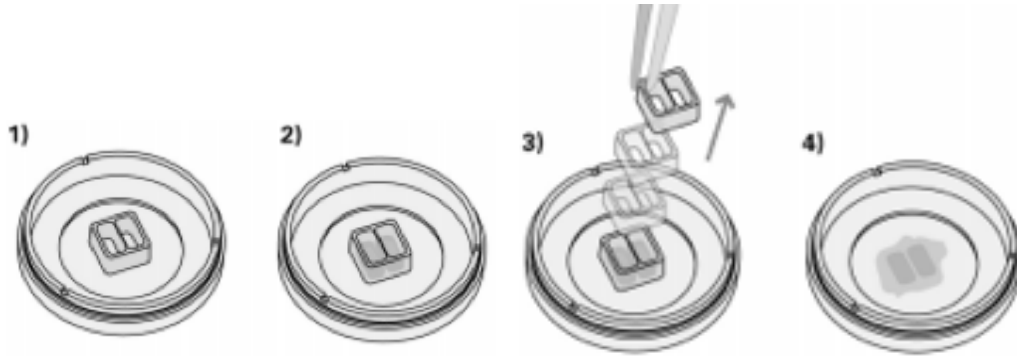
#### 3.7.1. Lateral motilite testi

Yara iyileşmesi testi çok uzun yıllardır lateral hücre hareketinin gösterilmesi için kullanılmaktadır. Bu yöntemde; *in vitro* kültür ortamında konfluent olarak büyümüş hücre tabakasında steril pipet ucu ile boydan boya bir yarık oluşturulup, yüzeyden kalkan hücreler ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra hücre tabakasının “yaralı” “hücresiz” alana doğru hareketi zamana karşı incelenmektedir (Şekil 3.2.). Yaranın yüzde kapanma oranı değerlendirilmektedir. Ancak bu yöntem manuel olarak yapıldığı için yara boyutu, büyüklüğü ve şekli laboratuvarlar arasında, hatta aynı deney setinde farklı plakalar arasında bile farklılıklar olmaktadır. Dolayısıyla, kontrol grubu ile deney gruplarının eşit koşullarda olduğundan emin olunamamaktadır. Aynı zamanda hücre tabakasını yaralama işlemi alttaki ECM tabakasına hasar vermekte ve hasara uğrayan hücrelerden lateral hareketlilik üzerinde etkisi olabilecek birtakım faktörlerin salınmasıyla sonuçlanmaktadır.



Şekil 3.2. Manuel olarak gerçekleştirilen yara iyileşme testinin şematik gösterimi. (Kramer vd., 2013).

Bu sebeple, tez çalışmasında, “yara” oluşturmak yerine “hücresiz alan” oluşturmak üzere hücre kültür plakası kuyularının içine yerleştirilen silikon insertler kullanılmıştır (Ibidi) (Şekil 3.3). Kullanılan silikon insertte;  $0,22 \text{ cm}^2$  yüzey alanına ve  $70 \mu\text{l}$  hacme sahip 2 adet kuyu,  $500 \mu\text{m} \pm 100 \mu\text{m}$  genişlikte bir ara bölmeyle ayrılmıştır. Silikon insertler steril bir pens yardımıyla 24'lük kültür plakalarına alınarak üzerine hafifçe bastırılarak kuyu içine yerleştirilmiştir.



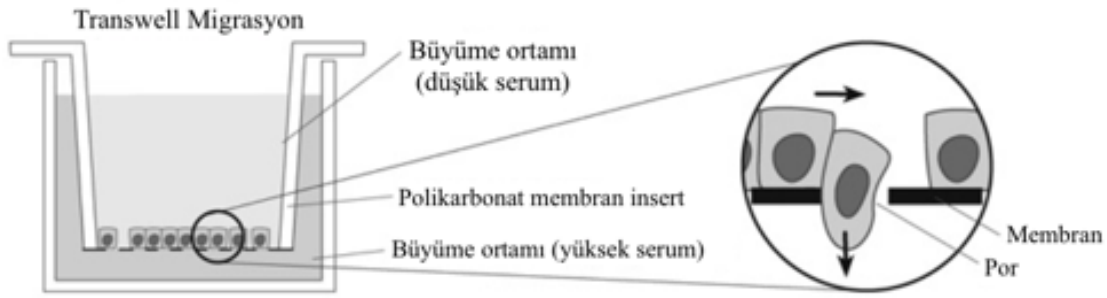
Şekil 3.3. Yara iyileşme testi için kullanılan silikon kültür insertler ile hücresiz alan oluşturulması.

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri insertin her bir kuyusunda konfluent bir tabaka oluşturmak üzere  $4 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve kompakt bir hücre tabakasının oluşması için 16 – 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından silikon insertler steril bir pens yardımıyla çıkarılarak kuyular 2 defa PBS ile yıkanmıştır. Etkin peptid 1, 1,5, 2  $\mu\text{g/ml}$  dozlarda %1 FBS içeren büyüme ortamı içinde kuyulara uygulanmış ve uygulama her 24 saate tazelenmiştir. Kuyuların 0 zamanında ( $T_0$ ) görüntülenmesi yapıldıktan sonra inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra kuyular PBS ile yıkandıktan sonra %1 FBS içeren medium içine alınarak inverted mikroskopta görüntülenmiştir ( $T_{24}$ ,

T<sub>48</sub>). Peptid varlığı ve yokluğunda, hücreler zona göç eden hücreler sebebiyle hücreler zonun kapanma oranı ImageJ yazılımı aracılığıyla ölçülerek migrasyon hızı hesaplanmıştır (Nyegaard vd., 2016).

### 3.7.2. Transwell migrasyon testi

Transwell migrasyon testi hücrelerin kimyasal bir cezbediciye karşı kemotaktik cevabının değerlendirildiği bir yöntemdir. Bu yöntemin prensibi, hücrenin çapından daha küçük ancak aktif bir harekete izin verecek kadar büyük bir por çapına sahip membran bölme ile ayrılmış iki hazne arasında hücrelerin vertikal hareketinin ölçülmesine dayanmaktadır. Tez çalışmasında, 24 kuyulu hücre kültür plakalarına 6,5 mm çapında ve 8 µm por genişliğine sahip yarı geçirgen polikarbonat membran insertler (Sarstedt) yerleştirilmiştir. Hücreler  $5 \times 10^4$  hücre/insert yoğunluğunda ve %1 FBS içeren büyüme ortamı içinde hazırlanmış farklı dozlarda etkin peptid varlığında üst hazneye ekilmiştir. Alt hazneye ise cezbedici olarak daha yüksek konsantrasyonda (%10) FBS ve üst hazne ile aynı dozda etkin peptid içeren büyüme ortamı uygulanmıştır (Şekil 3.4.). Daha sonra hücreler 16 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda membranın üzerinde kalan göç etmeyen hücreler pamuk uçlu swab ile uzaklaştırılmıştır. Membranın alt yüzeyinde olan göç eden hücreler ise PBS içinde %3,7 formaldehit çözeltisi ile 2 dakika süreyle fikse edilmiştir. Ardından soğuk %100 metanol ile 15 dakika süreyle hücre geçirgenliği artırılarak %25 metanol içinde %0,5 kristal viyole (w/v) ile 15 dakika süreyle boyanmıştır. Ardından PBS ile yıkanarak inverted mikroskop altında 10X büyütme altında görüntülenmiştir. Her bir insertten 10 adet rastgele alan seçilerek fotoğraflanmış, bu alanlardaki göç eden hücreler ImageJ yazılımı aracılığıyla sayılmış ve ortalaması alınarak bir tekrarı temsil etmiştir. Deney sonuçları ilgili kontrol gruplarına göre normalize edilmiş ve 3 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

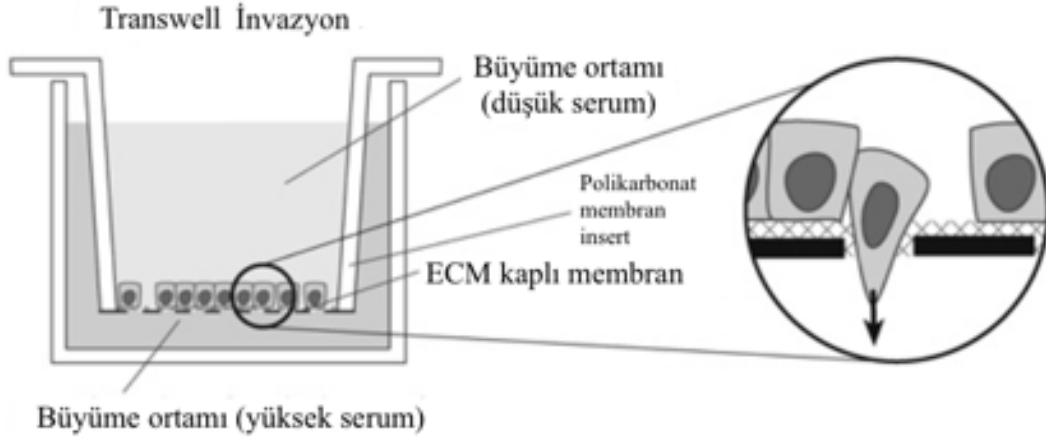


Şekil 3.4. Transwell migrasyon testinin şematik gösterimi. (Kramer, vd., 2013).

### 3.7.3. Transwell invazyon testi

Bu yöntem, bir önceki bölümde anlatılan transwell migrasyon testi ile teknik olarak aynı prensip ile uygulanmaktadır. Farklı olarak, hücreler üst hazneye ekilmeden önce, poröz membran filtrenin üzeri ince bir tabaka ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleri ile kaplanmaktadır. Bu sayede ECM membran porlarını tıkayarak invaziv olmayan hücrelerin por boyunca migrasyonuna engel olmaktadır. İnvazif hücreler ise matriksi degrade ederek ECM tabakası boyunca hareket edebilmekte ve porları aşarak filtrenin alt tabanına tutunabilmektedir (Şekil 3.5.) (Albini ve Benelli, 2007). Tez çalışmasında, 24 kuyulu hücre kültür plakalarına 6,5 mm çapında ve 8 µm por genişliğine sahip yarı geçirgen polikarbonat membran insertler (Sarstedt), hücre ekiminden önce, 1,25 mg/ml büyüme faktörü azaltılmış Matrigel™ bazal membran matriksi (Corning) ile 50 µl hacimde kaplanmıştır. Her deneyden önce Matrigel™ taze olarak stok çözeltisinden soğuk serumsuz büyüme ortamı ile sulandırılarak hazırlanmıştır. İnsert membran üzerine uygulanan Matrigel™ matriksin jelleşmesi amacıyla 2 saat süreyle 37 °C'de CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler 5 x 10<sup>4</sup> hücre/insert yoğunluğunda üst hazneye ekilmiştir. Transwell migrasyon testinde olduğu gibi %1 – 10 FBS gradienti kullanılarak, etkin peptid varlığı ve yokluğunda, 24 saat süreyle inkübe edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda membranın üzerinde kalan göç etmeyen hücreler ve bazal matriks pamuk uçlu swab ile uzaklaştırılmıştır. Membranın alt yüzeyinde olan göç eden hücreler ise PBS içinde %3,7 formaldehit çözeltisi ile 2 dakika süreyle fikse edilmiştir. Ardından soğuk %100 metanol ile 15 dakika süreyle hücre geçirgenliği artırılarak %25 metanol içinde %0,5 kristal viyole (w/v) ile 15 dakika süreyle boyanmıştır. Ardından PBS ile yıkanarak inverted mikroskop altında 10X büyütme altında görüntülenmiştir. Her bir

insertten 10 adet rastgele alan seçilerek fotoğraflanmış, bu alanlardaki göç eden hücreler ImageJ yazılımı aracılığıyla sayılmış ve ortalaması alınarak bir tekrarı temsil etmiştir. Deneysel sonuçları ilgili kontrol gruplarına göre normalize edilmiş ve 3 farklı zamanda tekrar edilmiştir.



Şekil 3.5. Transwell invazyon testinin şematik gösterimi. (Kramer, vd., 2013).

### 3.8. Akış Sitometrisi ile Fonksiyonel Aktivitenin Belirlenmesi

Akış sitometrisi, tamponlanmış bir tuz çözeltisi içinde bulunan akış halindeki partiküllerin, bir veya birden fazla lazer tarafından tek tek ve hızlı bir biçimde analiz edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu teknikte, her bir partikül görünür ışık saçılımı ve bir veya birden fazla floresan parametresine göre analiz edilmektedir. Görünür ışık saçılımı, ileri (forward scatter, FSC) ve 90° yan (side scatter, SSC) olmak üzere iki farklı yönde ölçülmektedir. İleri saçılım, partikülün rölatif büyüklüğünü belirtirken, yan saçılım partikülün internal kompleksliği veya granülaritesi ile ilgili bilgi vermektedir. Bunun yanında örnekler, floresan ışımaya yapacak şekilde transfekte edilerek, floresan boyalarla boyanarak veya floresan konjuge edilmiş antikolarla boyanarak floresan ölçüm için hazırlanabilmektedir.



### 3.8.1. Nüklear DNA miktarının belirlenmesi (Hücre döngüsü analizi)

Hücre proliferasyonu kontrolünün bozulması kanser patolojisinin altında yatan sebeplerden biri olduğu için hücre proliferasyonunun incelenmesi ve popülasyondaki hücrelerin hücre döngüsü fazları dağılımının (G1, S ve G2/M) belirlenmesi kanser çalışmalarında önem arz etmektedir. Hücrenin proliferasyon kararı DNA sentezi başlamadan ve ilerlemeden hemen önce G1 fazında verildiği için DNA sentezinin tespiti hücre kültürü deneylerinde büyüme regülasyonunun tanımlanmasını sağlamaktadır. DNA sentezi ise, DNA miktarı olarak floresan bir DNA interkalasyon boyası olan propidyum iyodür (PI) ile akış sitometresi cihazı aracılığıyla tespit edilebilmektedir (Schönthal, 2004; Cecchini vd., 2012).

Tez çalışması kapsamında, etkin peptidin çalışılan hücre hatlarında G1, S ve G2 hücre döngüsü evrelerinin dağılımına etkisinin araştırılması amacıyla hücrelerin DNA içeriği akış sitometrisi cihazı ile analiz edilmiştir. Bunun için 6 kuyulu hücre kültür plakalarına  $3 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat sonra serum içermeyen besi ortamına alınarak 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda etkin peptidin ilgili dozları hücrelere uygulanmıştır. 24 saat süreyle etkin peptid varlığında ve yokluğunda inkübe edilen hücreler, inkübasyon süresi sonunda tripsinize edilerek birer santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bunun yanında, büyüme ortamında bulunan yüzeyden kalkmış mitotik, apoptotik ve ölü hücrelerin tümü de ilgili tüplerin içinde tripsinize edilmiş hücrelerle birlikte toplanmıştır. Hücre döngüsü analizi için Cycletest™ Plus DNA Kit (BD) kullanılmış olup üreticinin önerdiği protokol uygulanmıştır. Kısaca hücre süspansiyonları, 10 dakika 125 xg oda sıcaklığında santrifüj edilerek pellet olarak çöktürüldükten sonra 1 ml tampon içinde resüspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu tekrar santrifüj edilmiş ve tampon ile yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Örnekler 500 µl tampon çözeltisi içinde 12x75mm'lik FACS tüpleri içinde resüspanse edilerek sırasıyla, 250 µl "Solution A", 200 µl "Solution B" ilave edilerek 15'er dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak 200 µl "Solution C" ilave edilerek karanlıkta buz üzerinde 15 dakika inkübe edilmiştir. Akış sitometrisi cihazı (BD, Accuri C6) ile akış hızı 14 µl/dakika olmak üzere, her örnekten 10.000 – 20.000 adet tek hücre (single cell event) verisi toplanmıştır. Veriler toplanırken ileri saçılım (FSC-H) eşik değeri 80.000 olarak uygulanmıştır. Cihaz üzerindeki 488 nm lazer ile uyarılan boyanmış nükleuslar tarafından 564 nm ile 606 nm

arasında saçılan ışık, 585/40 bandpass filtre (FL2 detektör) ile tespit edilmiştir. Veriler, cihazın yazılımı (BD, Accuri C6 Software) ile analiz edilmiştir.

### 3.8.2. Hücre ölüm modunun analizi

Hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengeyi sağlayan, programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz, normal fizyolojik işleyişte homeostazın devamlılığında anahtar bir mekanizma olarak rol almaktadır. Apoptoz regülasyonunun bozulması ise kanser de dahil olmak üzere pek çok hastalığın patogenezi ve ilerlemesinde etkili olmaktadır. Bu sebeple yeni terapötik yaklaşımlar, hücre ölüm mekanizmasının anlaşılması ve hedeflenmesini amaçlamaktadır. Apoptotik hücrelerde sırayla gerçekleşen bir dizi morfolojik değişim arasında, hücre membranı üzerindeki lipidlerin yeniden düzenlenmesi yer almaktadır. Normal fizyolojik koşullarda, dış katmanında kolin fosfolipidleri (fosfatidilkolin, sfingomiyelin), sitoplazmik katmanında aminofosfolipidlerin (fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin) yer alması sonucu hücre membranında bir lipid asimetrisi bulunmaktadır. Apoptoz sırasında ise fosfatidilserinler (PS) hücre membranının dış katmanına transloke olmaktadır. Hücre dışında bulunan fosfatidilserinler ile FITC (Fluorescein isothiocyanate) gibi bir florokrom ile işaretlenmiş 36 kDa büyüklüğünde antikoagülan bir protein olan Annexin V (AV)'in divalent kalsiyum iyonları varlığında geri dönüşümlü bir şekilde bağlanması sonucu apoptoza giren hücreler kesin bir şekilde belirlenebilmektedir. Apoptozun daha ileri basamaklarında veya nekrozda ise hücre membran bütünlüğü bozulmaktadır. Bu hücreleri erken apoptotik evrede olan hücrelerden ayırmak üzere propidyum iyodür (PI) gibi vital bir boya ile hücre popülasyonu eş zamanlı olarak boyanmaktadır (Vermes vd., 2000; Wlodkowic vd., 2009; Rieger vd., 2011).

Tez çalışması kapsamında, etkin peptidin çalışılan hücre hatlarında apoptotik bir etkisi olup olmadığına ve varsa apoptotik evreler arasındaki dağılımına etkisinin araştırılması amacıyla hücreler AV/FITC-PI ile boyanarak akış sitometrisi cihazı ile analiz edilmiştir. Bunun için 6 kuyulu hücre kültür plakalarına  $3 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde ekilen hücrelere, 24 saat sonra etkin peptidin ilgili dozları uygulanmıştır. 24 saat süreyle etkin peptid varlığında ve yokluğunda inkübe edilen hücreler, inkübasyon süresi sonunda tripsinize edilerek birer santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bunun yanında, büyüme ortamında bulunan yüzeyden kalkmış mitotik, apoptotik ve ölü hücrelerin tümü de ilgili tüplerin

içinde tripsinize edilmiş hücrelerle birlikte toplanmıştır. Hücre ölüm modunun analizi için FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD) kullanılmış olup üreticinin önerdiği protokol uygulanmıştır. Kısaca hücre süspansiyonları, 10 dakika 125 xg oda sıcaklığında santrifüj edilerek pellet olarak çöktürüldükten sonra 2 defa soğuk PBS (4 °C) ile yıkanmıştır. Ardından “AV Binding Buffer, 1X” içinde  $1 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde resüspanse edilmiştir. 12x75mm FACS tüpü içine  $1 \times 10^5$  hücre alınarak 5 µl FITC AV, 5 µl PI çözeltisi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika süreyle karanlıkta inkübe edilen örneklerin üzerine 400 µl “AV Binding Buffer, 1X” ilave edilerek akış sitometrisinde analiz edilmiştir. Akış sitometrisi cihazı ile akış hızı 66 µl/dakika olmak üzere, her örnekten 10.000 – 20.000 adet tek hücre (single cell event) verisi toplanmıştır. Veriler toplanırken ileri saçılım (FSC-H) eşik değeri 80.000 olarak uygulanmıştır. Cihaz üzerindeki 488 nm lazer ile uyarılan AV/FITC-PS kompleksinden 530 nm’de saçılan ışık, 533/30 bandpass filtre (FL1 detektör) ile ve PI ile boyanmış nükleuslar tarafından 564 nm ile 606 nm arasında saçılan ışık, 585/40 bandpass filtre (FL2 detektör) ile tespit edilmiştir. Veriler, cihazın yazılımı (BD, Accuri C6 Software) ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda geleneksel ikili kapılama yöntemi kullanılarak AV-/PI- negatif hücreler canlı, AV+/PI- hücreler erken apoptotik, AV+/PI+ hücreler geç apoptotik veya nekrotik hücreler olarak yorumlanmıştır.

### **3.9. Fonksiyonel Aktivitenin Transkripsiyon Seviyesinde Analizi**

Tez çalışmasının bu aşamasında, etken peptidin bu aşamaya kadar belirlenmiş olan fonksiyonel aktivitesinin, aynı süreçlerle ilişkili moleküler seviyede işlevinin aydınlatılması için destekleyici veriler elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, bir epitel hücrenin invazif özellikler kazandığı epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), invazyon ve metastaz, ekstrinsik ve instrinsik apoptoz, hücre döngüsü ve inflamasyon süreçleriyle ilişkili yollarda anahtar role sahip olduğu düşünülen transkripsiyon faktörleri ve/veya proteinlere ait genler seçilmiş ve ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir.

#### **3.9.1. Hücre kültüründen total RNA ekstraksiyonu**

Bunun için 25 cm<sup>2</sup>’lik hücre kültür flasklarına  $8 \times 10^5$  hücre/flask olacak şekilde ekilen hücrelere, 24 saat sonra etkin peptidin ilgili dozları uygulanmıştır. 24 saat süreyle

etkin peptid varlığında ve yokluğunda inkübe edilen hücreler, inkübasyon süresi sonunda tripsinize edilerek birer santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj sonrası pellet olarak toplanan hücrelerden total RNA ekstraksiyonu amacıyla “easy-spin™ [DNA free] Total RNA Extraction Kit” (Intron Biotechnology) kullanılmıştır. Çalışma öncesi çalışma alanı RNaz’lardan arındırılmış ve RNaz içermeyen sarf malzemeler kullanılmıştır. Ekstraksiyon için üreticinin önerdiği protokol takip edilmiştir. Protokol sonunda kit içeriğindeki “Elution Buffer” içinde toplanan örnekler buz üzerine alınarak NanoDrop™ (Thermo Scientific) spektrofotometre ile elde edilen RNA miktarı ve 260/280 ve 260/230 saflık oranları ölçülmüştür. Örnekler -80 °C’de saklanmıştır.

### 3.9.2. cDNA kütüphanesinin sentezi

RNA ekstaksiyonu sonunda elde edilen total RNA ekstraktları, dondurulmadan önce hemen ilk dizi- komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Bunun için, 1 µg total RNA örneği ve 5 µM “Random Hexamer Primer” buz üzerinde karıştırılarak son hacim nükleaz içermeyen su ile 12 µl’ye ayarlanmıştır. Reaksiyon tüpleri 65 °C’de 5 dakika süreyle inkübe edilmiş, ardından tekrar buz üzerine alınmıştır. 50mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub> ve 10 mM DTT içeren reaksiyon tamponu, 20 U “RiboLock” RNaz inhibitörü, 1 mM dNTP karışımı ve 200 U RevertAid M-MuLV RT reaksiyon tüplerine eklenerek final hacim 20 µl’ye tamamlanmıştır. Reaksiyon tüpleri, primerlerin bağlanması için öncelikle 25 °C’de 5 dakika süreyle, ardından ters transkripsiyonun gerçekleşmesi için 42 °C’de 1 saat süreyle, ters transkriptaz aktivitesinin durdurulması amacıyla 70 °C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Ters transkripsiyon ile total RNA’dan elde edilen cDNA kütüphaneleri direk kullanılmış veya kullanılana kadar -20 °C’de saklanmıştır.

### 3.9.3. Primer oligonükleotidlerin tasarımı

Kantitatif PCR’da kullanılmak üzere, transkripsiyon seviyesinin araştırılmasına karar verilen 15 adet gen için primer çifti tasarlanmıştır. Bunun için “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” nükleotid veri tabanından ilgili genlerin insan mRNA dizileri seçilmiş ve NR ile başlayan erişim numaraları belirlenmiştir. Daha sonra NCBI

tarafından geliştirilen bir araç olan “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)” ve açık kaynak kodlu bir yazılım olan Primer3 (Untergasser vd., 2012)’ü aynı anda kullanarak hedef diziyeye spesifik primer tasarlamak amacıyla kullanılan Primer-BLAST, primer dizilerin tasarımı için kullanılmıştır. Hedef dizisine spesifik, maksimum amplicon uzunluğu 200 bp, optimum primer uzunluğu 22 nükleotid, optimum primer erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>) 60 °C, optimum GC içeriği %55, 3’ ucunda GC yığınları bulunan primer çiftleri, en az bir intron bölge ile ayrılacak ve farklı iki ekzon bölgeye bağlanacak şekilde tasarlanmıştır. Diziler seçildikten sonra Primer3 kullanılarak primerlerin kendi içinde ve diğer primer çiftiyle komplementerleşme skorları kontrol edilmiştir. Çizelge 3.1.’de verilen tasarıma göre sentezlenen primer çiftleri (Oligomer Biyoteknoloji) liyofilize olarak temin edilmiş ve nükleaz içermeyen su içinde çözülerek 100 µM konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok primer çözeltileri -20 °C’de saklanmıştır.

#### **3.9.4. Kantitatif PCR (qPCR)**

Kantitatif PCR, DNA bağlanma boyası teknolojisi ile AriaMx real-time PCR sistemi (Agilent) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar, referans ve hedef genler için simultane olarak gerçekleştirilmiştir. Beta aktin (ACTB) ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) olmak üzere iki farklı referans gen kullanılmıştır. Eşik değerinin (“threshold”) ve bu değeri geçtiği döngü (“cycle threshold”, Ct) sayısının belirlenmesi için AriaMx Software 1.7. kullanılmıştır. 96 kuyulu PCR plakası içinde, nükleaz içermeyen su ile 1:10 oranda seyreltilmiş 1 µl cDNA, 400 nM ileri ve geri primer ve PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) kullanılarak, her bir primer seti için final 10 µl hacimde reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Her bir deney setinde kalıp cDNA yerine nükleaz içermeyen su içeren bir negatif kontrol kullanılmıştır. qPCR; master mix içinde bulunan UDG (Urasil-deglikozilaz) enziminin aktivasyonu için 50°C 2 dakika, Dual-Lock™ DNA polimeraz enzimi aktivasyonu için 95°C 2 dakika, 15 saniye 95°C denatürasyon ve 1 dakika 60°C bağlanma/uzama aktivitesi için inkübe edilerek toplam 40 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılmak üzere tasarlanan primer oligonükleotid dizileri.

Hedef Gen	Kısaltma	Primer	Baz Dizisi (5' - 3')	Baz Sayısı	GC (%)	Tm (°C)
<b>Vimentin</b>	VIM	İleri	TAACCAACGACAAAGCCCGC	20	55	59
		Geri	AAGACGTGCCAGAGACGCAT	20	55	59
<b>Snail family transcriptional repressor 1</b>	SNAIL	İleri	TCTAGGCCCTGGCTGCTACAA	21	57	62
		Geri	GACATTCGGGAGAAGGTCCGA	21	57	62
<b>Matrix metalloproteinase 9</b>	MMP9	İleri	TCTGGAGGTTTCGACGTGAAGG	21	57	62
		Geri	AGCGGTCCTGGCAGAAATAGG	21	57	62
<b>Vascular endothelial growth factor A</b>	VEGFA	İleri	TCAAGCCATCCTGTGTGCC	20	60	61
		Geri	GCCTTGGTGAGGTTTGATCCG	21	57	62
<b>Nuclear factor kappa B subunit 1</b>	NFKB1	İleri	CTTCTTGACCACCCCAACG	19	58	59
		Geri	GCAGCAAACATGGCAGGCTA	20	55	59
<b>Fas cell surface death receptor</b>	FAS	İleri	TTCTGCCATAAGCCCTGTCCTC	22	55	62
		Geri	GCAGTCTGGTTCATCCCCATTG	22	55	62
<b>AKT serine/threonine kinase 1</b>	AKT1	İleri	GCAGGATGTGGACCAACGTG	20	60	61
		Geri	AGTCTGGATGGCGTTGTCC	20	60	61
<b>TNF receptor superfamily member 10b</b>	DR5	İleri	CGGCAGAAGCTGAAAGGTCT	20	55	59
		Geri	GCCTCAGCTTTAGCCACCTT	20	55	59
<b>B-cell leukemia/lymphoma-2-alpha protein</b>	BCL2	İleri	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	22	55	62
		Geri	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC	23	52	62
<b>BCL2 antagonist/killer 1</b>	BAK1	İleri	TTACCGCCATCAGCAGGAACAG	22	55	62
		Geri	GGA ACTCTGAGTCATAGCGTCG	22	55	62
<b>Cyclin dependent kinase inhibitör 1A</b>	CDKN1A (p21)	İleri	TCTCAGGGTCGAAAACGGCG	20	60	61
		Geri	TGTGGGCGGATTAGGGCTTC	20	60	61
<b>E2F transcription factor 1</b>	E2F1	İleri	GCTCTCCGAGGACACTGACA	20	60	61
		Geri	GCAGGGTCTGCAATGCTACG	20	60	61
<b>Tumor necrosis factor</b>	TNFA	İleri	TCTCGAACCCCGAGTGACAA	20	55	59
		Geri	TATCTCTCAGCTCCACGCCA	20	55	59
<b>Beta actin</b>	ACTB	İleri	GCTCACCATGGATGATGATATCGC	24	50	63

	Geri	ATAGGAATCCTTCTGACCCATGCC	24	50	63
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	İleri	ACTCCTCCACCTTTGACGCT	20	55	59
	GAPDH				
	Geri	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	21	57	62

qPCR ardından, spesifik olmayan amplifikasyon kontrolü için, oluşan amplikonların ayrılma eğrisi (“dissociation curve”) analizi; 95°C 15 saniye, 60°C 1 dakika, 95°C 15 saniye süreyle inkübe edilerek, 60°C’den 95°C’ye ısınma hızı saniyede 0,15°C olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimin analizi rölatif kantifikasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon seviyelerindeki küçük fizyolojik değişimlerin araştırılması için çok uygun bir araç olan bu yöntemle, örnekler arasında kararlı olarak eksprese olan bir genin mRNA seviyelerindeki değişiklikler belirlenmekte ve başka bir genin mRNA seviyelerine rölatif olarak ifade edilmektedir. Rölatif kantifikasyon ile herhangi bir kalibrasyon eğrisine veya bilinen konsantrasyonlardaki standartlara ihtiyaç duyulmaksızın, dizisi bilinen herhangi bir transkript referans olarak kullanılabilir (Bustin, 2002). Genellikle, hücreler arasında kararlı olarak eksprese olan (“housekeeping”) genler referans gen olarak seçilmektedir (Morse vd., 2005). Ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için genlerin  $C_T$  değerleri arasındaki fark belirlenmekte ve bu yöntem “ $\Delta C_T$  yöntemi” olarak isimlendirilmektedir. Yöntemin bir ileri basamağında, uygulama verilmeyen kontrol, başlangıç zaman noktası veya sağlıklı bireyler gibi ikinci bir rölatif parametre eklenerek, yöntemin karmaşıklığı ve doğruluğu bir miktar daha artırılabilir ve “ $\Delta\Delta C_T$  yöntemi” olarak isimlendirilmektedir (Livak ve Schmittgen, 2001). Tez çalışması kapsamında rölatif kantifikasyon analizi için kullanılan denklemler aşağıda verilmiştir (Denklem 3.7., 3.8., 3.9.)

$$\Delta C_T = C_T (\text{hedef gen}) - C_T (\text{referans gen}) \quad (3.7.)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{deneysel örnek}) - \Delta C_T (\text{kontrol örnek}) \quad (3.8.)$$

$$y = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3.9.)$$

Aynı zamanda deneysel hatanın kontrol edilerek optimal rölatif ekspresyon sonuçlarına ulaşılabilmesi amacıyla uygun normalizasyon stratejilerinin takip edilmesi gerekmektedir. Deneysel varyasyonlar, RNA ekstraksiyonu, ekstrakte edilen RNA'nın saklanması, işlenmesi, PCR kurulumu ve PCR koşulları sırasında oluşabilmektedir. Bu sebeple rölatif karşılaştırmaların ekstrakte edilen RNA miktarı, analiz edilen doku miktarı veya hücre sayısı bakımından sabit tutularak yapılması gerekmektedir (Skern vd., 2005). Bu sebeple eşit başlangıç koşullarından emin olunması amacıyla rölatif ekspresyon verisi ekstrakte edilen RNA miktarına göre ayarlanmıştır.

### **3.10. Fonksiyonel Aktivitenin Translasyon Seviyesinde Analizi**

Kantitatif PCR analizi sonucunda ifadesi kontrol grubuna göre artmış veya azalmış olan genlerin rol aldığı moleküler yollarda (hücre döngüsü, intrinsik/ekstrinsik apoptoz, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), inflamasyon) efektör olarak yer alan proteinlerin ifade edilme oranları araştırılmıştır. Böylece peptidin etki ettiği yolların kestirimini doğruluğu artırılması planlanmıştır. Bu sebeple çalışmanın bu basamağında protein seviyesinde kontrol, qPCR analizi sonucunda peptidin etki ettiği kestirimi yapılan yollarda anahtar nitelik taşıyan 1 adet house-keeping protein ( $\beta$ -aktin) ve 9 adet efektör protein olmak üzere 10 adet protein ile gerçekleştirilmiştir.

#### **3.10.1. Hücre kültüründen total protein izolasyonu**

Hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür flaklarına 8x10<sup>5</sup> hücre/flask olacak şekilde ekilmiş, 24 saat sonra etkin peptidin ilgili dozları uygulanmıştır. 24 saat süreyle etkin peptid varlığında ve yokluğunda inkübe edilen hücrelerin, inkübasyon süresi sonunda besi ortamları aspire edilmiştir. Hücre tabakası 2 kez soğuk PBS (4 °C) ile yıkanmıştır. Flaklara 50 mM Tris-HCl, pH: 7,4, 150 mM NaCl, %0,25 deoksikolik asit, %1 NP-40, 1mM EDTA içeren RIPA lizis tamponu (Merck, Millipore) ve 500  $\mu$ M AEBSF, 150 nM aprotinin, 1  $\mu$ M E-64 proteaz inhibitör, 0,5 mM EDTA, 1  $\mu$ M leupeptin içeren proteaz inhibitör kokteyli (Calbiochem, Millipore) karışımı (4 °C) ilave edilerek buz üzerine alınmıştır. Hücre kazıyıcı ile yüzeyden kaldırılan hücreler mikrosantrifüj tüplerinin içinde toplanmıştır. Hücre ekstraktları buz üzerinde ara ara vortekslenerek 15 dakika süreyle



inkübe edildikten sonra 13000 rpm 4°C’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Protein içeren süpernatantlar yeni mikrosantrifüj tüplerinde toplanmıştır. Protein miktarı ölçümü için Qubit florometre cihazında (Thermo Scientific) “Qubit™ Protein Assay Kit” kullanılmıştır. Protein konsantrasyonları, üreticinin talimatlarına göre kitin içeriğinde bulunan standartlar kullanılarak ölçülmüştür. Örnekler, kullanılana kadar -80 °C’de saklanmıştır.

### 3.10.2. Western blot

Örnekler -80 °C’den çıkarılıp buz üzerinde 4 °C’de çözünmesi sağlanmıştır. Her bir örnekten 40 µg protein, “10X Bolt™ Sample Reducing Agent” (Thermo Scientific) (500 mM DTT) ve “4X Bolt™ LDS” Sample Buffer (Thermo Scientific) (lithium dodecyl sulfate- LDS, pH: 8,5, SERVA Blue G-250, phenol red, glycerol) içinde hazırlanarak 70 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından hızlıca buz üzerine alınmıştır. İndirgenmiş protein ekstraktlarının elektroforezi için örnekler “Bolt™ 4 -12%, Bis-Tris, 1.0 mm Mini Protein Gel” (Thermo Scientific) (pH: 7) kuyularına yüklenmiş ve “Bolt™ MES SDS Running Buffer” (Thermo Scientific) yürütme tamponu hem anot hem katot haznelerine doldurulmuştur. 200 V voltaj altında 20 – 25 dakika süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez bittikten sonra, proteinler poliviniliden diflorid (PVDF) membran üzerine 30 dakika boyunca sabit 10V voltaj akım uygulanarak elektro-transfer edilmiştir (iBlot® Dry Transfer Cell, Thermo Scientific). Transferden sonra membran %0,1 Tween-20 içeren 1X TBS (Tris-buffered saline) tamponu (TBST, pH: 7,4) içinde 10 dakika yıkanmış ve bloklama tamponu (TBST içinde %5 BSA) içinde, orbital çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından, membranlar 1:1000 dilüsyonda bloklama tamponu içinde bulunan primer antikorlar ile gece boyu 4°C’de orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra membran 1:2000 dilüsyonda HRP (horse radish peroksidaz) ile konjuge anti-rabbit sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Son olarak membran TBST ile yıkanarak artırılmış kemilüminesans (ECL) kiti ile boyanmıştır (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). Western blot bantlarının intensiteleri C-DiGit (Li-Cor Biosciences) blot tarayıcı ve dansitometresi kullanılarak ölçülmüştür. Çalışma kapsamında kullanılan antikorların listesi Çizelge 3.2.’de verilmiştir (Cell Signaling Technologies).

Çizelge 3.2. Tez çalışması kapsamında kullanılan primer antikolar, büyüklükleri ve rol aldığı ilişkili yollar.

Hedef protein	Kısaltma	Büyüklük (kDa)	Görev aldığı yolak
Epitelyal cadherin	E-cadherin	110	EMT
Vasküler endotelial büyüme faktörü 2	VEGFR2	210, 230	İnvazyon & metastaz
Kaspaz-9	C9	10, 57	Apoptoz (ekstrinsik)
Fas ligandı	FASLG	40	Apoptoz (ekstrinsik)
Sitokrom c	CytC	14	Apoptoz (intrinsik)
TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand	TRAIL	28-30	Apoptoz (intrinsik)
Siklin A2	CCNA2	55	Hücre döngüsü
Siklin E1	CCNE1	51	Hücre döngüsü
Siklooksijenaz-2	Cox-2	74	İnflamasyon

Blot membranları ilk olarak hedef protein için boyanmıştır. Hedef protein görüntülemesi ve analizi gerçekleştirildikten sonra aynı membranlarda stripleme işlemi gerçekleştirilerek “housekeeping” proteinler için boyama ve analiz gerçekleştirilmiştir.

### 3.11. Peptidin Biyokimyasal Yapı Tayini

Çalışmanın bu aşamasında seçilen peptidin aminoasit diziliminin belirlenmesi, kütle spektrometresi ile molekül ağırlığının belirlenmesi çalışmaları, hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yöntemler aşağıda açıklanmıştır.

#### 3.11.1. Edman degradasyonu ile peptid birincil yapısının belirlenmesi

Peptidlerin, Edman reaksiyonu kullanan protein dizilim belirleyici cihazına yüklenmesi ile amino asit dizilimleri belirlenmiştir.

### 3.11.2. Kütle spektrometresi ile molekül ağırlığının belirlenmesi

HPLC'den alınan fraksiyonlar %1 Asetik asit içeren 50/50 asetonitril/su çözeltisinde yaklaşık olarak 0,5 – 1 µg protein içerecek şekilde seyreltildikten sonra 5 µl olarak kütle spektrometresine uygulanmıştır. NanoESI kaynağı 1,60 kV ve kapiler sıcaklık 130 °C olarak ayarlanmıştır. Enstrüman kontrolü, verilerin alınması ve analizi üretici firma tarafından sağlanan Xcalibur yazılımı (sürüm 1.4) ile gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometresi verileri Tune Plus program modülü ile sağlanan gerçek zamanlı görüntüleme ile pozitif iyon modunda toplanmıştır (Diego-García vd., 2007).

### 3.11.3. Peptidin Biyoinformatik Olarak Kestiriminin Yapılması

Elde edilen aminoasit dizilimi, fonksiyon benzerliğinin araştırılması için diğer arılardan izole edilen toksin peptidlerin amino asit dizilimleri ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma için güncel bir protein veri tabanı ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk), <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, <http://www.expasy.ch/sprot/>) seçilerek gerçekleştirilmiştir.

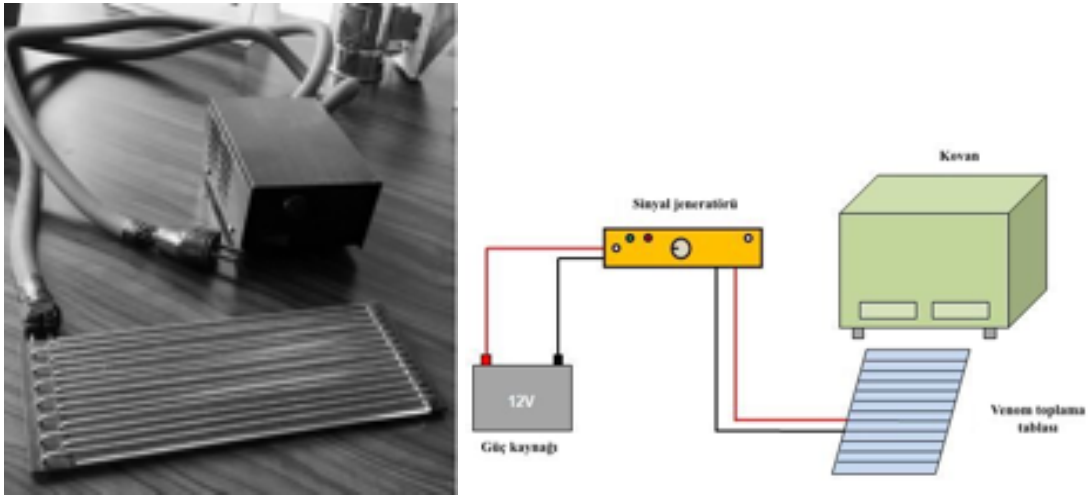
### 3.12. Verilerin İstatistiksel Analizi

Her bir analiz, aksi belirtilmediği durumlarda en az üç farklı teknik ve biyolojik tekrar yapılarak gerçekleştirilmiş ve veriler ortalama  $\pm$  S.H. (standart hata) olarak sunulmuştur. Elde edilen veriler GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Veri setlerinin gösterdiği dağılım analiz edilmiş; dağılıma göre ilgili istatistiksel test yöntemi seçilmiş ve deney grupları arasındaki farkların anlam düzeyleri araştırılmıştır. Gruplar arası farklar  $p > 0,05$  iken ns,  $p \leq 0,05$  iken \*,  $p \leq 0,01$  iken \*\*,  $p \leq 0,001$  iken \*\*\*,  $p \leq 0,0001$  iken \*\*\*\* olarak ifade edilmiştir. Tüm analizler %95 güven aralığında gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Arılardan Ham Venom Elde Edilmesi

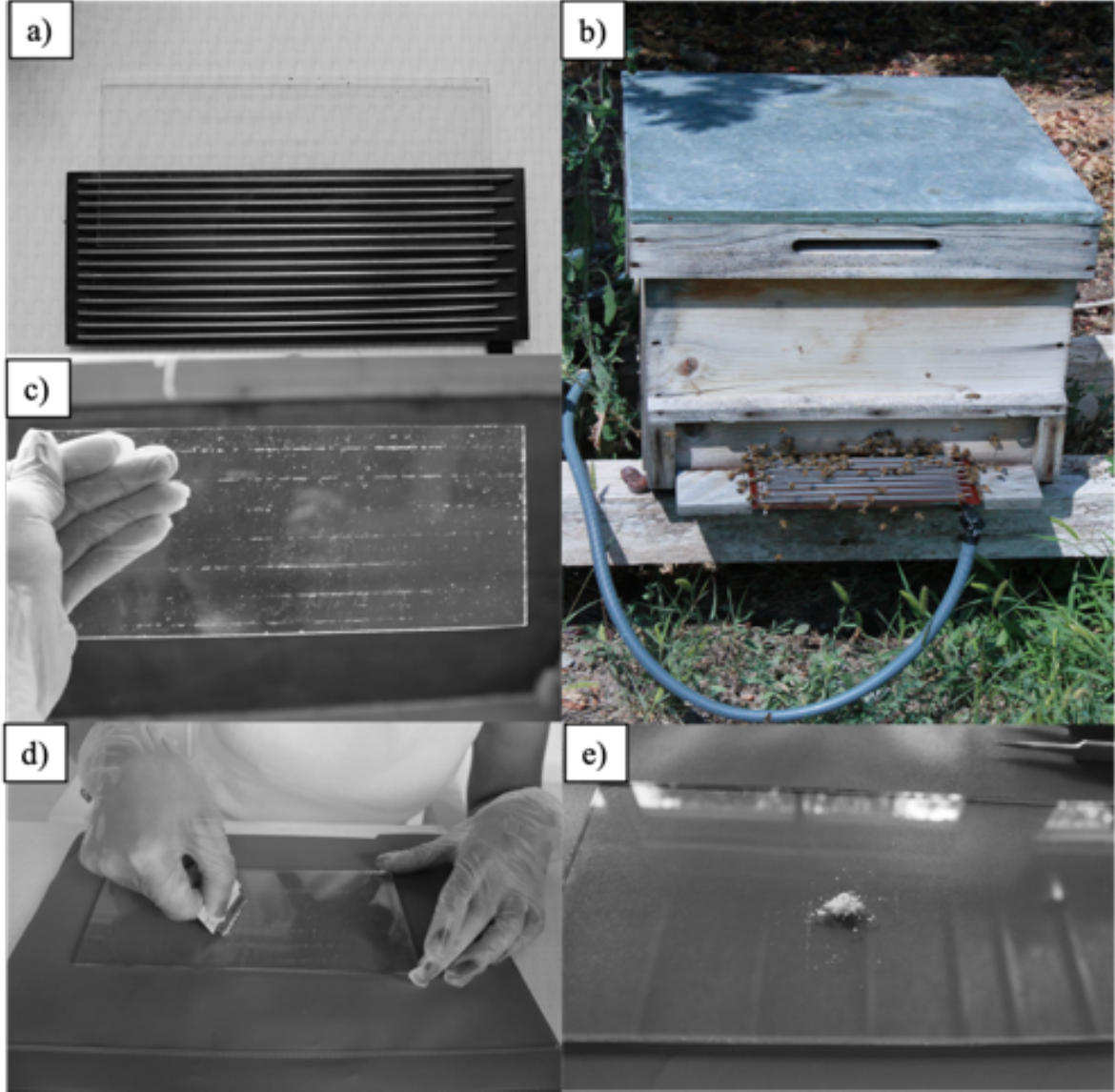
Tez çalışması kapsamında kullanılacak ham venom örnekleri *Apis mellifera anatoliaca* ırkı arı kolonilerine ait kovanların, kovan başında elektriksel stimülasyonla sağımı yoluyla elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında tasarlanan venom toplama aparatı ve diyagramı Şekil 4.1.'de verilmiştir. Aparatın venom toplama tablası, kovanın uçuş tahtasına yerleştirildikten sonra 12 V'luk elektrik akımı 2 sn'lik aralıklar ve 2 sn'lik sürelerle 1 saat boyunca çalıştırılarak sağım işlemleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2.). Sağımdan sonra venom toplama tablasının cam levhası üzerinde toz kristaller halinde birikmiş olan venom, bir jilet yardımıyla kazınarak mikrosantrifüj tüp içine toplanmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. Tez çalışması kapsamında tasarlanan ve yaptırılan venom toplama aparatı ve şematik gösterimi.

Tez çalışması kapsamında ham venom eldesi için 2017 temmuz-ağustos ve 2019 eylül olmak üzere 2 farklı dönemde, sırasıyla damızlık erkek arı kolonileri ve bal yapan koloniler ile arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen arazi çalışmalarında bir kovandan aynı günde tekrar sağım yapmamak kaydıyla, 2017 yılında 12 kovandan

örnekleme yapılmış, bu 12 kovandan toplam 62 kez sağım yapılmıştır. 2019 yılında gerçekleştirilen arazi çalışmasında ise, 10 kovandan toplam 18 kez sağım yapılmıştır.



Şekil 4.2. Ham arı venomunun toplanması. a) Venom toplama tablası, b) kovan girişindeki uçuş tablasına yerleştirilerek sağım gerçekleştirilir. c) Venom toplama tablasının cam haznesi üzerinde beyaz kristaller olarak toplanan ham venom, d) bir jilet yardımıyla yüzeyden kazınarak toplanır, e) sonuçta beyaz bir toz elde edilir.

Elde edilen ham venom örnekleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı'na getirildikten sonra ham venom içindeki peptid karışımı elde edilmiş ve protein miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Peptid karışımı eldesi sonucunda 2019

yılında gerçekleştirilen arazi çalışması sonucu elde edilen protein miktarları örnek olması için Çizelge 4.1.'de detaylıca verilmiştir.

Çizelge 4.1. ANG Vakfı Orta Anadolu Arılığı'nda bulunan bal yapan toplam 10 koloninin sağılmasından elde edilen venom protein miktarları

Örnek Etiketi	Toplanma Tarihi	Koloni Bilgisi	Miktar (mg)
2019-1	09/2019	Koloni 1	10,231
2019-2	09/2019	Koloni 5	5,4403
2019-3	09/2019	Koloni 7	2,2836
2019-4	09/2019	Koloni 11	8,8333
2019-5	09/2019	Koloni 3	6,2932
2019-6	09/2019	Koloni 4	2,4949
2019-7	09/2019	Koloni 6	1,9746
2019-8	09/2019	Koloni 9	1,0284
2019-9	09/2019	Koloni 70	2,5658
2019-10	09/2019	Koloni 14	1,3734
2019-11	09/2019	Koloni 1	0,7583
2019-12	09/2019	Koloni 5	0,4341
2019-13	09/2019	Koloni 7	2,2433
2019-14	09/2019	Koloni 11	0,6859
2019-15	09/2019	Koloni 3	1,0133
2019-16	09/2019	Koloni 4	1,0005
2019-17	09/2019	Koloni 6	0,4216
2019-18	09/2019	Koloni 9	0,9390
Toplam			50,015

Çizelge 4.1. incelendiğinde her koloninin venom veriminin farklı olduğu görülmüştür. Bunun yanında aynı koloninin 48 saat aralıklarla gerçekleştirilen iki farklı sağım veriminin de farklı olduğu, çalışılan çoğu koloninin sağım veriminin ikinci sağımda düştüğü gözlenmiştir.

Elektrostimülasyon yöntemi ile arılardan venom sağımı literatürde ilk defa rapor edildiği günden bu yana, arılar bu yöntemle sağıldıktan sonra canlı kaldıkları, iğnelerini kaybetmedikleri ve normal işleyişlerine devam edebildikleri için en güvenli venom sağım yöntemi olarak değerlendirilmektedir (Markovic ve Mollnar, 1954; de Graaf vd., 2021). Arıların sokma, sokmaya teşebbüs etme veya sadece kovanın uyarılması sonucu bir miktar da olsa venom kaybettikleri bilinmekte ve bu kaybedilen venomun yenilenerek yerine konması gerekmektedir. Owen (1978)'in arı venomu yenilenmesi ile ilgili literatürde ilk örneği olarak gerçekleştirdiği çalışmada, farklı yaşlardaki işçi arılar elektrostimülasyon ile tek tek sağılarak, sağımdan sonra değişen sürelerde venom bezlerinde bulunan histamin miktarı üzerinden venom yenilenmesi takip edilmiştir. Çalışma sonucunda arıların venom yenilenmesi gerçekleştirdiği, deneysel koşullarda venomun maksimum oranda tekrar sentezlenmesi için gerekli sürenin 2 gün olduğu ve venom yenilenmesinin işçi arının yaşına bağlı olarak değişiklik gösterdiği (15 günlük işçilerde maksimum iken, 40 günlük işçilerde hiç gerçekleşmediği) rapor edilmiştir. Aynı zamanda venom yenilenmesinin hiçbir zaman kontrol grupları seviyesine gelmediği, yani tamamen gerçekleşmediği de belirtilmiştir. Ancak yine aynı çalışmada, bu sonuçların arıların venom yenilenmesi için kafeslerde su, polen ve bal ile iyi bir şekilde beslenerek bakıldığı deneysel koşullarda alındığı, doğal koşullarda venom yenilenmesi için gerekli olan bu kaynakların sınırlı olması veya farklı sebepler ile arıların stres altında olması sebebiyle miktar, kalite ve hız bakımından aynı sonuçların alınamayabileceği vurgulanmıştır. Elektriksel stimülasyon ile arılardan venom sağımının venom bezi histolojisi ve protein içeriği üzerindeki etkilerinin araştırıldığı daha kapsamlı bir diğer çalışmada 7, 14, 21, 28, 35 ve 40 günlük işçi arılar elektrik şokundan 0, 24, 48 ve 96 saat sonra örneklenmiştir (Abreu vd., 2000). Bu çalışma sonucunda elektriksel stimülasyonla sağımı takip eden 96 saat sonra venom bezinde kontrol gruplarına kıyasla histolojik olarak herhangi bir değişikliğin gözlenmediği ve aynı zamanda işçi arıların yaşından bağımsız olarak 96 saat içinde venom protein içeriğinin kontrol seviyelerine ulaşmadığı, çok düşük seviyelerde kaldığı rapor edilmiştir. Tez çalışması kapsamında art arda sağılan bazı kolonilerde venom protein miktarındaki azalış (Çizelge 4.1.) yukarıda özetlenen çalışmaların çıktılarıyla desteklendiği üzere literatür ile uyumlu görülmektedir. Kolonilerin venom verimi sağımın yapıldığı mevsime, sağımın gerçekleştirildiği saate, kolonideki işçi arı popülasyonunun dağılımına, kovanda gelişmekte olan yavru miktarına göre değişiklik gösterebildiği için farklı kovanlar arasındaki protein miktarı farklılığı anlamlıdır. Bunun yanında literatürde farklı venom

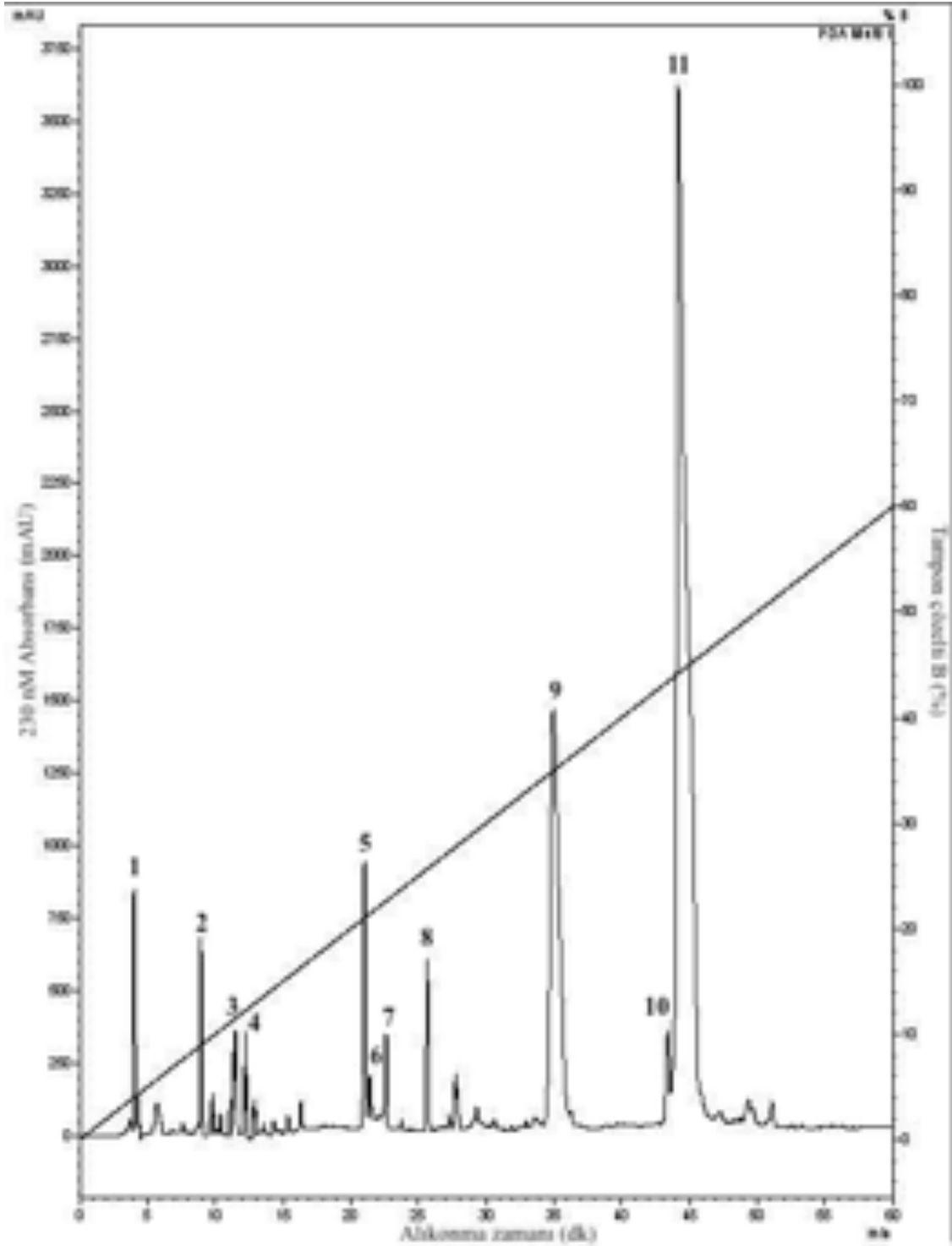
sağım cihazları ve çalışma gruplarının rapor ettiği 15, 14 ve 3 gün veya ayda 3 – 4 defa olmak üzere optimum venom sağım aralıklarının belirtildiği çalışmalar mevcuttur (Sanad ve Mohanny, 2013; Bogdanov, 2016). Yukarıda anlatılan diğer çalışmaların çıktıkları ile bu bilgiler bir arada değerlendirildiğinde venom veriminin değişiklik göstermemesi için optimal olarak belirtilen bu sürelerin gelişmekte olan yavrulardan oluşan yeni işçi arıların popülasyona katılması sonucu elde edilebileceği düşünülmüştür. Ancak bu konunun detaylı olarak aydınlatılması tez çalışması kapsamında olmayıp, farklı bir çalışmanın konusu olarak değerlendirilmiştir.

#### **4.2. Arılardan Elde Edilen Ham Venomun Kromatografik Profilinin Belirlenmesi**

Tez çalışması kapsamında elde edilen ham venom örnekleri, yöntemi ilgili bölümde detaylı olarak anlatıldığı şekilde toplam 94 adet farklı ters faz HPLC (RP-HPLC) yöntemi ile bileşenlerine ayrılmıştır. Her bir kromatografik yürüyüşte aynı kromatografik profil elde edilmiştir. Ham venom profilinin gösterilmesi amacıyla rastgele seçilen ID 410 nolu RP-HPLC yürüyüşüne ait kromatogram Şekil 4.3.'de verilmiştir. Kromatogramda farklı alıkonna zamanları ile ( $R_T$ ) birbirinden ayrılan her bir pik bir fraksiyona karşılık gelmektedir ve her bir fraksiyonun 230 nm'de kaydedilen absorbands değerinin yoğunluğu bu fraksiyonun venomda bulunma miktarı ile orantılıdır.

Kromatografik ayrımlar sırasında “kolona en az 1 mg ham venom yüklendiğinde 230 nm'deki absorbandsı 200 mAU üzerinde kalan” fraksiyonlar majör fraksiyonlar olarak belirlenmiştir. Buna göre *A.m.anatoliaca* ham venomu RP-HPLC ile ayrıştırıldıktan sonra elde edilen kromatografik profile göre, Şekil 4.3.'de 1'den 11'e kadar işaretlenmiş olan 11 adet majör fraksiyon belirlenmiştir. Seçilen majör fraksiyonların *Apis mellifera anatoliaca*'yı referans gösterecek şekilde “Ana” olarak isimlendirilmesine karar verilmiştir. Bununla birlikte; kromatogram incelendiğinde birbirinden farklı en az 25 fraksiyon bulunduğu görülmüştür.





Şekil 4.3. *Apis mellifera anatoliaca* ham venomunun 0 – 60 %B metoduyla ayrıştırılmış RP-HPLC kromatogramı. Majör fraksiyon olarak seçilen “Ana” fraksiyonlar kromatogram üzerinde 1’den 11’e kadar numaralandırılarak gösterilmiştir.

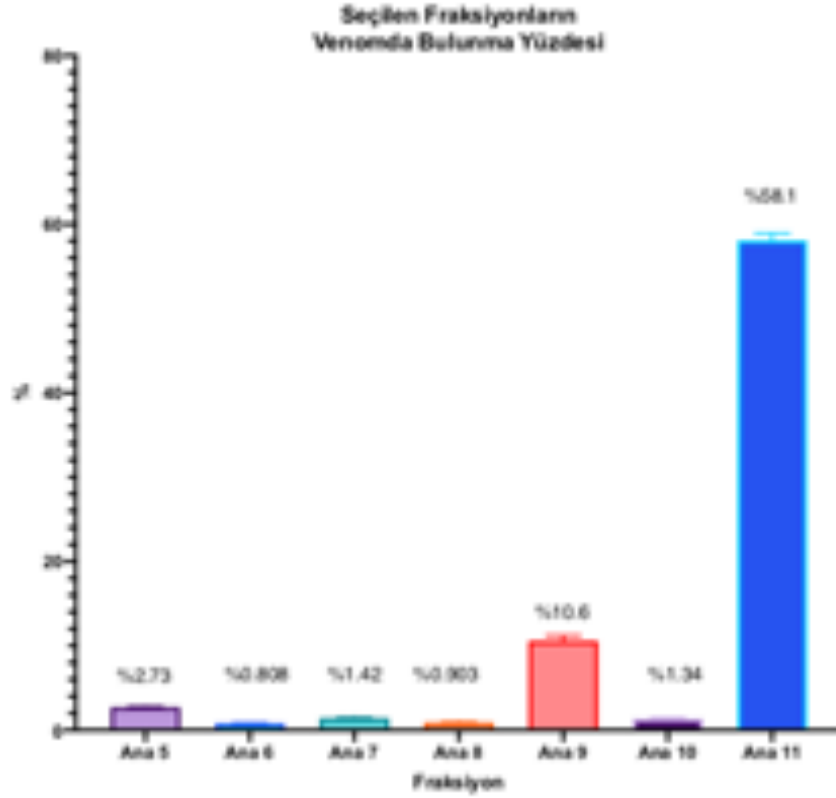
Majör fraksiyonlar 230 nm’deki absorbansın 10 mAU üzerine çıktığı andan andan itibaren bir tüp içinde toplanmaya başlanmış, maksimum absorbansın alındığı dakikayla ifade edilen alıkonma süresi ile etiketlenmiş ve absorbansın 10 mAU altına düştüğü an

itibari ile fraksiyonun toplanması bırakılarak HPLC kolonundan geri toplanmıştır. Böylece her bir fraksiyon peptid karışımı içinden ayrılmıştır. Toplanan fraksiyonların vakum konsantratörde çözücüsü uzaklaştırılarak kurutulmuştur. Toplanan fraksiyonlardaki protein miktarı, ayırım için kolona yüklenen peptid karışımı miktarı göz önünde bulundurularak, fraksiyona ait pikin HPLC kromatogramından elde edilen pik alanı hesaplanarak gerçekleştirilmiştir.

Literatürde *Apis mellifera* ham venomunun RP-HPLC ile bileşenlerine ayrıldığı çalışmalar incelendiğinde, arıların ırkı, kullanılan hareketli faz gradienti, kullanılan kolonların özellikleri, kolona yüklenen venom miktarı, ayırım süresi ve akış hızı farklı olsa da hareketli faz olarak %0,1 TFA sulu çözeltisi ve %0,1 TFA asetonitril çözeltisi ve C18 kolonlar kullanılarak gerçekleştirilen ayırımların kromatogram profillerinde alıkonma sürelerine göre sırasıyla apamin, fosfolipaz A2 ve melittine karşılık gelen belirgin 3 adet pikin varlığı gözlenmektedir (Kokot ve Matysiak, 2009; Mahmoodzadeh vd., 2015; Sobral, vd., 2016; Teoh vd., 2017; Frangieh vd., 2019). Tez çalışması kapsamında elde edilen kromatogramda da sadece kromatogram profiline bakılarak bu belirgin 3 pikin 1, 9 ve 11 olarak belirtilen fraksiyonlara karşılık gelebileceği düşünülmüş olup literatür bilgisiyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.3.). Bunun yanında, tez çalışması kapsamında kullanılan ile neredeyse tamamen aynı yöntem (0 – 60 %B doğrusal gradient ile 60 dakika süresince 1ml/dk. akış hızı ve C18 kolon) ile ayrıştırılmış olan *Apis mellifera* ham venom RP-HPLC kromatogram profilleri, tez çalışması kapsamında elde edilen ile karşılaştırıldığında özellikle 15. dakikadan sonra elde edilen piklerin alıkonma süreleri ve rölatif absorbanları bakımından oldukça yüksek benzerlik göstermektedir (Şekil 4.3.) (Mahmoodzadeh, vd., 2015; Zarrinahad vd., 2018).

Toplamda gerçekleştirilen 94 adet RP-HPLC ayırımından elde edilen verilere göre, bir sonraki bölümde sebepleri açıklandığı üzere tez çalışması kapsamında değerlendirilecek her bir majör fraksiyonun venomda bulunma yüzdesi hesaplanmış ve Şekil 4.4.'de ortalama değerler ortalamanın standart hatası ile birlikte verilmiştir. Buna göre Ana 11 fraksiyonu %58,1 ve Ana 9 %10,6 ile venomda bulunma yüzdesi en yüksek iki fraksiyon olarak belirlenmiştir. Bunları %2,73, %1,42, %1,34, %0,90, %0,81 ile sırasıyla Ana 5, Ana 7, Ana 10, Ana 6 ve Ana 8 takip etmektedir. Tez çalışması

kapsamında değerlendirilecek bu 7 fraksiyon ise toplamda ham venomun %75'ini oluşturmaktadır.



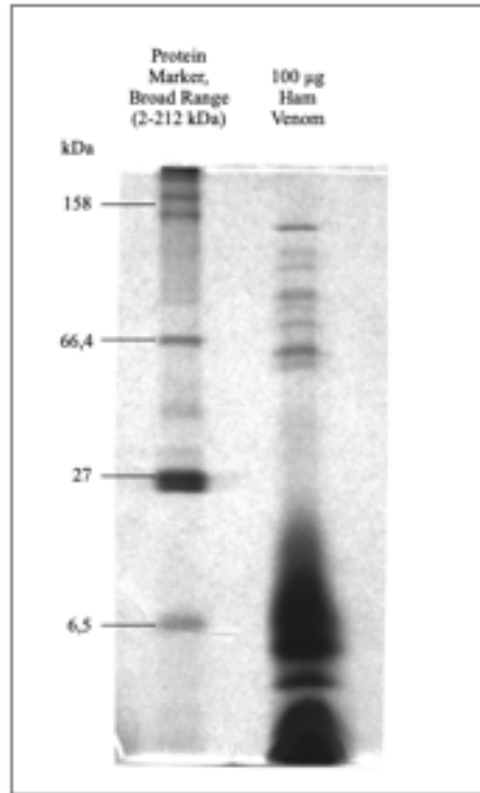
Şekil 4.4. Tez çalışmasının bundan sonraki aşamalarında çalışmaya devam edilecek majör fraksiyonların venomda bulunma yüzdesi.

### 4.3. Ham Venom ve Majör Fraksiyonların Elektroforetik Profilinin Belirlenmesi

*Apis mellifera anatoliaca* ham venomunun elektroforetik profili Tris-Glisin SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.5.).

SDS-PAGE ile ayrıştırılan ham venom profiline bakıldığında 158 – 66,4 kDa arasında en az 6, 66,4 – 27 kDa arasında ise 2'si belirgin olmak üzere 3 farklı farklı protein bileşen olduğu görülmektedir (Şekil 4.5.). *A.m.lamarcki* ve *A.m.carnica* ham venomlarının SDS-PAGE profilleri karşılaştırılarak benzerliklerinin araştırıldığı bir çalışmaya göre 66,4 kDa'dan büyük olan proteinlerin, her iki ırkta da ortak olarak bulunduğu belirlenen ve muhtemelen tüm *Apis mellifera* ırklarında bulunan asit fosfataz ve asit fosfomonoesteraz

enzimlerine ait olabileceği düşünülmektedir (Zalat vd., 2002). *A.m.ligustica* ham venomu ile gerçekleştirilen bir diğer proteomik çalışmaya göre ise tespit edilen venom toksinlerinden dipeptidilpeptidaz ve karboksilesteraz bu 158 – 66,4 kDa aralığındaki bölgede bulunmaktadır (Li vd., 2013). 66,4 – 27 kDa aralığında gözlenen iki bantın ise içerdiği karbonhidrat gruplarına göre molekül ağırlığı 35 – 53 kDa arasında değişen hyaluronidaz ve asit fosfataz enzimlerine ait olabileceği düşünülmektedir (Zalat, vd., 2002; Li, vd., 2013; Moreno ve Giralt, 2015; Zolfagharian vd., 2015; Teoh, vd., 2017). 27 – 6,5 kDa arasında görülen yoğun bantların molekül ağırlığı literatürde 14 – 20 kDa aralığında belirtilmiş olan fosfolipaz A2 enzimi ve 8 – 10 kDa aralığındaki proteaz inhibitörü ve icarapin peptidi veya prekürsörüne ait olabileceği düşünülmektedir (Zalat, vd., 2002; Li, vd., 2013; Teoh, vd., 2017; Zidan vd., 2018). Şekil 4.5. incelendiğinde ham venomun büyük bir kısmını 6,5 kDa'dan küçük protein bileşenlerin oluşturduğu görülmektedir. Bu bölgede çok yüksek oranda melittin (2,8 kDa), apamin (5,5 kDa) ve mast hücresi degranüle edici peptidin (6 kDa) bulunduğu düşünülmektedir.

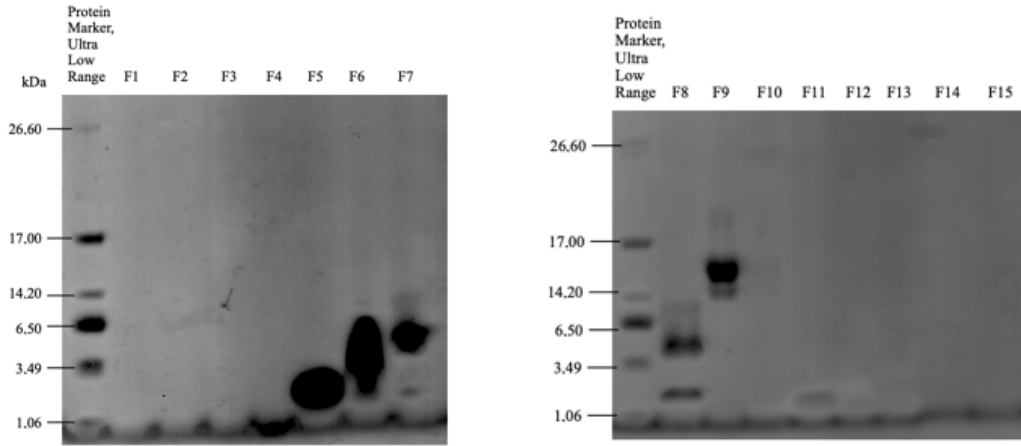


Şekil 4.5. *Apis mellifera anatoliaca* ham venomu SDS-PAGE profili.

Proteomik analiz tekniklerinin gelişmesi ile birlikte yakın zamanda yapılan bir çalışma ile bal arısı ham venomunun içeriğinde 102 adet protein ve peptid bileşen bulunduğu belirlenmiştir (Van Vaerenbergh, vd., 2014). SDS-PAGE analizinin çözünürlüğü bu yöntemlerle kıyaslanamayacak kadar düşük olduğundan elektroforetik profilde ham venom içinde ancak belirli bir yüzdenin üzerinde bulunan peptid ve proteinlerin analizi gerçekleştirilebilmektedir (Carpena vd., 2020). Sonuç olarak, bal arısı venomunun majör toksik etkilerinden sorumlu olduğu düşünülen küçük moleküler ağırlıklı peptidlerin bal arısı venomu içindeki bulunma miktarının bir kalite belirteci olduğu göz önünde bulundurularak, elde edilen verilerin literatürdeki *Apis mellifera* ham venomu protein jel elektroforez analizleri ile uyumluluk gösterdiği belirlenmiştir. (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2013; Danneels vd., 2015; Sobral, vd., 2016; Abrantes vd., 2017).

Ters faz-HPLC ile elde edilen majör fraksiyonların saflığının kontrolü ve molekül ağırlıklarının yaklaşık olarak belirlenmesi için de SDS-PAGE analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak klasik Tris-Glisin SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Ancak bu yöntemle ham venomun ayrıştırılmasında sonuç alınmasına karşın ham venom fraksiyonları için sonuç alınamamış, tüm fraksiyonlardaki proteinler elektroforez sırasında jelden çıkmış veya bant elde edilememiştir (Veri gösterilmemiştir.). Bu da fraksiyonları oluşturan proteinlerin oldukça küçük moleküler ağırlıklı olduğu konusunda bir öngörü sağlamıştır. Diğer yandan ham venom analizi için jele 100 µg madde yüklenebilirken, fraksiyonlar çalışılırken bu miktar çok düşük olduğundan (5 µg), jel ve boyama yönteminin çözünürlüğünün görünür bantların elde edilmesi için yeterli kalmamış olabileceği düşünülmüştür. Küçük moleküler ağırlıklı protein/peptidleri içeren ham venom fraksiyonlarının elektroforetik analizi için daha küçük molekül ağırlıklı proteinlerin analizinde kullanılan Tris-Trisin SDS-PAGE yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Ham venomun detaylı elektroforetik profilinin çıkarılması amacıyla 60 dakikalık kromatografik ayırım sırasında 4'er dakika aralıklarla toplanan fraksiyonlar da (F1 – F15) denatüre edici Tris-Trisin SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.6).

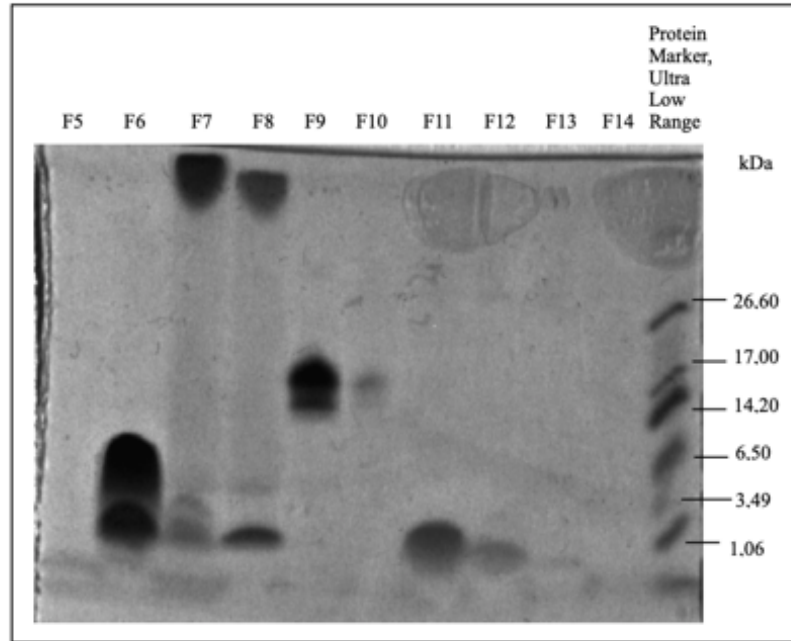


Şekil 4.6. *Apis mellifera anatoliaca* ham venomundan elde edilen peptid karışımının kromatografik ayrımı süresince her 4 dakikada bir toplanan fraksiyonların (F1 – F15) denatüre edici Tris-Trisin SDS-PAGE görüntüleri. a) Kromatografik ayrımın ilk 28 dakikasına ait 7 fraksiyon (F1 – F7), b) kromatografik ayrımın son 32 dakikasına ait 8 fraksiyon (F8 – F15). Her bir kuyuya 5 µg fraksiyon yüklenmiştir.

Elektroforez görüntüsü (Şekil 4.6.) incelendiğinde ilk dört fraksiyona ait herhangi bir protein bandının bulunmadığı görülmektedir. Kromatogramın ilk 16 dakikasına denk gelen bu dört fraksiyonun aynı zamanda Ana 1, 2, 3, 4 olarak belirlenen majör fraksiyonları içerdiği göz önünde bulundurulduğunda (Bkz. Şekil 4.3.) Ana 1, 2, 3, 4 olarak isimlendirilen majör fraksiyonların protein/ peptid olmadığı üzerindeki kanıyı güçlendirmiştir. Bu sebeple, tez çalışmasının devam eden aşamalarında bu fraksiyonlar çalışmadan çıkarılmıştır. F5 fraksiyonuna ait kuyuda görülen tek bant, alıkonma zamanı 20. dakika olan Ana 5 majör fraksiyonuna ait olup, bu fraksiyonun tek bir proteinden oluşuyor olabileceği düşünülmüştür. F6 fraksiyonuna ait kuyuda da daha yüksek moleküler ağırlıklı yoğunluğu fazla bir bant ile onun altında daha silik görünen ikinci bir bant olduğu belirlenmiş ve bunlar Ana 6 ve Ana 7 majör fraksiyonları olarak yorumlanmıştır. F7 fraksiyonuna ait kuyuda görülen birden fazla banda bakılarak 24 ile 28 dakikalar arasında Ana 8 dışında başka bir fraksiyon görülmediğinden, Ana 8'in birkaç farklı peptitten oluşan bir fraksiyon veya alt üniteleri olan bir protein olabileceği düşünülmüştür. 28 ile 32 dakikalar arasına ait F8 fraksiyonu kuyusu incelendiğinde belirgin olarak 3 bant görülmekte ancak kromatogramda bu dakikalar arasında belirlenen bir majör fraksiyon bulunmamaktadır. Bu bantların büyük olasılıkla kromatogramda 200 mAU altında kalan diğer fraksiyon veya fraksiyonlara ait olabileceği sonucuna varılmıştır. F9 fraksiyonuna ait olan kuyuda 3 bant görülmekte ve kromatograma göre bu sadece Ana 9'a aittir. Ana 9

fraksiyonunu oluşturan birden fazla peptid veya alt üniteleri olan bir protein olabileceği düşünülmüştür. F10 fraksiyonuna ait kuyuda bant olmaması kromatogram ile de uyumlu olarak değerlendirilmiştir. F11 fraksiyonunu temsil eden 40-44 dakikalar arası tamamen Ana 10 ve 11'den oluşmaktadır. Elektroforez görüntüsünde burada tek bir bant görülmesi ve bu iki majör fraksiyonun kromatogramda da birbirine çok yakın bulunması sebebiyle bu iki majör fraksiyonun belki de birbirinin izoformları olan aynı peptid/ proteine ait olabileceği düşünülmüştür. F12'de görülen bandın Ana 11 fraksiyonunun devamı olduğu, F13 ve F14'de görülen silik bantların da kromatogramdaki majör olmayan diğer fraksiyonlara ait olduğu görülmektedir. 56.dakikadan sonra her iki analizde de görüldüğü gibi protein bulunmamaktadır.

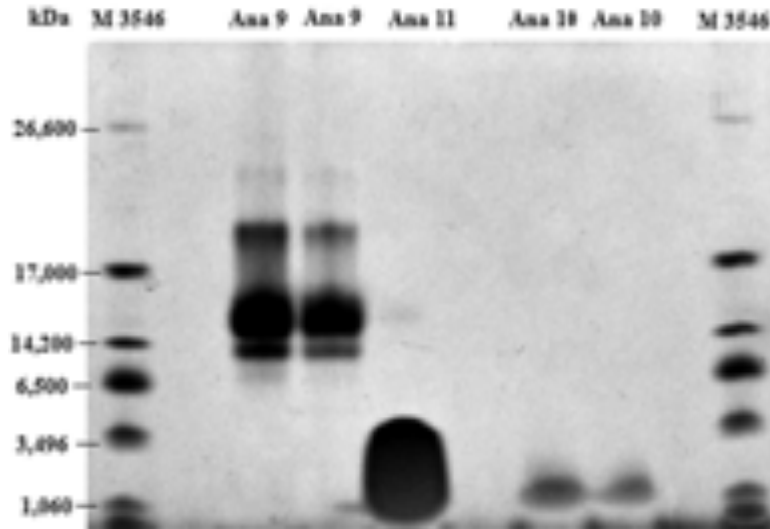
Yapılan analiz sonrasında elde edilen profilin daha ileri yorumlanabilmesi amacıyla denatüre edici jelde bant görülen fraksiyonlar (F1, 2, 3, 4 ve 15 çıkarılmıştır) ile non-denatüre edici Tris-trisin SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. *Apis mellifera anatoliaca* ham venomundan elde edilen peptid karışımının kromatografik ayrımı süresince her 4 dakikada bir toplanan protein içeren fraksiyonların (F5 – F14) non-denatüre edici Tris-Trisin SDS-PAGE görüntüleri. Her bir kuyuya 5 µg fraksiyon yüklenmiştir.

Şekil 4.7. ve Şekil 4.6. karşılaştırmalı olarak incelendiğinde F7, F8 ve F9 fraksiyonlarının iki jel arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ana 8'e ait olduğu düşünülen F7 fraksiyonuna ait kuyu incelendiğinde (Şekil 4.7.) denatüre olmamış hali 26,60 kDa'dan büyük bir bileşenin olduğu, bu bileşenin denatüre olduğunda ise 14,20 ile 3,49 kDa arasında en az iki alt üniteden oluştuğu belirlenmiştir. Benzer şekilde 14,20 kDa ile 3,49 kDa arasında belirgin iki bant gözlenen F8 fraksiyonunun denatüre olmayan halinin 26,60 kDa'dan büyük bir bileşene ait olduğu görülmektedir. Ana 9 fraksiyonuna karşılık gelen F9 fraksiyonuna ait kuyular incelendiğinde ise denatüre edici jelde fazladan yüksek moleküler ağırlıklı en az 1 bant görülmesi, bu fraksiyonu oluşturan peptidlerden en az bir tanesinin disülfid bağları ile birbirine bağlanmış alt birimleri olduğunu ve bu alt birimlerin indirgeyici ajan varlığında oligomerize olabileceğini düşündürmektedir (Matsui vd., 2019).

Bundan sonraki hücre kültür çalışmalarında miktarı fazla olduğu için ilk kullanılacak fraksiyonlar olan Ana 9, 10 ve 11 bu defa 3 kat fazla miktarda olmak üzere denatüre edici Tris-trisin SDS PAGE ile tekrar analiz edilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Majör fraksiyon Ana 9, 10 ve 11'in denatüre edici Tricine-SDS PAGE görüntüleri. Her bir kuyuya 15 µg fraksiyon yüklenmiştir.

Denatüre edici jel Şekil 4.8. incelendiğinde her bir fraksiyonun önceki bulgular ile aynı sonuç verdiği ancak daha belirgin bantlar elde edildiği görülmüştür.

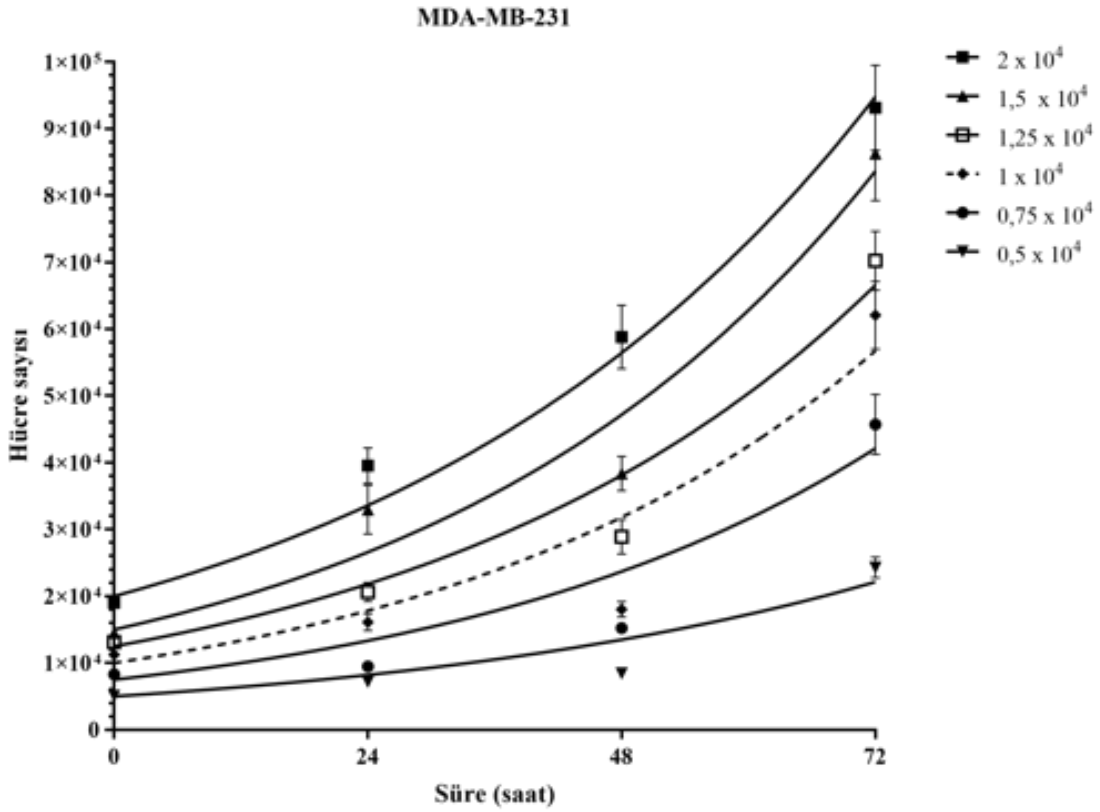


#### 4.4. Çalışma Kapsamında Kullanılan Hücre Hatlarının Büyüme Eğrisinin Çizilmesi

Hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* hüce kültürü çalışmalarında, hücre hatları oldukça iyi karakterize edilmiş ve büyüme koşulları detaylıca belirlenmiş olsa da stoklanma koşulları, kullanılan besi ortamı ve katkılarının formülasyonu, markası, inkübasyon koşulları gibi pek çok çevresel etkene göre büyüme karakteristiğinin değişebildiği bilinmektedir. Çalışmanın ilerleyişi ve sonuçları üzerinde doğrudan etkisi olacağı için, tez çalışması kapsamında kullanılacak MDA-MB-231, MCF-7, MCF-10A hücre hatlarının çalışma koşullarına özgü büyüme karakteristiklerinin belirlenmesi amaçlanarak her birine ait büyüme eğrisi grafikleri çizilmiştir. Bunun dışında hücre hatları alt kültüre alınırken kullanılan başlangıç hücre yoğunluğunun da hem hücre popülasyonunun büyüme karakteristiği hem de hücreler üzerinde yapılacak uygulamanın, kullanılacak ilacın etkisini değiştirebildiği bilinmektedir. Belirli bir genin geçici olarak susturulmasının anti-proliferatif etkisinin çalışıldığı bir çalışmada hücre başlangıç yoğunluğuna bağlı olarak anti-proliferatif etkinin görüldüğü ve gerçekleştirilecek çalışmaya göre optimal hücre başlangıç yoğunluğunun belirlenmesi gerektiği rapor edilmiştir (Selli vd., 2016). Bu sebeple, her bir hücre hattı için büyüme eğrisi grafikleri, literatürde belirtilen ve hücre bankasının önerdiği hücre yoğunlukları göz önünde bulundurularak farklı başlangıç hücre yoğunlukları için oluşturulmuştur. Bu şekilde hücre popülasyonlarının ikilenme süreleri (dT) hesaplanmış ve optimum hücre yoğunluğunun tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Büyüme eğrileri en uzun deney süresi göz önünde bulundurularak oluşturulmuştur. Oluşturulan büyüme eğrilerinde, sürekli hücre hatları için popülasyonun yeni kültür kabına alışma süresi olarak tanımlanan lineer lag fazının en kısa olduğu, dolayısıyla popülasyon büyüme hızının (k) en yüksek ve ikilenme süresinin en kısa olduğu hücre yoğunlukları optimum olarak değerlendirilmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattı için oluşturulan büyüme eğrisi (Şekil 4.9.) ve hesaplanan değerler (Çizelge 4.2.) incelendiğinde optimum hücre yoğunluğunun  $1 \times 10^4$  hücre/kuyu veya diğer bir ifadeyle  $3125 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> olduğu görülmektedir. Optimum hücre yoğunluğundaki popülasyon ikilenme süresi ise 29 saat olarak belirlenmiştir.

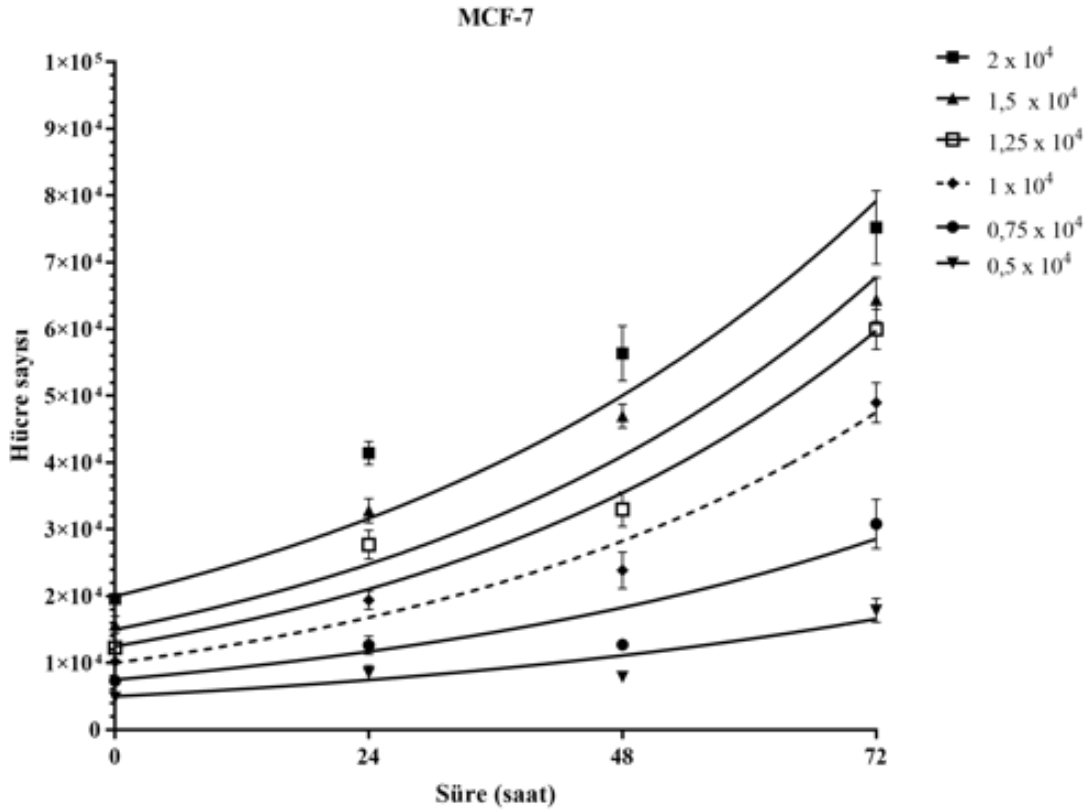


Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücre hattına ait büyüme eğrisi grafiği.

Çizelge 4.2. MDA-MB-231 hücre hattının farklı başlangıç hücre yoğunluklarında popülasyon ikilenme süreleri.

MDA-MB-231						
Hücre sayısı/ kuyu	$0,5 \times 10^4$	$0,75 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
İkilenme süresi (dT) (saat)	33,54	28,91	28,74	29,83	29,04	32,07
R <sup>2</sup>	0,8161	0,8028	0,899	0,8848	0,8495	0,8809

MCF-7 hücre hattı için oluşturulan büyüme eğrisi (Şekil 4.10.) ve hesaplanan değerler (Çizelge 4.3.) incelendiğinde optimum hücre yoğunluğunun  $1 \times 10^4$  hücre/kuyu veya diğer bir ifadeyle  $3125 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> olduğu görülmektedir. Optimum hücre yoğunluğundaki popülasyon ikilenme süresi ise 32 saat olarak belirlenmiştir.

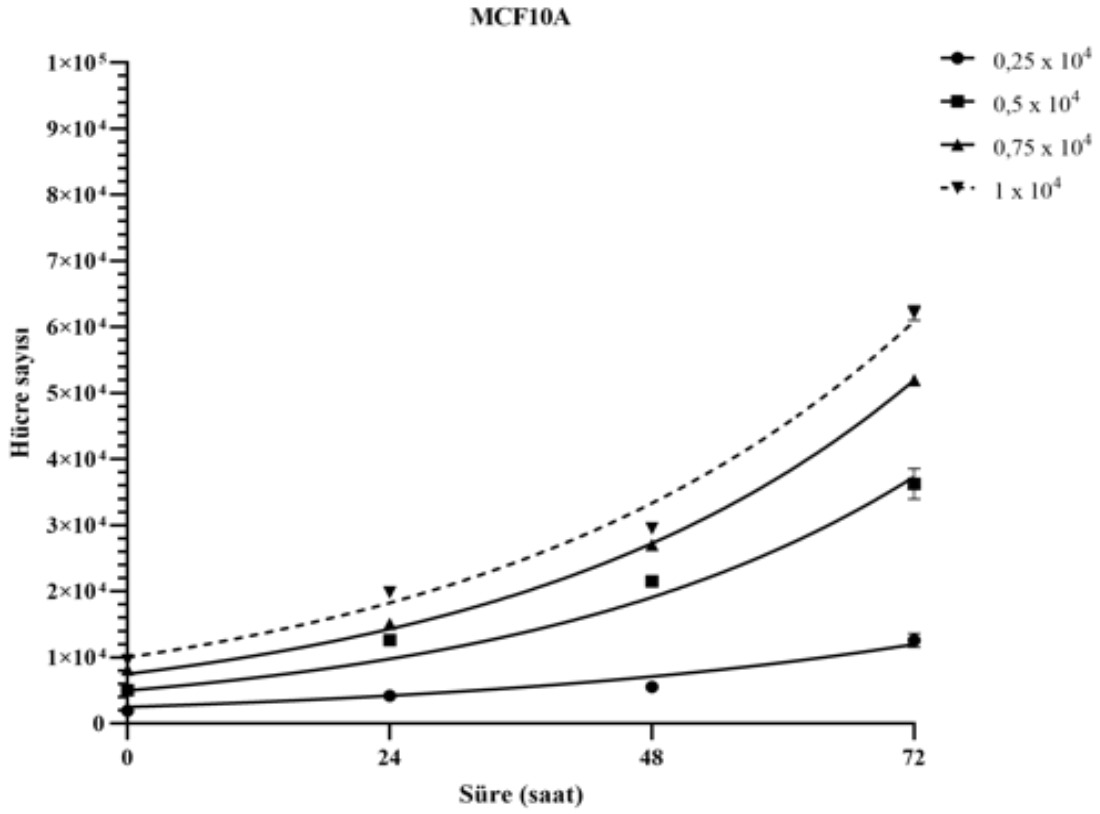


Şekil 4.10. MCF-7 hücre hattına ait büyüme eğrisi grafiği.

Çizelge 4.3. MCF-7 hücre hattının farklı başlangıç hücre yoğunluklarında popülasyon ikilenme süreleri.

MCF-7						
Hücre sayısı/ kuyu	$0,5 \times 10^4$	$0,75 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
İkilenme süresi (dT) (saat)	41,61	37,3	32,01	32,89	33,08	36,26
$R^2$	0,6554	0,705	0,8667	0,8822	0,8501	0,7893

MCF-10A hücre hattı için oluşturulan büyüme eğrisi (Şekil 4.11.) ve hesaplanan değerler (Çizelge 4.4.) incelendiğinde optimum hücre yoğunluğunun  $1 \times 10^4$  hücre/kuyu veya diğer bir ifadeyle  $3,125 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> olduğu görülmektedir. Optimum hücre yoğunluğundaki popülasyon ikilenme süresi ise 29 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. MCF-10A hücre hattına ait büyüme eğrisi grafiği.

Çizelge 4.4. MCF-10A hücre hattının farklı başlangıç hücre yoğunluklarında popülasyon ikilenme süreleri.

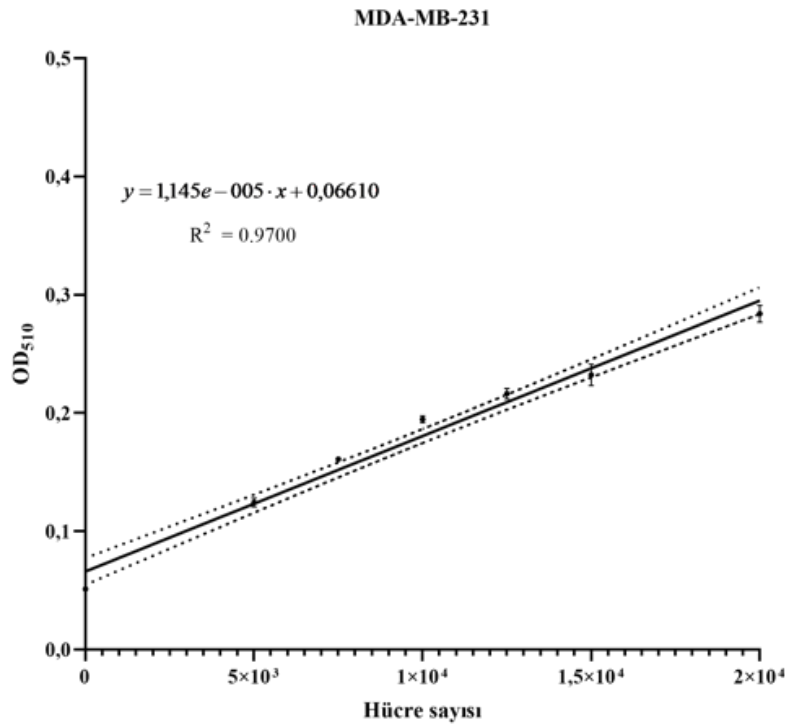
MCF-10A				
Hücre sayısı/ kuyu	$0,25 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4$	$0,75 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
İkilenme süresi (dT) (saat)	40,38	33,98	29,77	29,13
$R^2$	0,8688	0,9452	0,9974	0,9802

Denenen hücre yoğunlukları ve süreler için, tez çalışmasında kullanılacak tüm hücre hatları için optimum yoğunluğun aynı olduğu görülmüştür. MCF-7 hücre hattı popülasyonunun ise MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarına göre 4 saat daha geç ikilendiği belirlenmiştir.

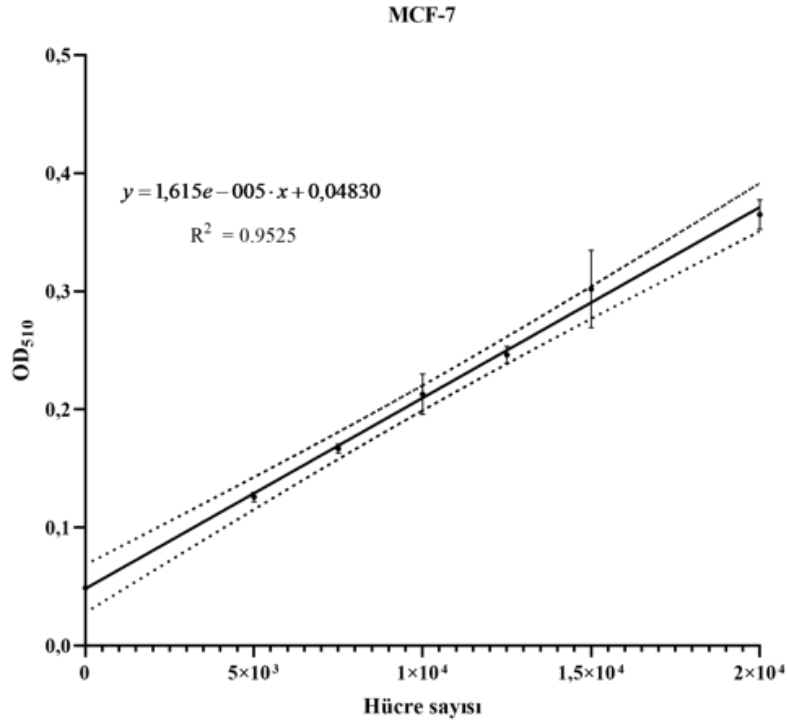
Kanser hücre hatlarının *in vitro* ortamda kültüre alındıklarındaki başlangıç hücre yoğunluklarının popülasyon ikilenme süresi üzerine etkisini araştıran bir çalışmada da hücre yoğunluğuna bağlı olarak hücre büyüme eğrisinin motifinin değiştiği belirlenmiştir.

Hücre yoğunluğuna bağlı olarak popülasyonun eksponansiyel büyüme fazından önceki lag fazında geçirilen sürenin değişmediği, ancak popülasyon ikilenme zamanı ve satürasyon yoğunluğunun etkilendiği; artan hücre yoğunluklarında bazı hücre hatlarının popülasyon ikilenme süresinin arttığı ve popülasyonun ölüm fazına çok daha kısa sürede girdiği belirlenmiştir (Nakhjavani ve Shirazi, 2017). Tez çalışması kapsamında çizilen büyüme eğrisi grafikleri popülasyonun satürasyona ulaştığı ve ölüm fazına girdiği zamanları özetleyecek süreyi kapsamıyor olsa da, optimum olarak belirlenen yoğunlukların üzerindeki yoğunluklarda literatür bilgisiyle uyumlu olarak popülasyon ikilenme sürelerinin arttığı görülmektedir.

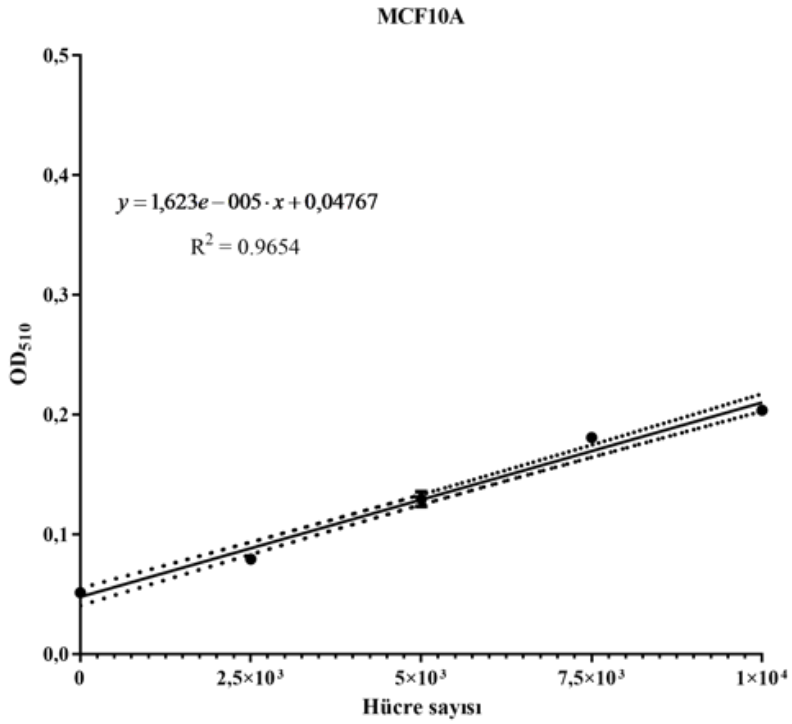
SRB testi ile büyüme eğrisi grafikleri oluşturulurken başlangıç zaman noktasında alınan ölçümler ile proliferasyon testi sırasında ihtiyaç duyulabileceği düşünülerek elde edilen OD değerleri ile hücre sayısı arasındaki korelasyonu gösteren eğriler çizilmiş ve korelasyon denklemleri hesaplanarak grafikler üzerinde verilmiştir (Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14.).



Şekil 4.12. MDA-MB-231 hücre hattına ait hücre sayısı OD korelasyon grafiği ve grafiğe ait doğru denklemi.



Şekil 4.13. MCF-7 hücre hattına ait hücre sayısı OD korelasyon grafiği ve grafiğe ait doğru denklemi.



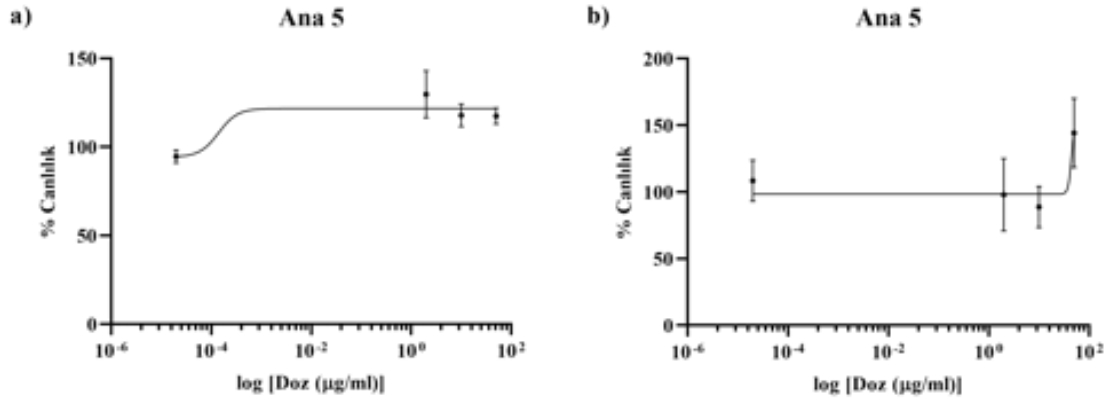
Şekil 4.14. MCF-10A hücre hattına ait hücre sayısı OD korelasyon grafiği ve grafiğe ait doğru denklemi.

#### 4.5. “Ana” Fraksiyonların Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

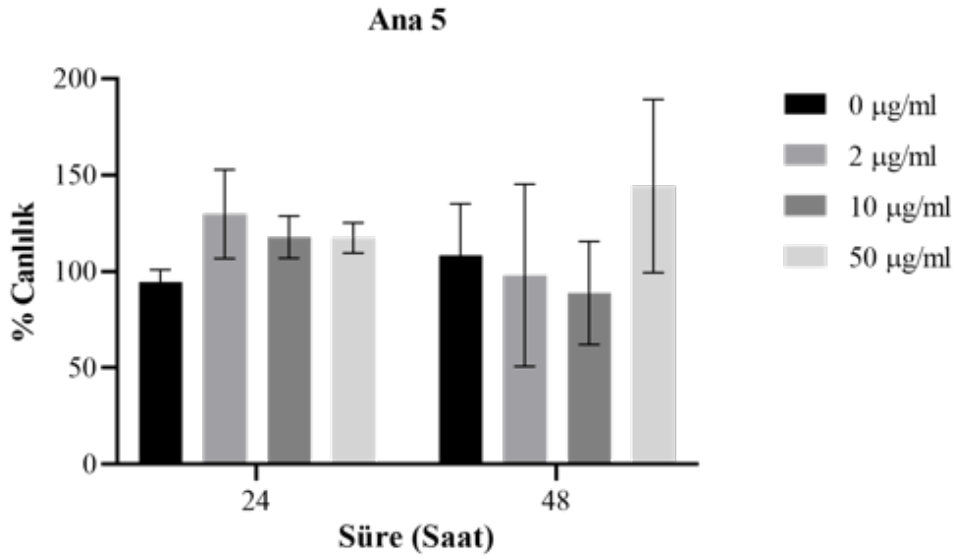
Nötral kırmızısı testiyle Ana 5 ile 11 arasındaki her bir fraksiyon için sitotoksisite tarama çalışması gerçekleştirilmiştir. Ana 1 ile Ana 4 fraksiyonları arasındaki fraksiyonlar peptid/ protein içermediği için çalışmanın ileriki basamaklarında kullanılmamıştır (Bkz. Bölüm 4.3.). Sitotoksisite çalışmaları kanser hücre hatları olan MDA-MB-231 ve MCF-7 ile gerçekleştirilmiş olup bu aşamada en yüksek tolere edilen doz (ETD)’un belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bir etken maddenin 100 µg/ml konsantrasyonunun üzerindeki tedavi edici/ önleyici etkisinin çalışılması anlamlı olmayacağı için sitotoksisite taraması için bu konsantrasyonun altındaki konsantrasyonlar seçilmiştir (Baer, 2004). Fraksiyonların venomda bulunma yüzdelerinin, dolayısıyla tez çalışması süresince elde edilen miktarlarının çok düşük olması sebebiyle 100µg/ml konsantrasyon uygulanamamıştır. Bunun yerine en yüksek 50 µg/ml kullanılarak dozlar 5 kat oranla azaltılmış ve 50, 10, 2 µg/ml fraksiyon konsantrasyonları kontrol gruplarıyla birlikte sitotoksik etkileri için test edilmiştir.

Hücreler belirlenen optimum konsantrasyonda ekildikten 24 saat sonra ham venom fraksiyonlarının değişen dozlarında uygulama yapılmıştır. Büyüme eğrilerine göre, tüm hücre hatlarının popülasyon ikilenme sürelerinin 48 saatten kısa olması sebebiyle olası etkilerin 48 saat içinde görülebileceği belirlendiğinden hücre hatları ilgili fraksiyonlarla 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Uygulama başlangıcında ( $T_0$ ) ve her zaman noktasının sonunda ( $T_{24}$ ,  $T_{48}$ ) ölçüm alınmıştır. Her zaman noktasında alınan veriler kendi içinde normalize edilerek (Bkz. Denklem 3.3.) canlılık oranları (%) belirlenmiştir. Hesaplanan canlılık oranlarına göre konsantrasyonlara bağlı olarak değişen doz-cevap eğrileri doğrusal olmayan regresyon analizi yapılarak oluşturulmuştur.



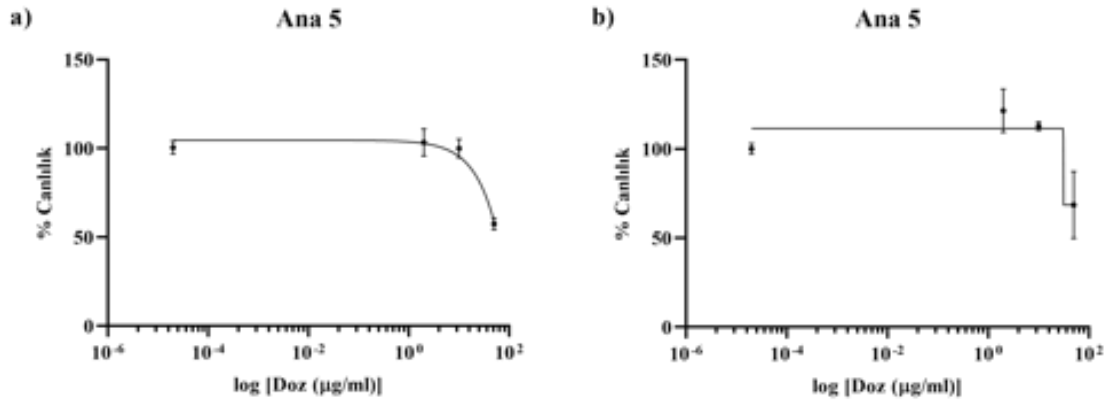
Şekil 4.15. Ana 5 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 5 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.



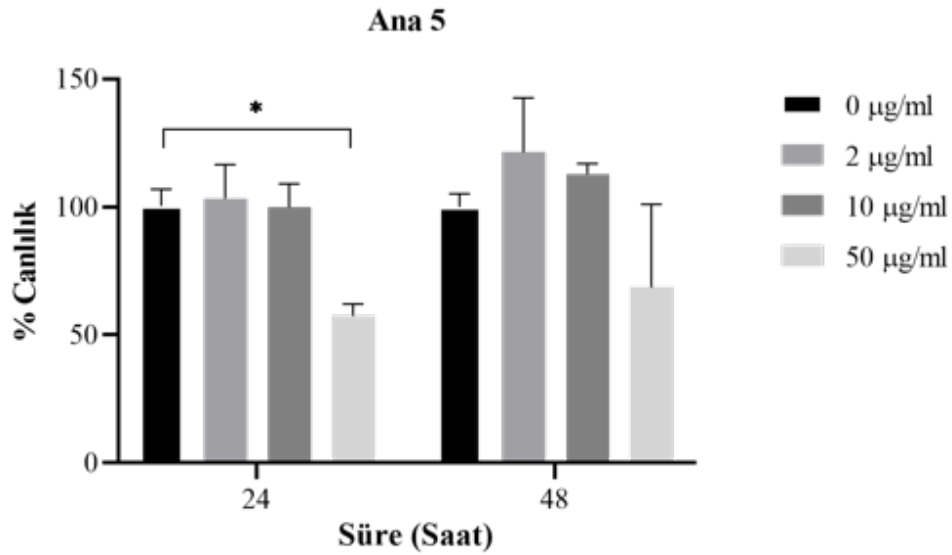
Şekil 4.16. Ana 5 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.15 ve Şekil 4.16 incelendiğinde Ana 5 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığında MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde canlılığın düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunmadığı görülmektedir. 24 ve 48 saat sonunda uygulama gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması ile gerçekleştirilen iki-yönlü ANOVA analizi sonucunda da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir.



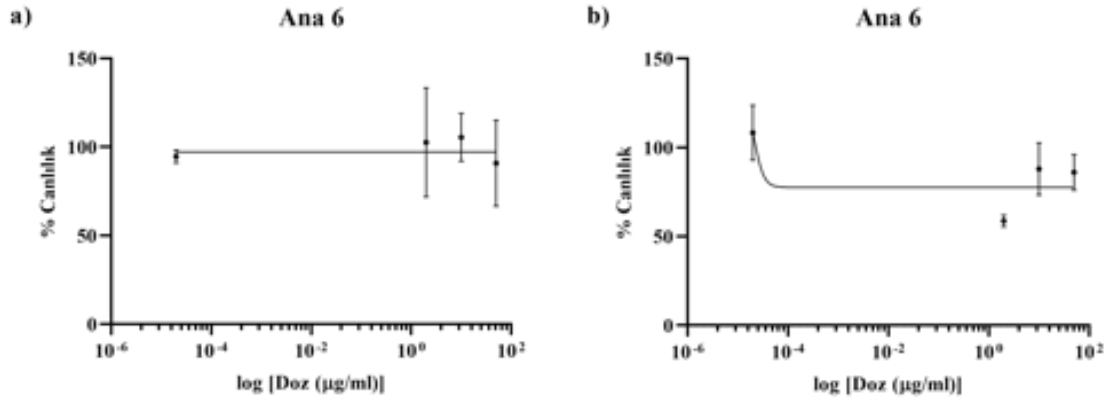


Şekil 4.17. Ana 5 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 5 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

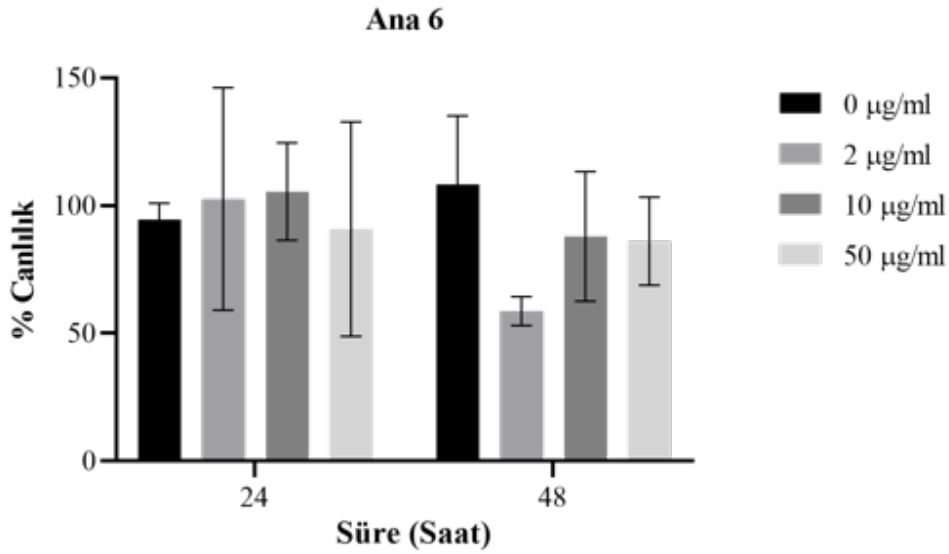


Şekil 4.18. Ana 5 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.17 incelendiğinde Ana 5 fraksiyonunun yalnızca 50 µg/ml konsantrasyonda uygulandığında MCF-7 hücre hattı üzerinde canlılığın bir miktar düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunduğu görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 24 saat sonunda canlılık değeri %57,42'ye düşen 50 µg/ml uygulama grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda görülen düşüşün anlamlı olduğu ( $p = 0,0241$ ), ancak 48 saat sonunda bu iki grubun karşılaştırılması sonucu görülen düşüşün istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği belirlenmiştir ( $p = 0,0682$ ) (Şekil 4.18.).

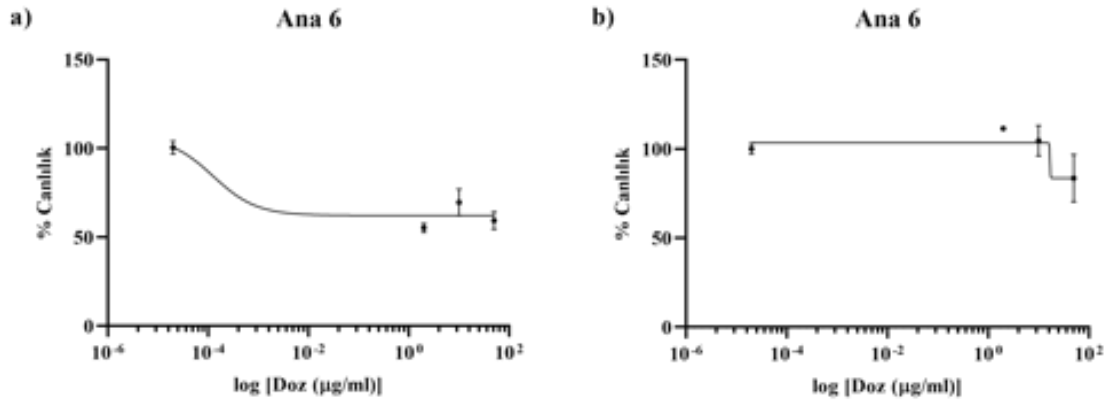


Şekil 4.19. Ana 6 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 6 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

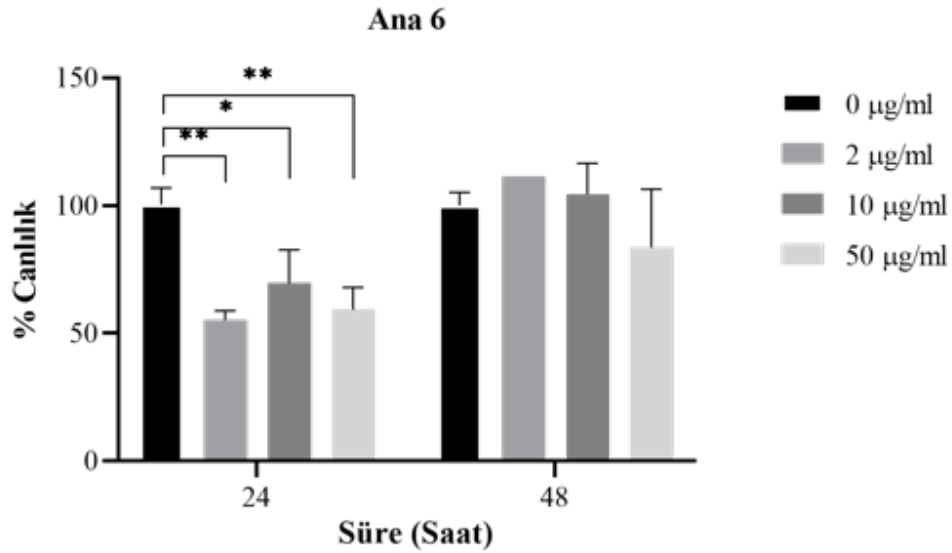


Şekil 4.20. Ana 6 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.19 incelendiğinde Ana 6 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığında MDA-MB-231 hücre hattı canlılığının 24 saat içinde değişmediği, 48 saat sonunda ise tüm konsantrasyonlarda bir miktar azaldığı görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 48 saat sonunda tüm uygulama gruplarında yaklaşık %85'e düşen canlılık değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.20.).

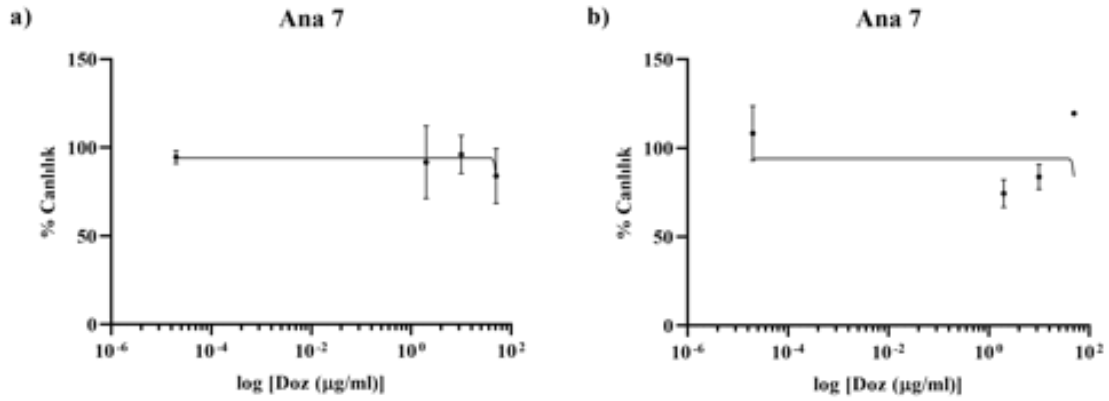


Şekil 4.21. Ana 6 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 6 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

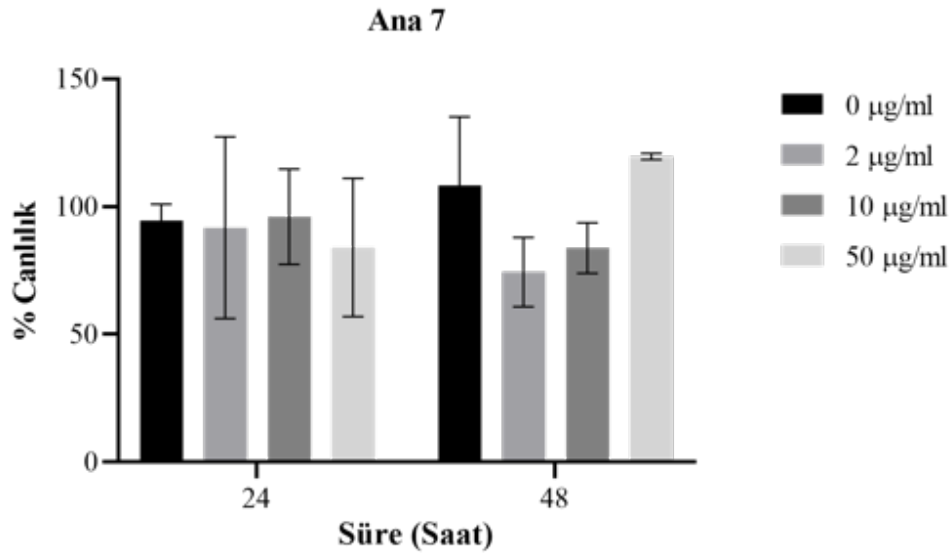


Şekil 4.22. Ana 6 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.21. incelendiğinde Ana 6 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığında MCF-7 hücre hattı üzerinde 24 saat içinde sitotoksik bir etkisinin bulunduğu, ancak 48 saat sonunda bu etkiyi kaybettiği görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 24 saat sonunda 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 50 µg/ml uygulama gruplarında sırasıyla %55,25, %69,60, %59,35'e düşen canlılık değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda görülen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p=0,0047, p=0,0258, p=0,0042) (Şekil 4.22.).

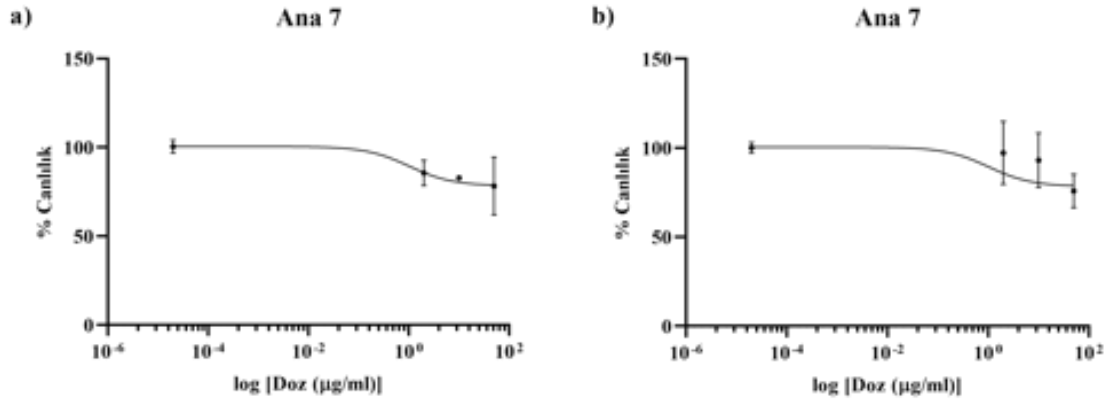


Şekil 4.23. Ana 7 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 7 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

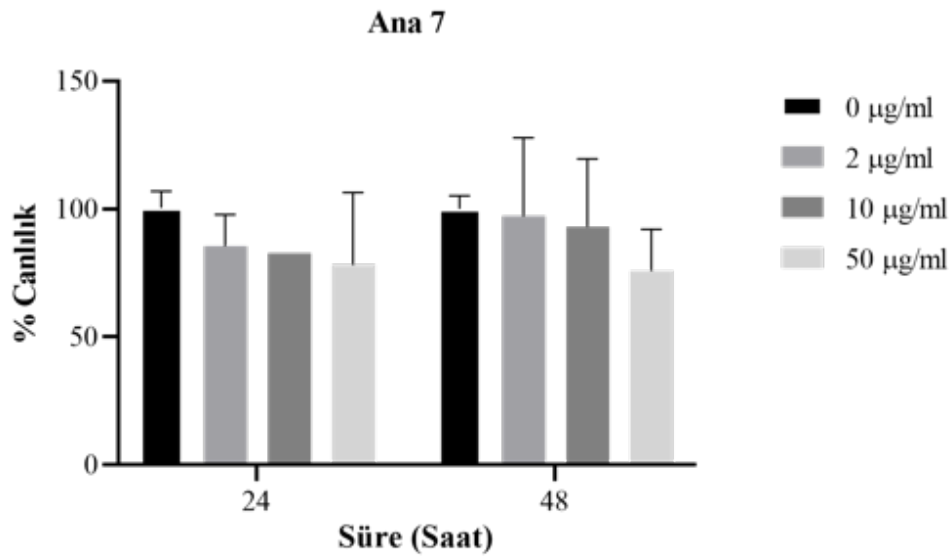


Şekil 4.24. Ana 7 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.23 ve Şekil 4.24 incelendiğinde Ana 7 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığında MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde canlılığın düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunmadığı görülmektedir. 24 ve 48 saat sonunda uygulama gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması ile gerçekleştirilen iki-yönlü ANOVA analizi sonucunda da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

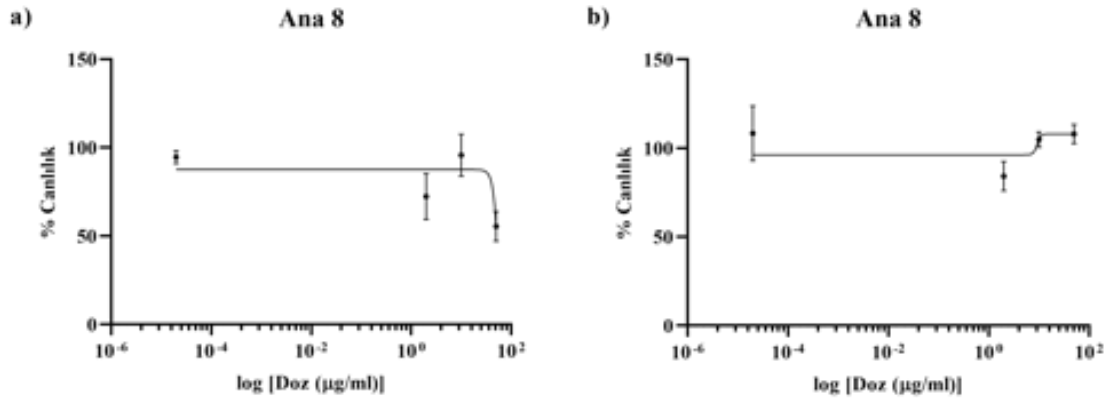


Şekil 4.25. Ana 7 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 7 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

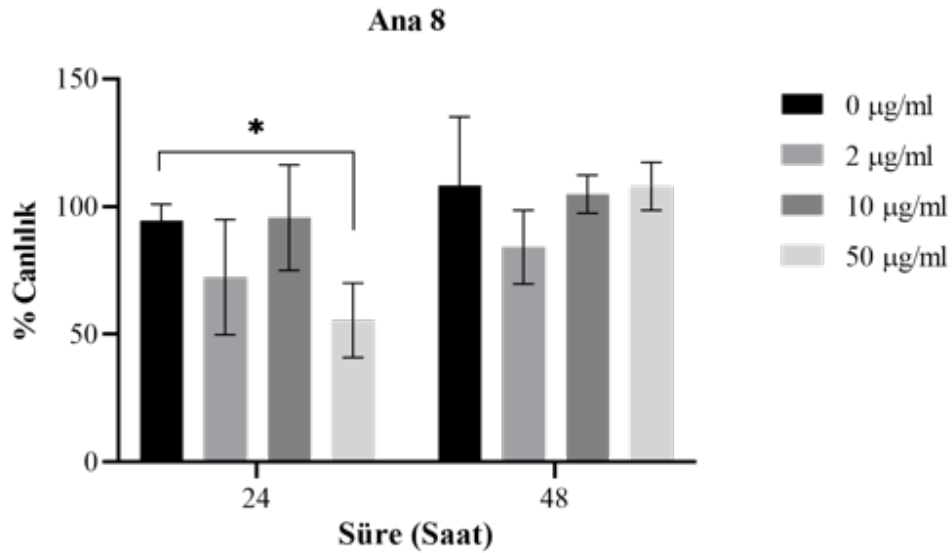


Şekil 4.26. Ana 7 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.25. ve Şekil 4.26. incelendiğinde Ana 7 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığında MCF-7 hücre hattı üzerinde canlılığın düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunmadığı görülmektedir. 24 ve 48 saat sonunda uygulama gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması ile gerçekleştirilen iki-yönlü ANOVA analizi sonucunda da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

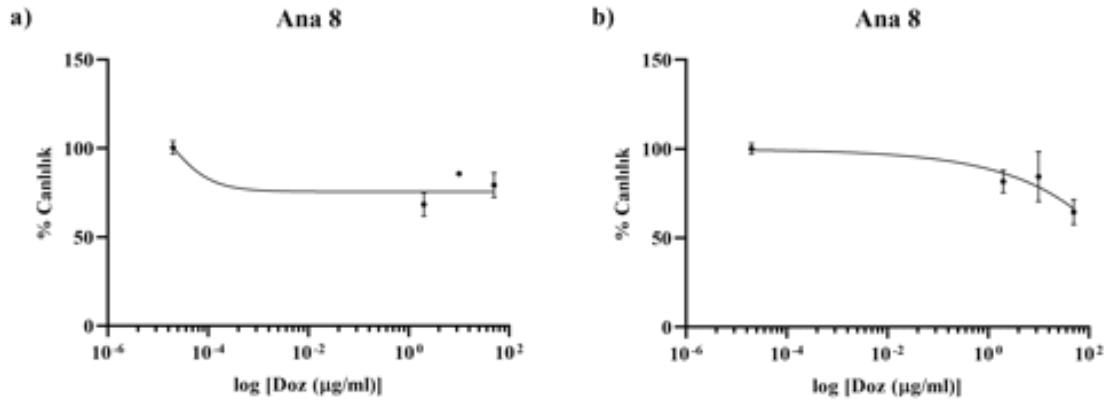


Şekil 4.27. Ana 8 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 8 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

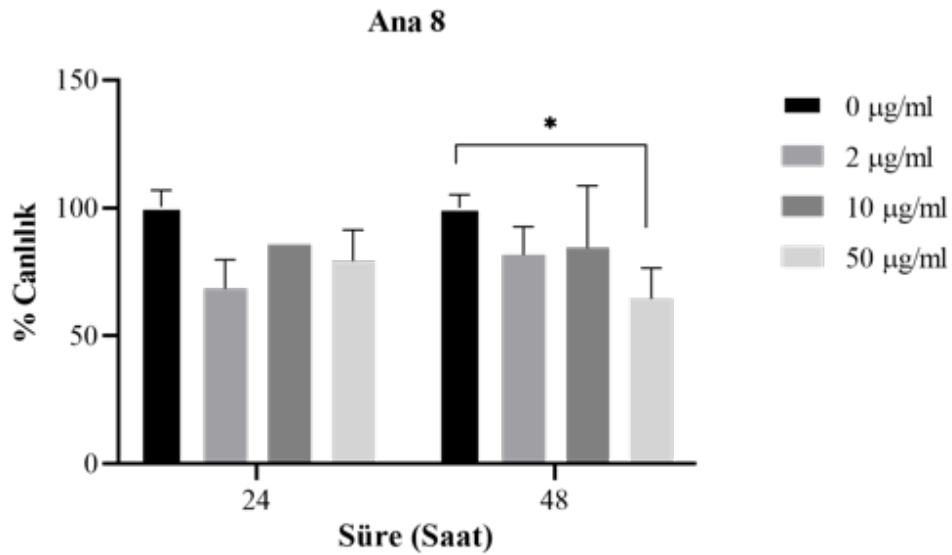


Şekil 4.28. Ana 8 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.27. incelendiğinde Ana 8 fraksiyonunun yalnızca 50 µg/ml konsantrasyonda uygulandığında MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde canlılığın 24 saat sonunda bir miktar düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunduğu ancak 48 saat sonunda bu etkinin kaybolduğu görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 24 saat sonunda canlılık değeri %55,49'a düşen 50 µg/ml uygulama grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda görülen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p = 0,0301$ ) (Şekil 4.28.).

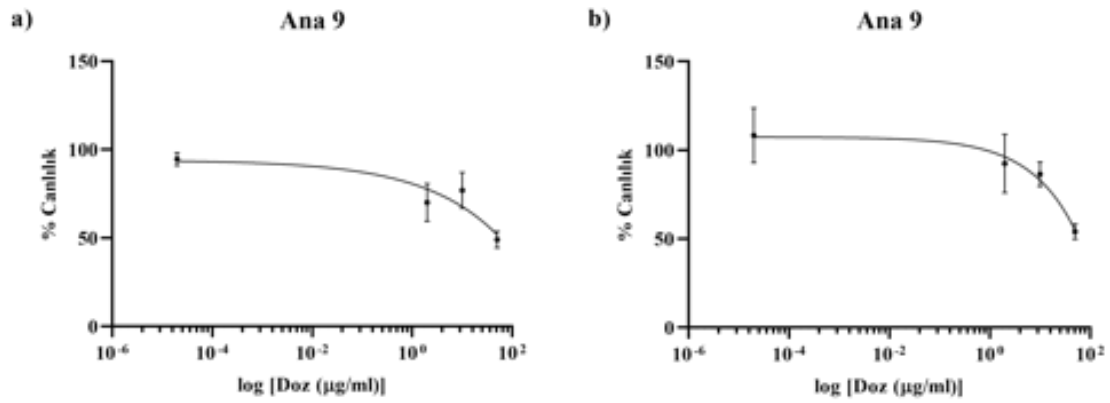


Şekil 4.29. Ana 8 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 8 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

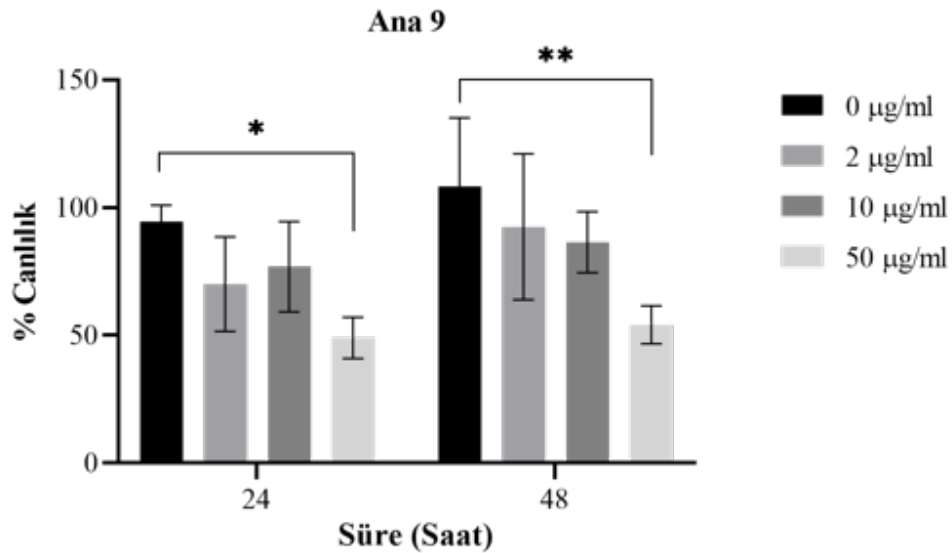


Şekil 4.30. Ana 8 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.29. incelendiğinde Ana 8 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığında MCF-7 hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saat sonunda canlılığın bir miktar düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunduğu görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 48 saat sonunda canlılık değeri %64,54'e düşen 50 µg/ml uygulama grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda görülen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p = 0,0136$ ) ancak 24 saat içinde anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.30.).



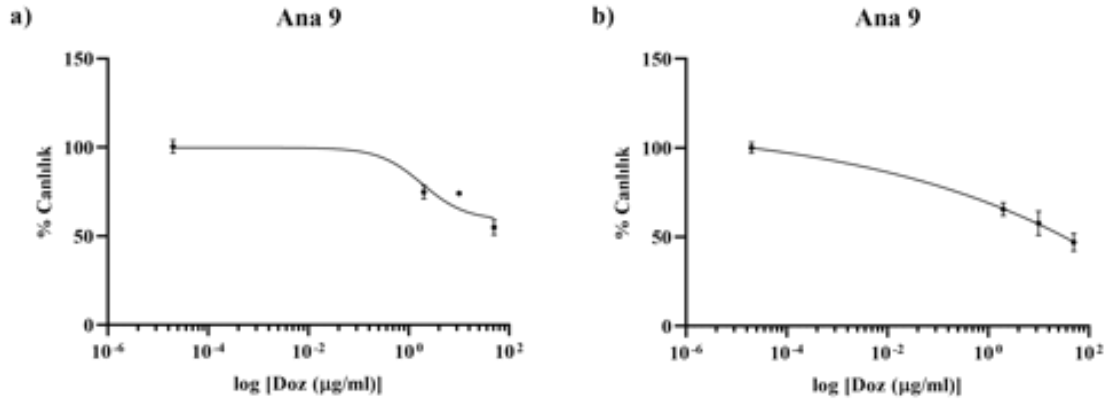
Şekil 4.31. Ana 9 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 9 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.



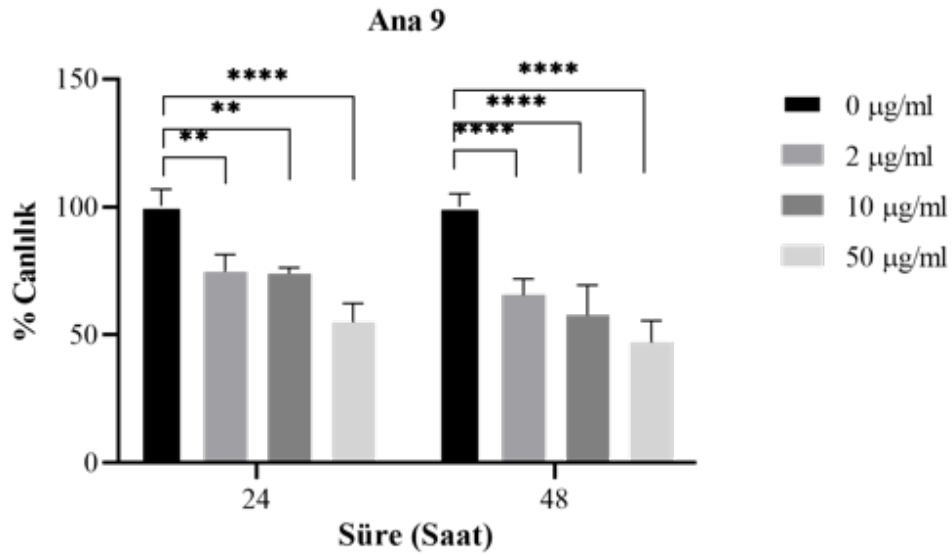
Şekil 4.32. Ana 9 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.31. incelendiğinde Ana 9 fraksiyonunun konsantrasyona bağımlı olarak MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde canlılığın düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunduğu görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 24 ve 48 saat sonunda canlılık değerleri sırasıyla %50,03 ve %54,12'ye düşen 50 µg/ml uygulama grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda görülen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (sırasıyla p = 0,0160 ve p = 0,0046) (Şekil 4.32.).





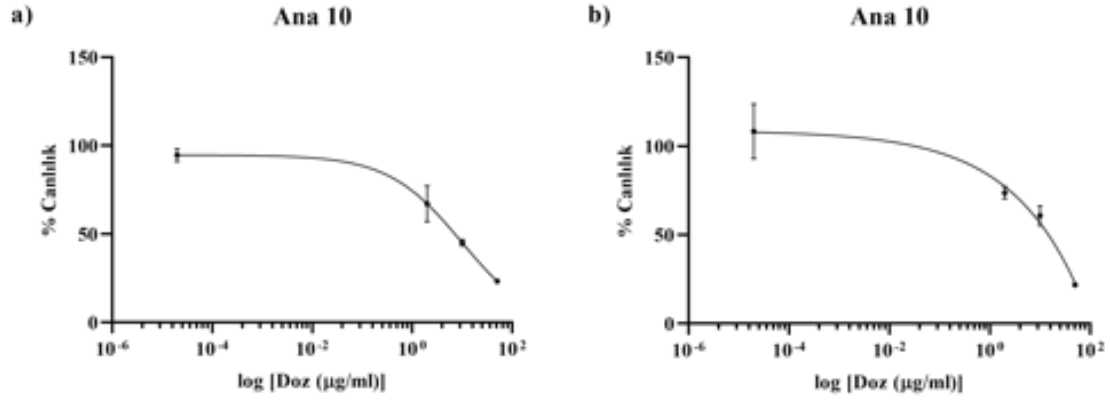
Şekil 4.33. Ana 9 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 9 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.



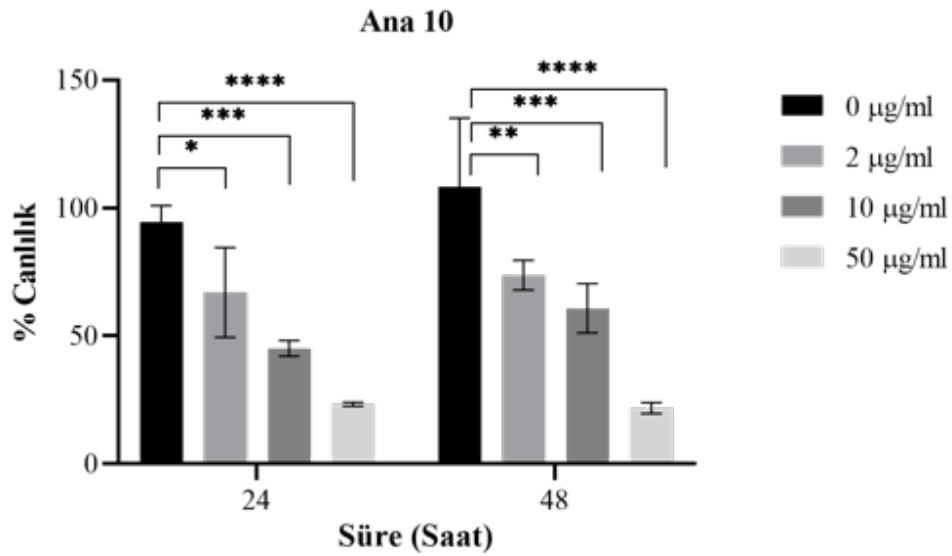
Şekil 4.34. Ana 9 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.33. incelendiğinde Ana 9 fraksiyonunun konsantrasyona bağımlı olarak MCF-7 hücre hattı üzerinde canlılığın düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunduğu görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 24 saat sonunda 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 50 µg/ml Ana 9 uygulanan grupların canlılık değerleri sırasıyla %74,79, %74,07, %54,89 olarak ve 48 saat sonunda sırasıyla %65,57, %57,63 ve %47,09 olarak belirlenmiş olup bu uygulama gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda

görülen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (24 saat sırasıyla:  $p = 0,0014$ ,  $p = 0,0011$ ,  $p < 0,0001$ ) (48 saat sırasıyla:  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.34.).



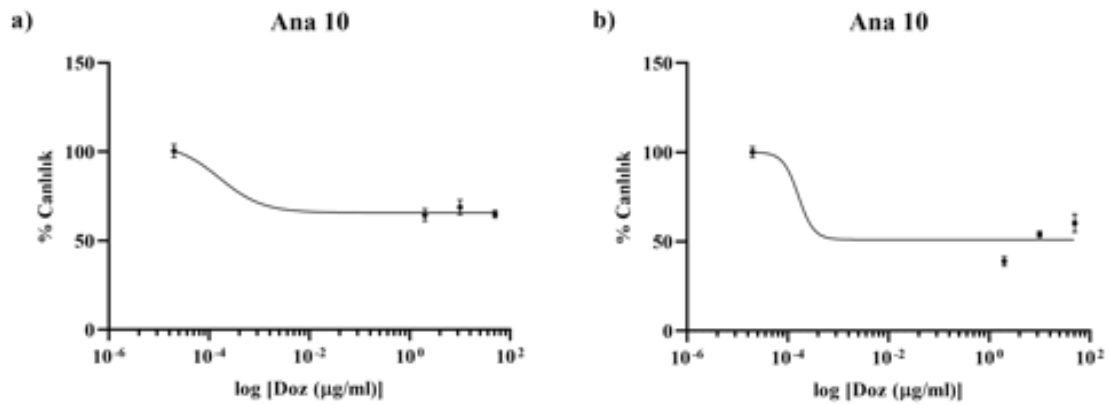
Şekil 4.35. Ana 10 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 10 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.



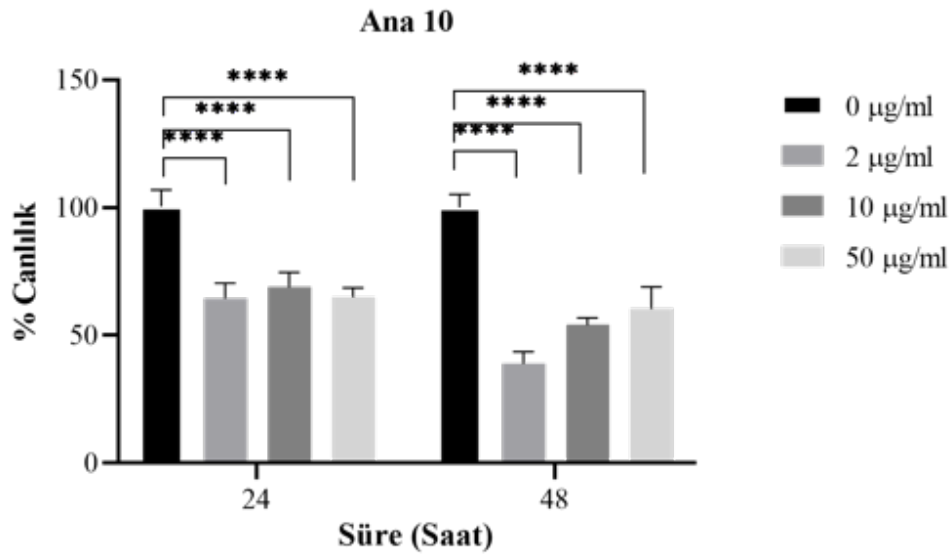
Şekil 4.36. Ana 10 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.35. incelendiğinde Ana 10 fraksiyonunun konsantrasyona bağımlı olarak MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde canlılığın düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunduğu görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 24 saat sonunda 2 µg/ml,

10 µg/ml ve 50 µg/ml Ana 10 uygulanan grupların canlılık değerleri sırasıyla %67,02, %45,10, %23,31 olarak ve 48 saat sonunda sırasıyla %73,72, %60,84 ve %21,79 olarak belirlenmiş olup bu uygulama gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda görülen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (24 saat sırasıyla:  $p = 0,0367$ ,  $p = 0,0004$ ,  $p < 0,0001$ ) (48 saat sırasıyla:  $p = 0,0088$ ,  $p = 0,0006$ ,  $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.36.).

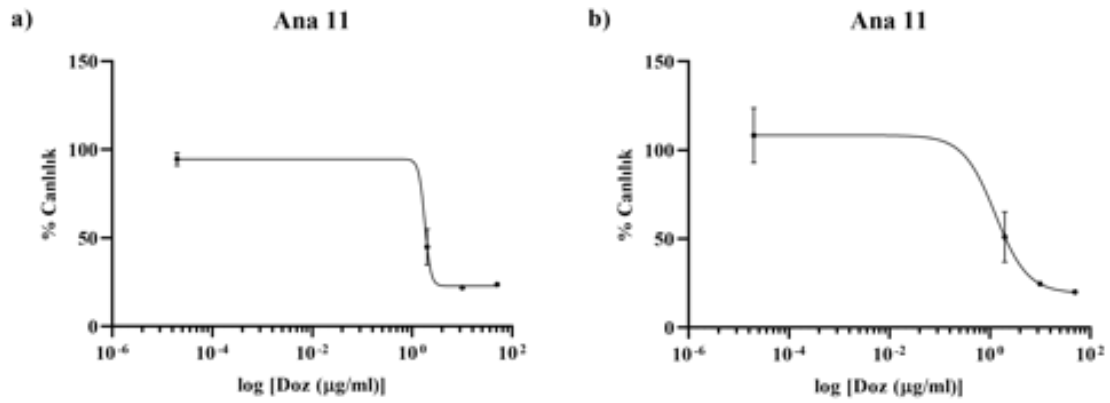


Şekil 4.37. Ana 10 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 10 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.



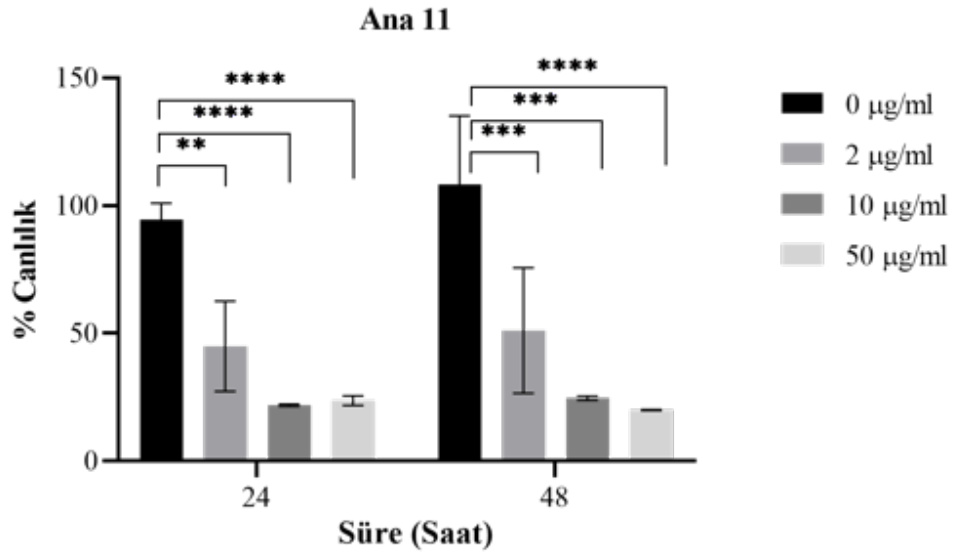
Şekil 4.38. Ana 10 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.37. incelendiğinde Ana 10 fraksiyonunun konsantrasyona bağımlı olarak MCF-7 hücre hattı üzerinde canlılığın düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunduğu görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 24 saat sonunda 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 50 µg/ml Ana 10 uygulanan grupların canlılık değerleri sırasıyla %64,42, %68,82, %64,90 olarak ve 48 saat sonunda sırasıyla %38,88, %54,07, %60,03 olarak belirlenmiş olup bu uygulama gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda görülen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (24 ve 48 saatlere ait tüm karşılaştırmalar için  $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.38.).

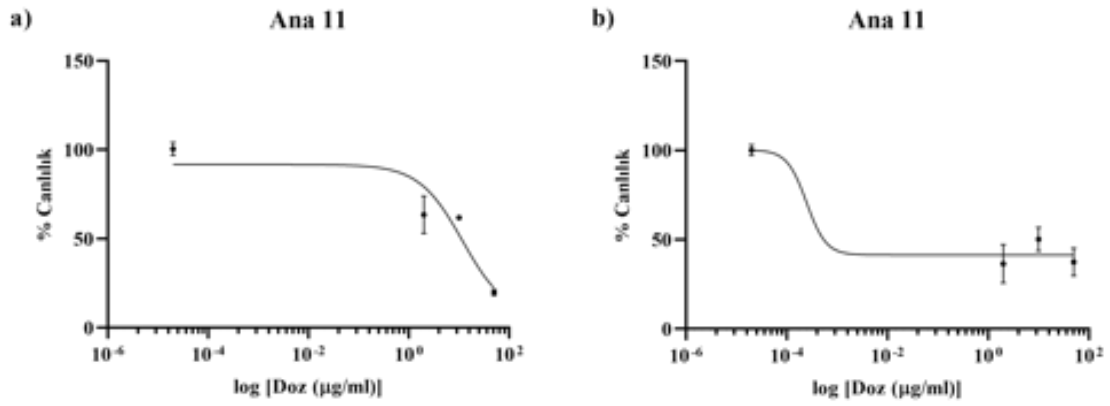


Şekil 4.39. Ana 11 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 11 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

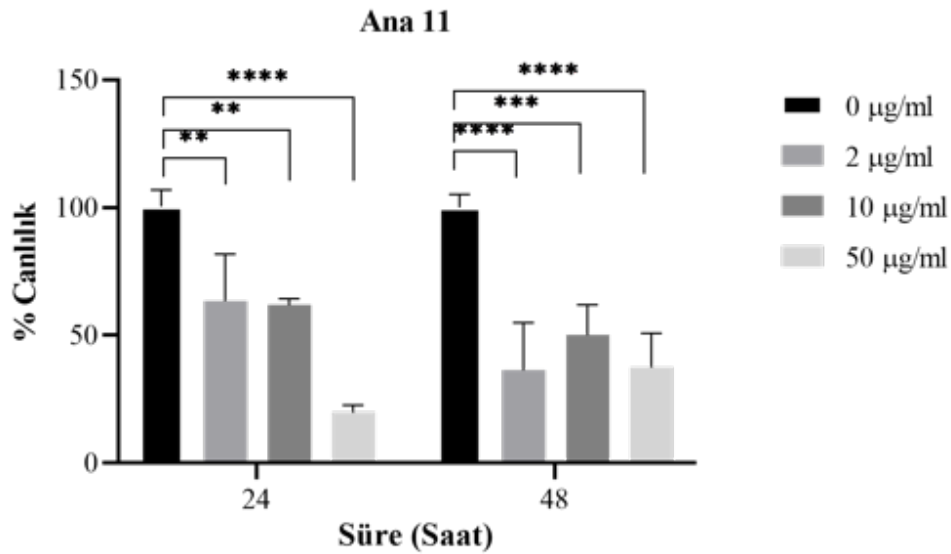
Şekil. 4.39. incelendiğinde Ana 11 fraksiyonunun konsantrasyona bağımlı olarak MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde canlılığın önemli ölçüde düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunduğu görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 24 saat sonunda 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 50 µg/ml Ana 11 uygulanan grupların canlılık değerleri sırasıyla %44,97, %21,92, %23,69 olarak ve 48 saat sonunda sırasıyla %51,11, %24,66, %20,01 olarak belirlenmiş olup bu uygulama gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda görülen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (24 saat sırasıyla:  $p = 0,0019$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ) (48 saat sırasıyla:  $p = 0,0005$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.40.).



Şekil 4.40. Ana 11 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.



Şekil 4.41. Ana 11 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi. Ana 11 fraksiyon dozuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.



Şekil 4.42. Ana 11 fraksiyonunun her bir dozunun 24 ve 48 saat sonunda MCF-7 hücre hattı üzerindeki % canlılık etkisini gösteren bar grafiği.

Şekil. 4.41. incelendiğinde Ana 11 fraksiyonunun konsantrasyona bağımlı olarak MCF-7 hücre hattı üzerinde canlılığın düşmesine sebep olan sitotoksik bir etkisinin bulunduğu görülmektedir. İki-yönlü ANOVA analizi sonucunda 24 saat sonunda 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 50 µg/ml Ana 11 uygulanan grupların canlılık değerleri sırasıyla %63,45, %61,75, %19,78 olarak ve 48 saat sonunda sırasıyla %36,41, %50,24, %37,44 olarak belirlenmiş olup bu uygulama gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda görülen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (24 saat sırasıyla:  $p = 0,0034$ ,  $p = 0,0024$ ,  $p < 0,0001$ ) (48 saat sırasıyla:  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0002$ ,  $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.42.).

Şekil 4.15. – Şekil 4.42. arasında ayrıntılı olarak açıklanan verilere bakıldığında Ana 5 ve 6 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sitotoksik bir etkisinin bulunmadığı görülmektedir. Bunun yanında MCF-7 hücre hattının 50 µg/ml konsantrasyonda canlılığında anlamlı bir düşüş görülmesi sebebiyle Ana 5 ve Ana 6 fraksiyonlarının toksik etkisine daha hassas olduğu söylenebilmektedir. Ana 7 fraksiyonu denenen konsantrasyonlarda her iki hücre hattı üzerinde de sitotoksik etki göstermemiştir. Ana 8 fraksiyonu MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde ilk 24 saat içinde 50 µg/ml konsantrasyonda canlılık üzerinde anlamlı bir düşüşe sebep olmuş, MCF-7 hücre hattında ise benzer etki 48 saat sonunda gözlenmiştir. Ana 9 fraksiyonunun sadece 50 µg/ml

konsantrasyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde anlamlı bir toksik etkisi görülürken, MCF-7 hücre hattında ise denenen tüm konsantrasyonlarda, konsantrasyona bağımlı bir şekilde canlılığın azaldığı belirlenmiştir. Bu da MCF-7 hücre hattının Ana 9 fraksiyonunun sitotoksik etkisine daha hassas olabileceğini düşündürmektedir. Bunun aksine Ana 10 fraksiyonu MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde denenen tüm konsantrasyonlarda, konsantrasyona bağlı bir şekilde canlılığı azaltmıştır. MCF-7 hücre hattında da aynı etki görülse de % canlılık değerleri diğer hücre hattına kıyasla daha fazladır. Dolayısıyla bu veriler MDA-MB-231 hücre hattının Ana 10 fraksiyonunun sitotoksik etkisine diğer hücre hattına kıyasla daha hassas olabileceğini düşündürmektedir. Ana 11 fraksiyonunun etkisi incelendiğinde, her iki hücre hattı üzerinde konsantrasyona bağlı olarak canlılığın azaldığı görülmüştür. Ancak % canlılık değerleri incelendiğinde MDA-MB-231 hücre hattının 10 µg/ml konsantrasyonda uygulamaya daha hassas olduğu belirlenmiştir.

Bu aşamada her bir fraksiyonun kullanılan hücreler için toksik sınırının diğer bir ifadeyle en yüksek tolere edilen doz (ETD)'un belirlenmesi amaçlanmıştır. Yukarıda açıklandığı üzere canlılıkta bir miktar azalmaya sebep olan ancak canlılığı %50'nin altına düşürmeyen konsantrasyonlar tolere edilebilir olarak kabul edilmiştir. Bu doğrultuda her iki hücre hattı için de %50 ve üzeri canlılık değeri ETD olarak kabul edilerek Çizelge 4.5.'deki gibi belirlenmiştir.

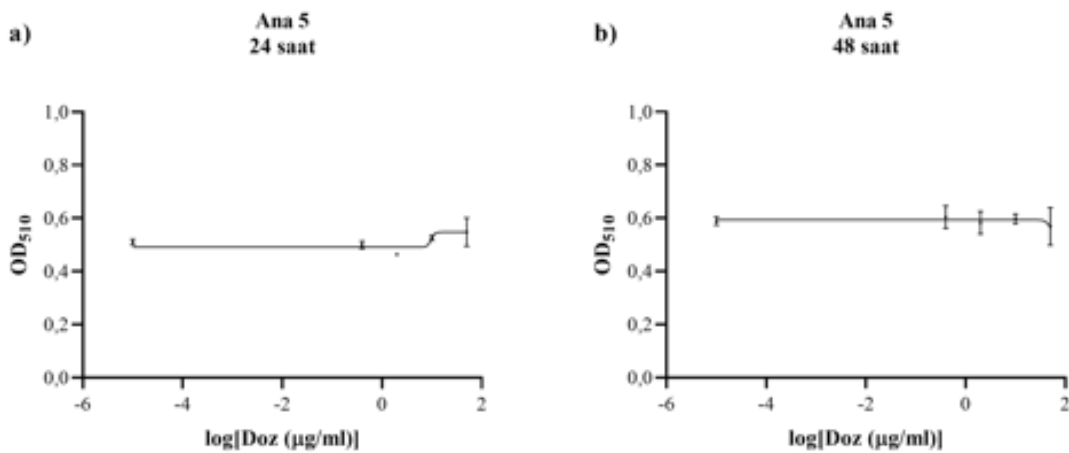
Çizelge 4.5. Sitotoksitesi değerlendirilen ham venom fraksiyonlarının zamana ve hücre hattına bağlı olarak belirlenen ETD değerleri.

Fraksiyon	ETD (µg/ml)			
	24 saat		48 saat	
	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7
Ana 5	50	50	50	50
Ana 6	50	50	50	50
Ana 7	50	50	50	50
Ana 8	50	50	50	50
Ana 9	50	50	50	50
Ana 10	10	10	50	50
Ana 11	2	2	10	10

#### 4.6. “Ana” Fraksiyonların Anti-proliferatif Etkisinin Belirlenmesi

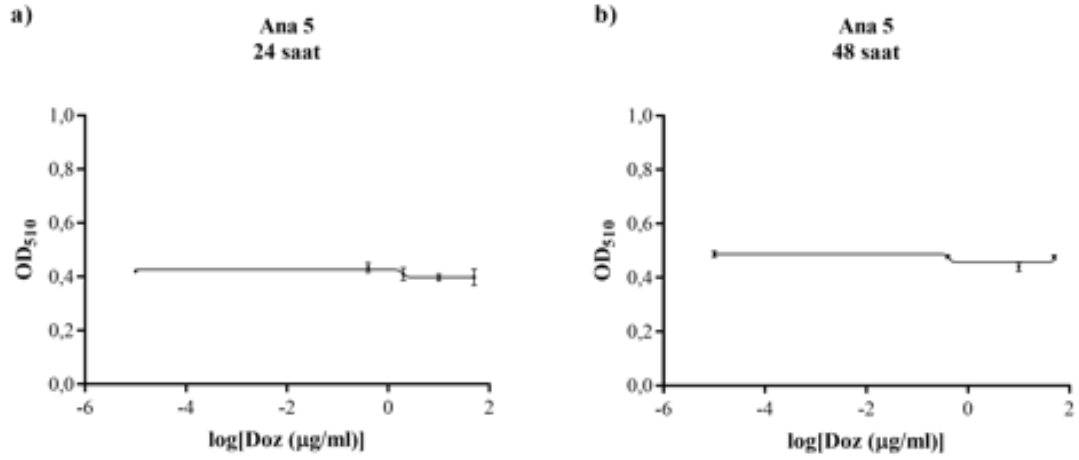
Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu birbirinden ayrı iki konsept olarak değerlendirilmektedir. Bir önceki aşamada gerçekleştirilen sitotoksikite deneyleri ile hücre popülasyonunda bulunan canlı hücreler belirlendiğinden bu yöntemi kullanmanın amacı varsa toksik doz sınırının belirlenmesidir. Ancak canlı olan her hücre proliferatif olmadığından hücre proliferasyonu üzerindeki etkinin ayrıca değerlendirilmesi gerekmektedir. Tez çalışmasının bu aşamasında, Ana 5 ile 11 arasındaki fraksiyonların hücre popülasyonu üzerinde toksik etki yaratmayan en yüksek dozları (ETD) ve bu dozların 5-kat dilüe edilmiş alt dozlarının anti-proliferatif etkisi SRB testi ile araştırılmıştır.

Kanser hücre hatları MDA-MB-231 ve MCF-7 optimum konsantrasyonda kültüre alındıktan 24 saat sonra Ana fraksiyonların ilgili dozları uygulanmıştır ( $T_0$ ). Bunu takip eden 24 ( $T_{24}$ ) ve 48 ( $T_{48}$ ) saat sonunda 510 nm dalga boyunda elde edilen OD değerlerinin doza bağımlı olarak değişimini gösteren grafikler, doğrusal olmayan regresyon analizi ile oluşturulmuştur. Aynı zamanda etkin olan her bir fraksiyon ve her bir zaman noktası (T) için ayrıca olmak üzere  $GI_{50}$ , TGI ve  $LC_{50}$  değerleri hesaplanmıştır (Bkz. Denklem 3.4., 3.5., 3.6.). Bu hesaplamaların gerçekleştirilebilmesi için elde edilen veriler normalize edilmemiştir.



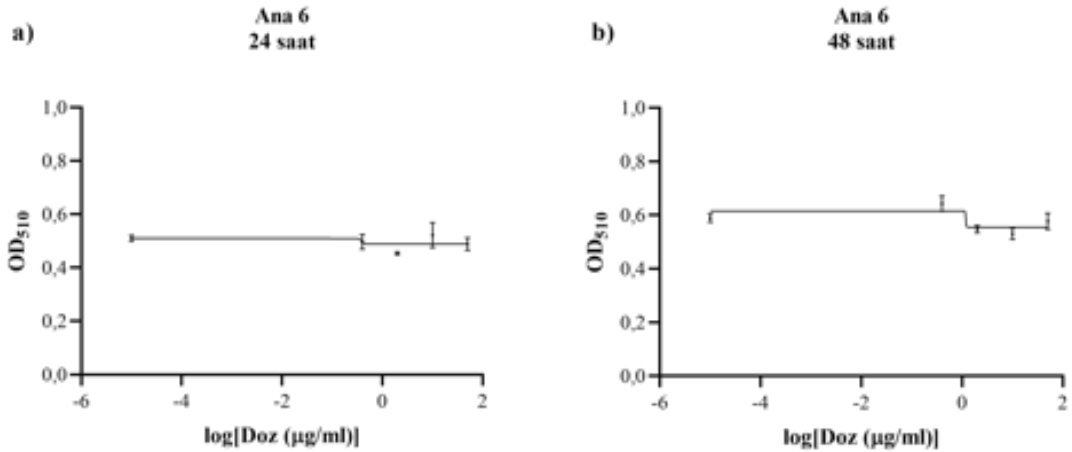
Şekil 4.43. Ana 5 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 5 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.



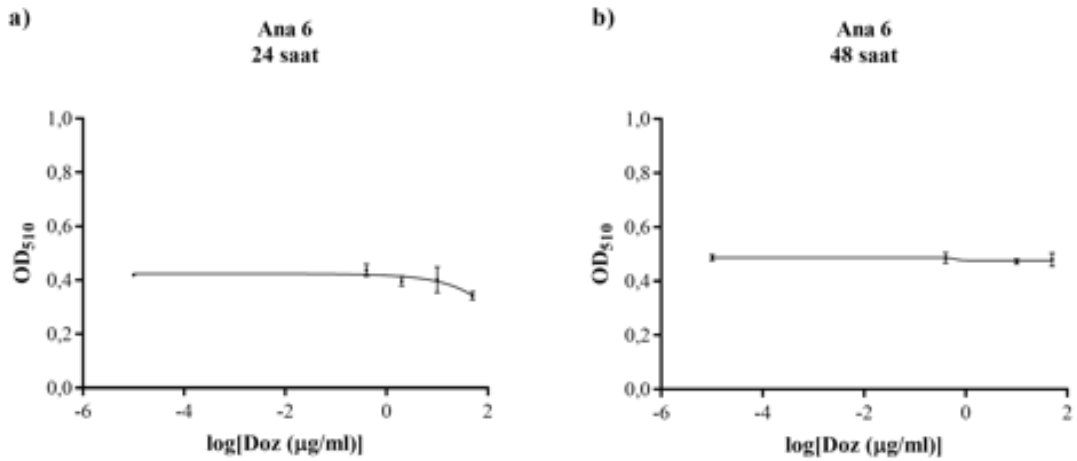


Şekil 4.44. Ana 5 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 5 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

Şekil 4.43. ve Şekil 4.44. incelendiğinde Ana 5 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığı ve sürelerde iki hücre hattı üzerinde de anti-proliferatif etki göstermediği görülmektedir.

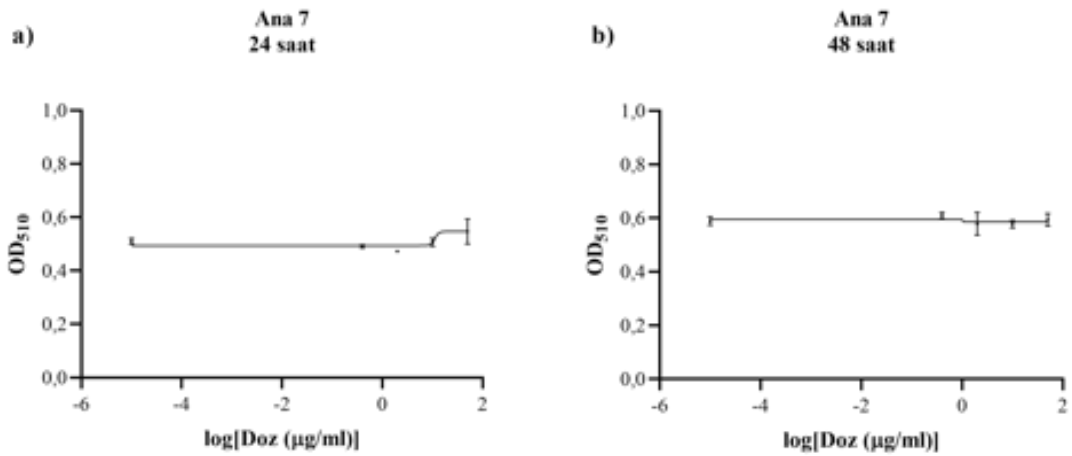


Şekil 4.45. Ana 6 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 6 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

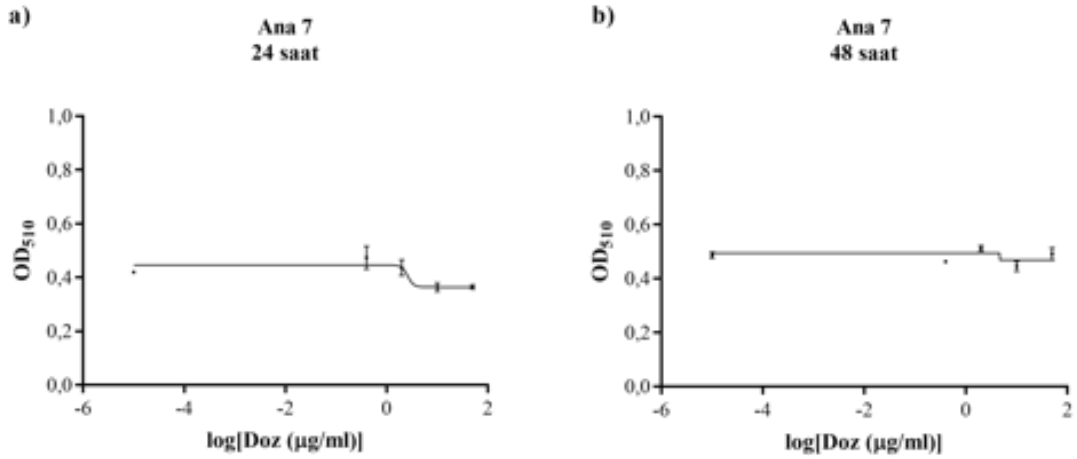


Şekil 4.46. Ana 6 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 6 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

Şekil 4.45. ve Şekil 4.46. incelendiğinde Ana 6 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığı ve sürelerde iki hücre hattı üzerinde de anti-proliferatif etki göstermediği görülmektedir.

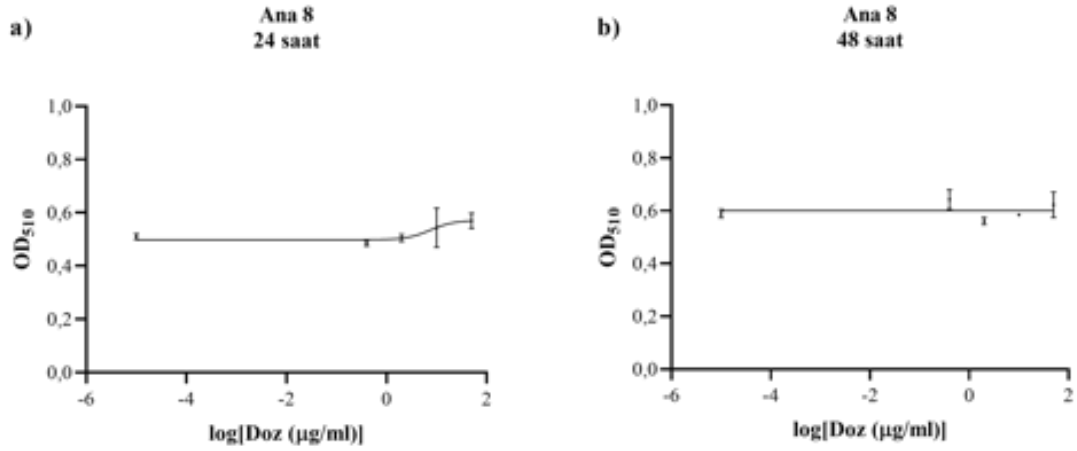


Şekil 4.47. Ana 7 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 7 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

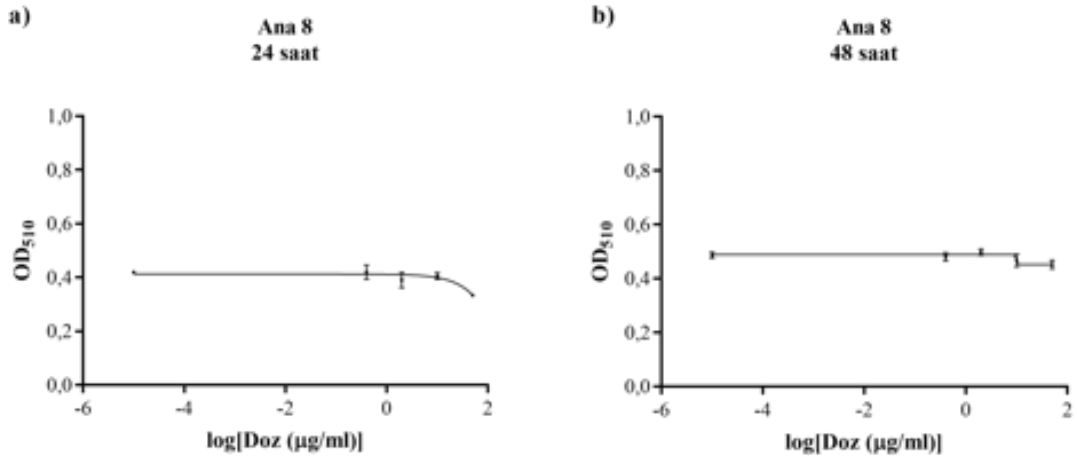


Şekil 4.48. Ana 7 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 7 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

Şekil 4.47. ve Şekil 4.48. incelendiğinde Ana 7 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığı ve sürelerde iki hücre hattı üzerinde de anti-proliferatif etki göstermediği görülmektedir.

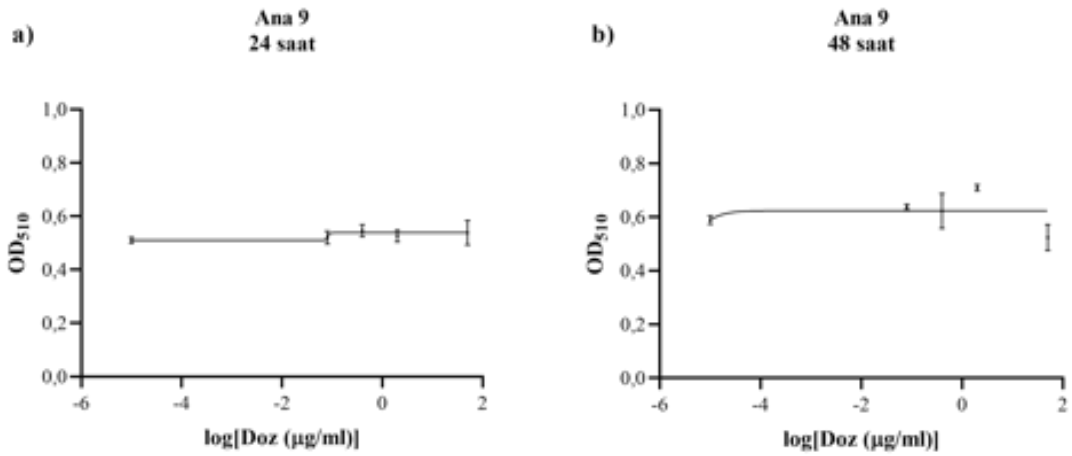


Şekil 4.49. Ana 8 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 8 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

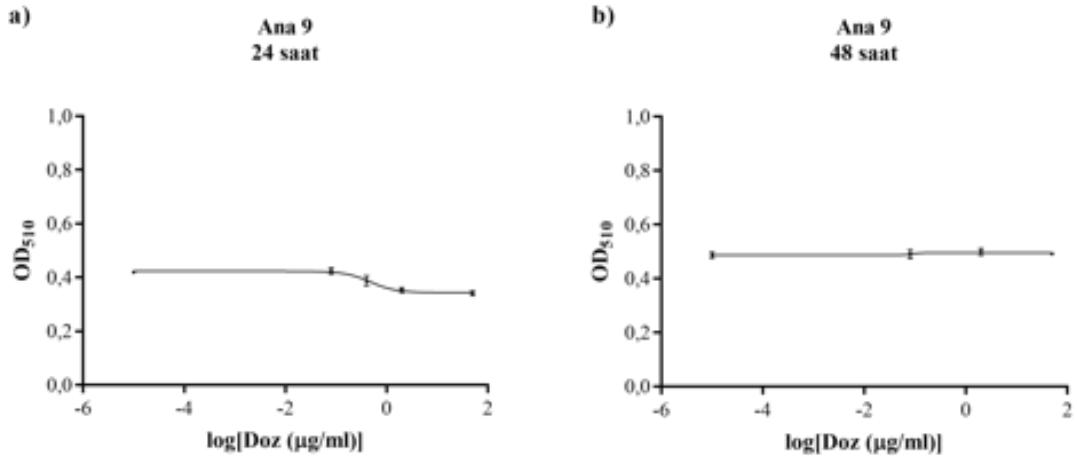


Şekil 4.50. Ana 8 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 8 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

Şekil 4.49. ve Şekil 4.50. incelendiğinde Ana 8 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığı ve sürelerde iki hücre hattı üzerinde de anti-proliferatif etki göstermediği görülmektedir.

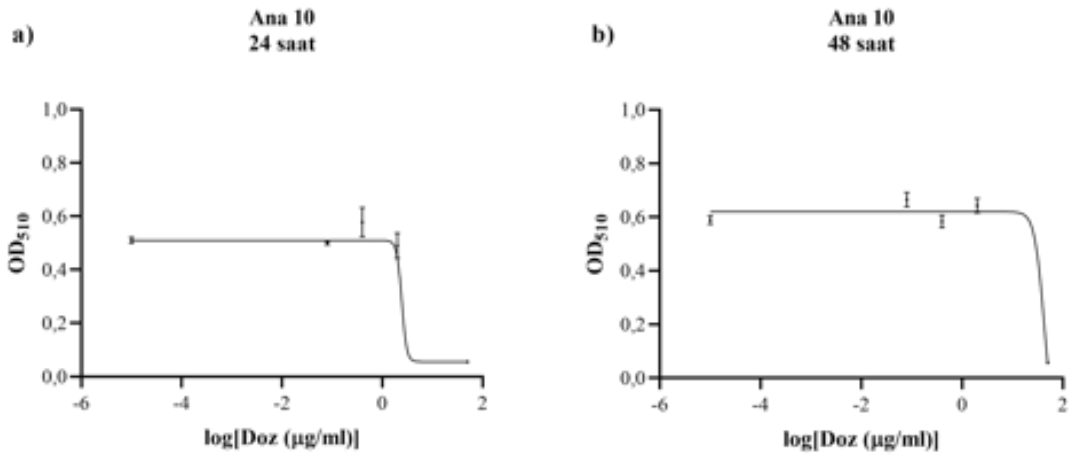


Şekil 4.51. Ana 9 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 9 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

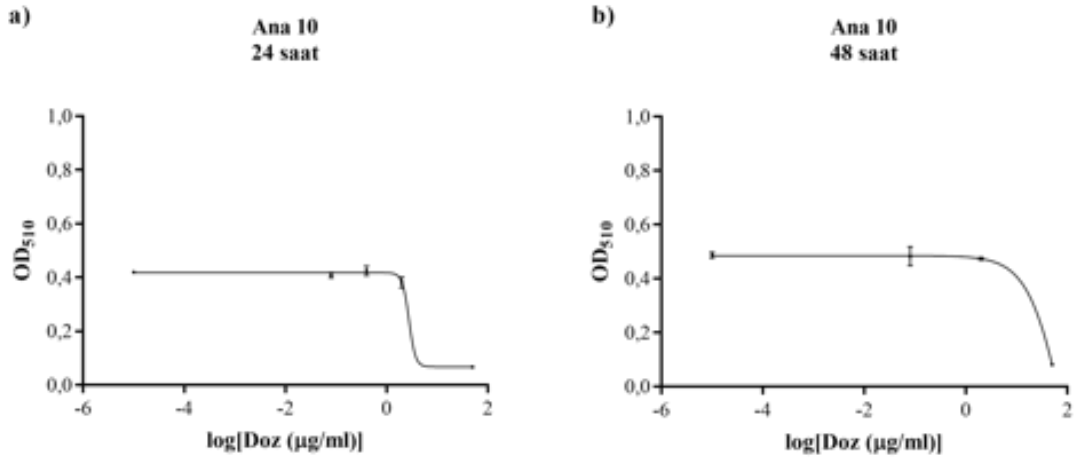


Şekil 4.52. Ana 9 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 9 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

Şekil 4.51. ve Şekil 4.52. incelendiğinde Ana 9 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığı ve sürelerde iki hücre hattı üzerinde de anti-proliferatif etki göstermediği görülmektedir.

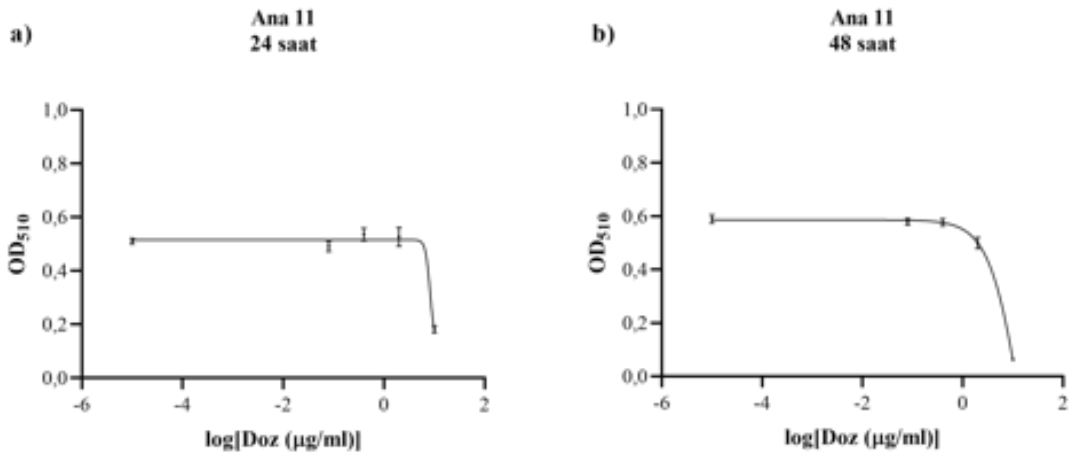


Şekil 4.53. Ana 10 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 10 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

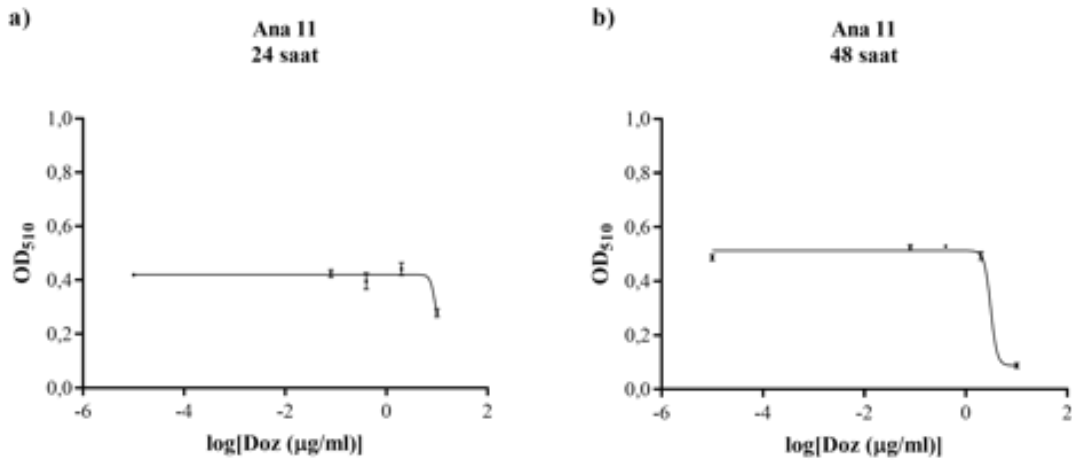


Şekil 4.54. Ana 10 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 10 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

Şekil 4.53. ve Şekil 4.54. incelendiğinde Ana 10 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığı ve sürelerde hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücre hattı üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.55. Ana 11 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 11 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.



Şekil 4.56. Ana 11 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi. Ana 11 fraksiyon konsantrasyonuna bağlı olarak a) 24 saat, b) 48 saat sonundaki cevabı gösteren eğriler.

Şekil 4.55. ve Şekil 4.56. incelendiğinde Ana 11 fraksiyonunun denenen konsantrasyon aralığı ve sürelerde hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücre hattı üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Ana 10 fraksiyonu için farklı zaman noktalarında farklı hücre hatları için hesaplanan öncül  $GI_{50}$ , TGI ve  $LC_{50}$  değerleri.

Hücre hattı	24 saat			48 saat		
	$GI_{50}$	TGI	$LC_{50}$	$GI_{50}$	TGI	$LC_{50}$
	µg/ml					
MDA-MB-231	18,88	30,48	42,09	12,31	26,32	40,34
MCF-7	22,18	33,76	45,35	9,74	25,80	41,87

Şekil 4.45. – Şekil 4.56. arasındaki grafiklerle özetlenen öncül sonuçlar incelendiğinde, sadece Ana 10 ve 11 fraksiyonlarının anti-proliferatif etkisi belirlenebilirken, diğer fraksiyonlar için denenen konsantrasyon aralıklarında bu etkiyi belirlemek mümkün olmamıştır. Bu fraksiyonların ham venom içindeki yüzdesinin oldukça düşük olması ve denenen doz aralığında etki görülmemesi sebebiyle çalışmanın devamında bu fraksiyonların çalışmadan çıkarılmasına karar verilmiştir. Bu doğrultuda etkin fraksiyon olarak belirlenen sadece Ana 10 ve 11 fraksiyonları için hücre popülasyonunun büyümesini inhibe eden dozlar hesaplanarak sırasıyla Çizelge 4.6. ve 4.7.’de verilmiştir.

Bir diğ er yandan Ş ekil 4.15. ve 4.32. arasında verilen grafikler ile bu bölüm kapsamında sunulan grafikler karşılaştırıldığında Ana 9 fraksiyonunda yüksek oranda Ana 5, 6, 8 fraksiyonlarında ise daha düşük oranlarda sitotoksik etki görülmesine rağmen bu fraksiyonlarda anti-proliferatif etkinin gözlenmemesi, literatürde sıklıkla birbiri yerine yanlış olarak kullanılan bu iki fenomenin birbirinden ayrı olduğu gerçeğini desteklemektedir. Basit bir vital boya taraması ile gerçekleştirilen, popülasyondaki hücrelerin yarısının ölümünü değerlendiren sitotoksisite testi ile uygulanan maddenin popülasyon büyümesini durduran sitostatik etkisini değerlendiren proliferasyon testinin birbirinden ayrıldığı gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. incelendiğinde MDA-MB-231 hücre hattının MCF-7 hücre hattına göre Ana 10 peptidinin anti-proliferatif etkisine ilk 24 saat içine daha hassas olduğu, ancak uygulamanın 48 saate devam etmesi durumunda MCF-7'nin diğ er hücre hattına kıyasla daha hassas özellik kazandığı görülmektedir. Bunun yanında her iki hücre hattında da uygulama süresinin uzaması  $GI_{50}$ , TGI ve  $LC_{50}$  değerlerinin düşmesine sebep olmuştur.

Çizelge 4.7. Ana 11 fraksiyonu için farklı zaman noktalarında farklı hücre hatları için hesaplanan öncül  $GI_{50}$ , TGI ve  $LC_{50}$  değerleri.

Hücre hattı	24 saat			48 saat		
	$GI_{50}$	TGI µg/ml	$LC_{50}$	$GI_{50}$	TGI µg/ml	$LC_{50}$
MDA-MB-231	5,04	7,53	10,03	2,61	5,40	8,19
MCF-7	6,60	10,16	13,71	4,48	6,83	9,17

Çizelge 4.7. incelendiğinde MDA-MB-231 hücre hattının MCF-7 hücre hattına göre Ana 10 peptidinin anti-proliferatif etkisine hem 24 hem de 48 saat içinde daha hassas olduğu görülmektedir. Bunun yanında her iki hücre hattında da uygulama süresinin uzaması  $GI_{50}$ , TGI ve  $LC_{50}$  değerlerinin düşmesine sebep olmuştur.

Ana 10 ve 11 fraksiyonları için hesaplanan  $GI_{50}$  değerleri karşılaştırıldığında Ana 11'in diğ erine kıyasla daha etkili olması ve ham venomda bulunma yüzdesinin çok yüksek olması sebebiyle tez çalışmasına bu fraksiyonla devam edilmesine karar verilmiştir.



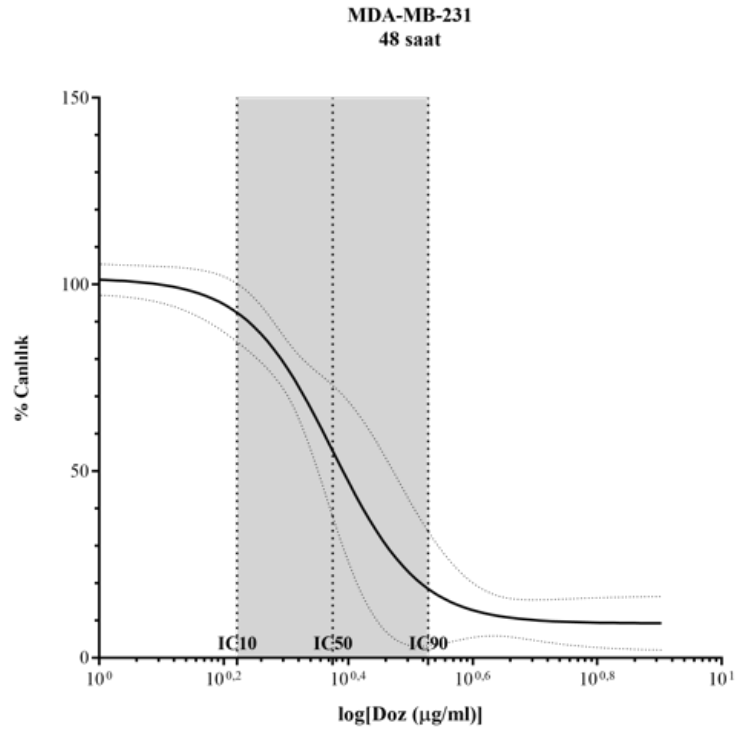
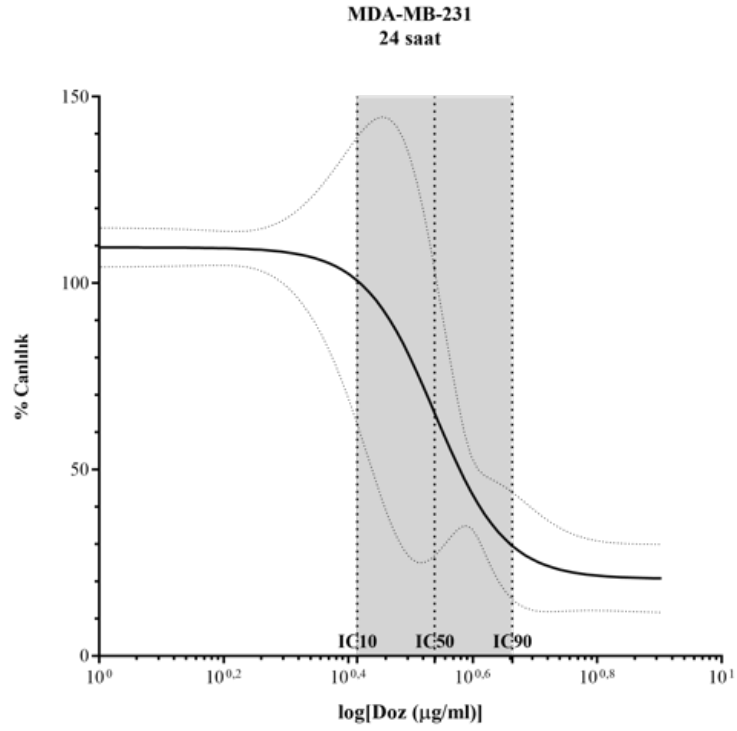
#### 4.7. Ana 11 Fraksiyonunun Anti-proliferatif Etkisinin Belirlenmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında çalışmaya devam edilecek Ana 11 fraksiyonunun etkisinin daha kesin bir şekilde hesaplanabilmesi için denenen konsantrasyon aralıkları 2 kat dilüsyonlar olacak şekilde daraltılmış ve 0,5, 1, 2, 4, 8 µg/ml Ana 11 fraksiyonu 24 ve 48 saat süreyle hücre hatlarına uygulanmıştır. Aynı zamanda Ana 11 fraksiyonunun anti-proliferatif etki çalışmaları 5 teknik ve 5 biyolojik replika olacak şekilde artırılarak tamamlanmıştır. Ana 11 fraksiyonunun MCF-10A üzerindeki anti-proliferatif etkisi, MCF-10A hücre hattının, zaman, besi ortamı katkıları ve kültür koşulları bakımından kültürü zorlu olan bir hücre hattı olması sebebiyle doz-cevap çalışmalarının son basamağı olarak değerlendirilmiştir.

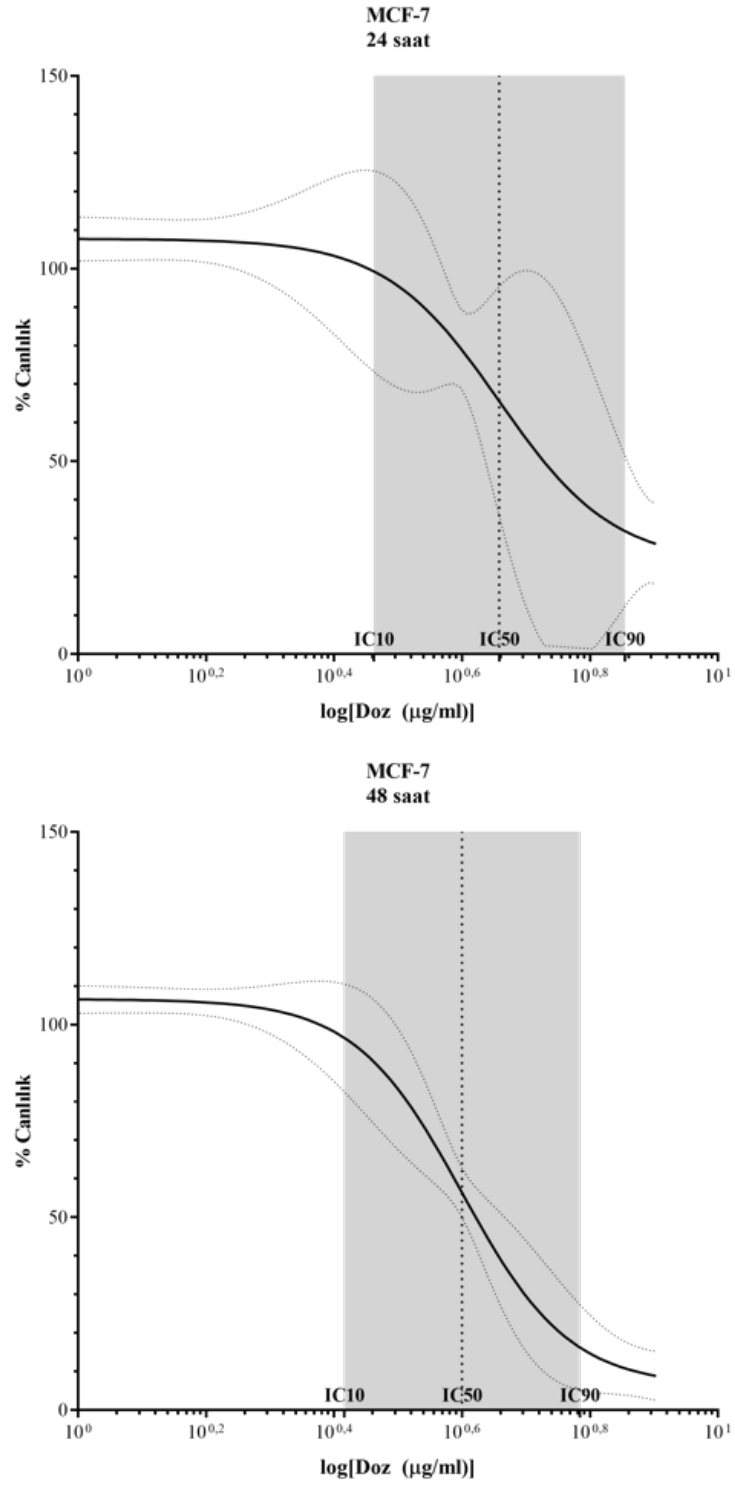
Tüm tekrarlar için sonuçlar normalize edilerek birleştirilmiş ve her bir hücre hattı için doz-cevap eğrileri doğrusal olmayan regresyon analizi ile oluşturulmuştur. Her bir eğrinin denkleminde büyüme inhibisyon dozları olan GI<sub>50</sub>, GI<sub>90</sub> ve GI<sub>10</sub> dozları, GraphPad Prism yazılımı ile belirlenmiştir (Çizelge 4.8.). Böylelikle, bu aşamada belirlenen dozlara göre takip eden iş paketlerinde kullanılacak dozların belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmalara GI<sub>50</sub> dozunun altında ve GI<sub>10</sub> dozunun üzerinde olan dozlarla devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.8. Ana 11 fraksiyonunun tez çalışmasında kullanılan tüm hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkisini belirtilen GI<sub>10</sub>, GI<sub>50</sub>, GI<sub>90</sub> değerleri.

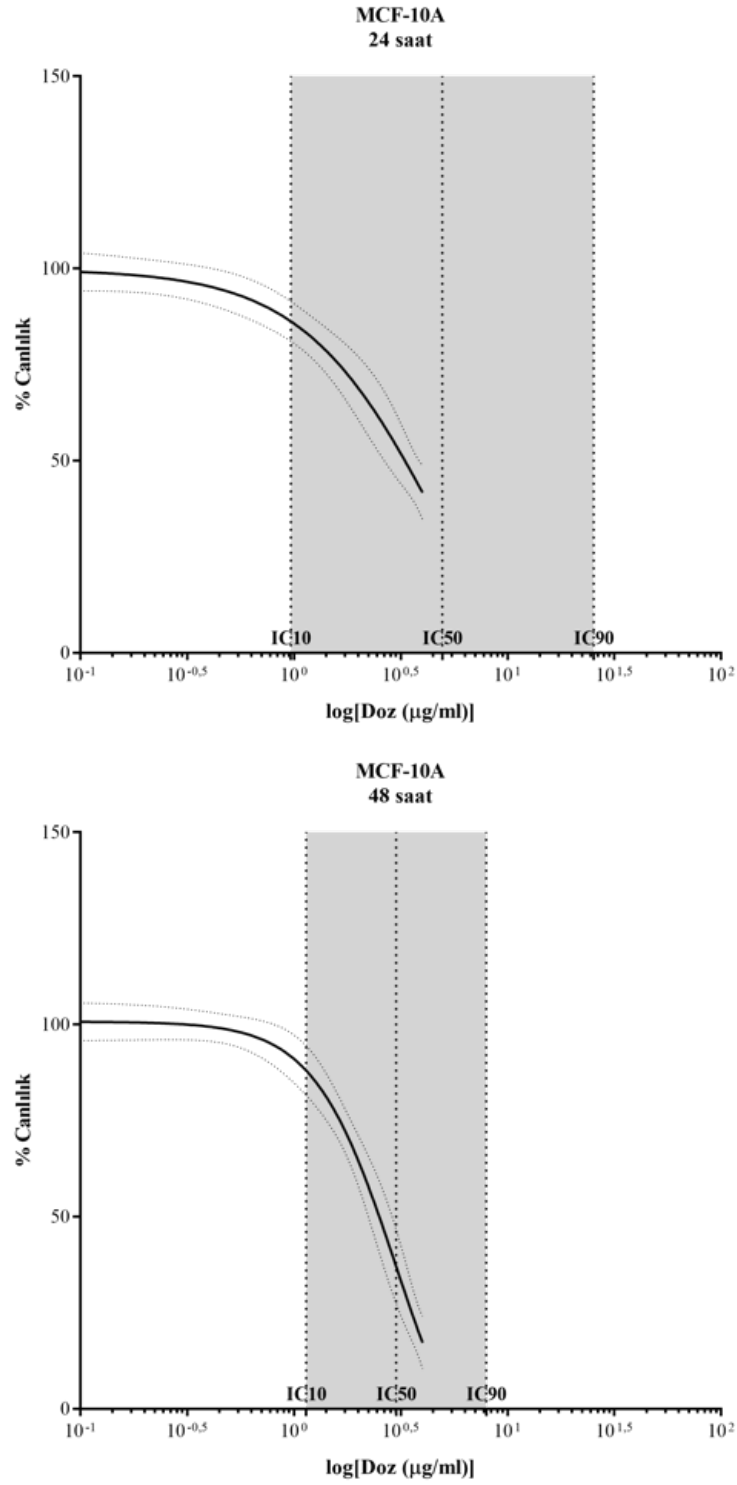
Hücre hattı	24 saat			48 saat		
	GI <sub>10</sub>	GI <sub>50</sub>	GI <sub>90</sub>	GI <sub>10</sub>	GI <sub>50</sub>	GI <sub>90</sub>
	µg/ml			µg/ml		
MDA-MB-231	2,60	3,46	4,61	1,67	2,37	3,38
MCF-7	2,90	4,55	7,15	2,61	3,98	6,08
MCF-10A	0,97	4,95	25,34	1,14	3,01	7,95



Şekil 4.57 Ana 11 fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde a) 24 saat ve b) 48 saat sonundaki etkisinin normalize edilmiş veriler ile oluşturulmuş doz-cevap grafiği.



Şekil 4.58. Ana 11 fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerinde a) 24 saat ve b) 48 saat sonundaki etkisinin normalize edilmiş veriler ile oluşturulmuş doz-cevap grafiği.



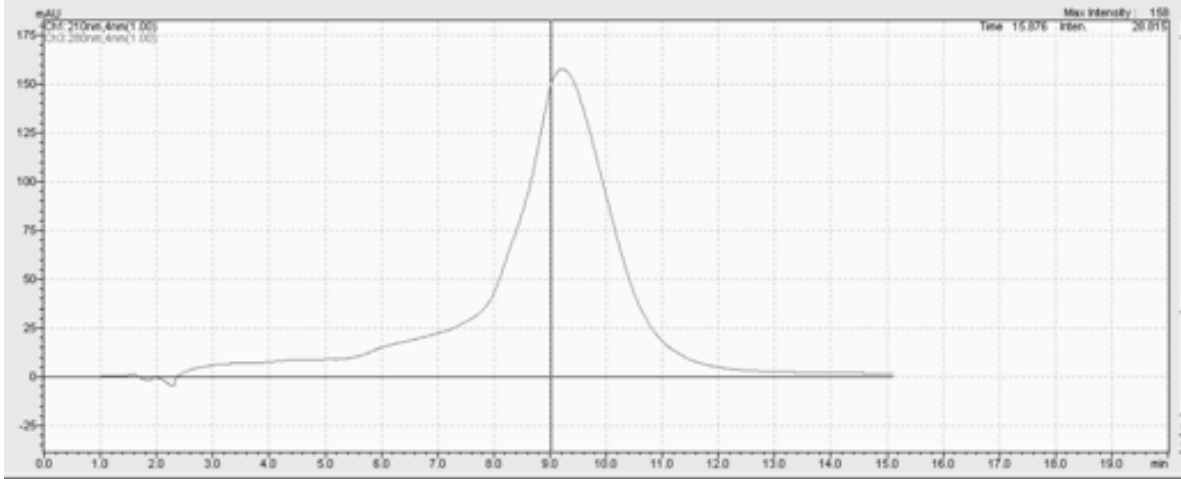
Şekil 4.59. Ana 11 fraksiyonunun MCF-10A hücre hattı üzerinde a) 24 saat ve b) 48 saat sonundaki etkisinin normalize edilmiş veriler ile oluşturulmuş doz-cevap grafiği.

Şekil 4.57., Şekil 4.58. ve Şekil 4.59. ile Çizelge 4.8. birlikte incelendiğinde, artan Ana 11 fraksiyonu konsantrasyonları karşısında MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarının proliferasyonunun doza ve zamana bağlı olarak inhibe olduğu görülmektedir. Hücre popülasyonunun %50'sinin büyümesini inhibe eden  $GI_{50}$  değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında ise Ana 11 fraksiyonunun etkisinin her bir hücre hattı için farklı olduğu görülmektedir. Fraksiyonun etkisine en hassas olan hücre hattının her iki zaman noktası için de MDA-MB-231 olduğu belirlenmiştir. Bunu ilk 24 saat için sırasıyla MCF-7 ve MCF-10A hücre hatları takip etmektedir. Ancak 48 saat sonunda MCF-10A hücre hattının MCF-7'ye göre daha hassas olduğu görülmektedir.

Ana 11 fraksiyonunun üçlü negatif özellikte ve metastatik karakterdeki MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde diğer meme kanser hücre hattına ve normal meme epitel hücre hattına kıyasla daha etkili olması kanser üzerindeki olası terapötik etkisi açısından umut vaat edici bulunmaktadır.

#### **4.8. Ana 11 Fraksiyonunun Saflığının Belirlenmesi**

Ham arı venomunun RP-HPLC ile fraksiyonlarına ayrılması sonucu elde edilen Ana 11 fraksiyonunun proliferasyon üzerindeki etkisinin denenen konsantrasyon aralığında etkin görülmesi nedeni ile ve çalışmanın ilerleyen basamaklarında gerçekleştirilecek biyolojik aktivite çalışmalarında saf bir peptidin kullanılması amacı ile bu fraksiyonun ileri saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak 10-50 %D gradient ayırım metoduyla 40 dakika boyunca 1,5 ml/dk akış hızıyla katyon değişim kromatografisi yapılmıştır. Kromatografik ayırım sonucunda 40 dakika içinde herhangi bir fraksiyon elde edilememiştir (veri gösterilmemiştir). Ancak akış hızı sabit tutularak D gradientinin artmasına izin verilerek kolon yıkanmaya devam edilmiştir. Böylece 40 + 9. dakikada kolona yüklenen Ana 11 fraksiyonu yine tek bir fraksiyon olarak elde edilmiştir (Şekil 4.60.).



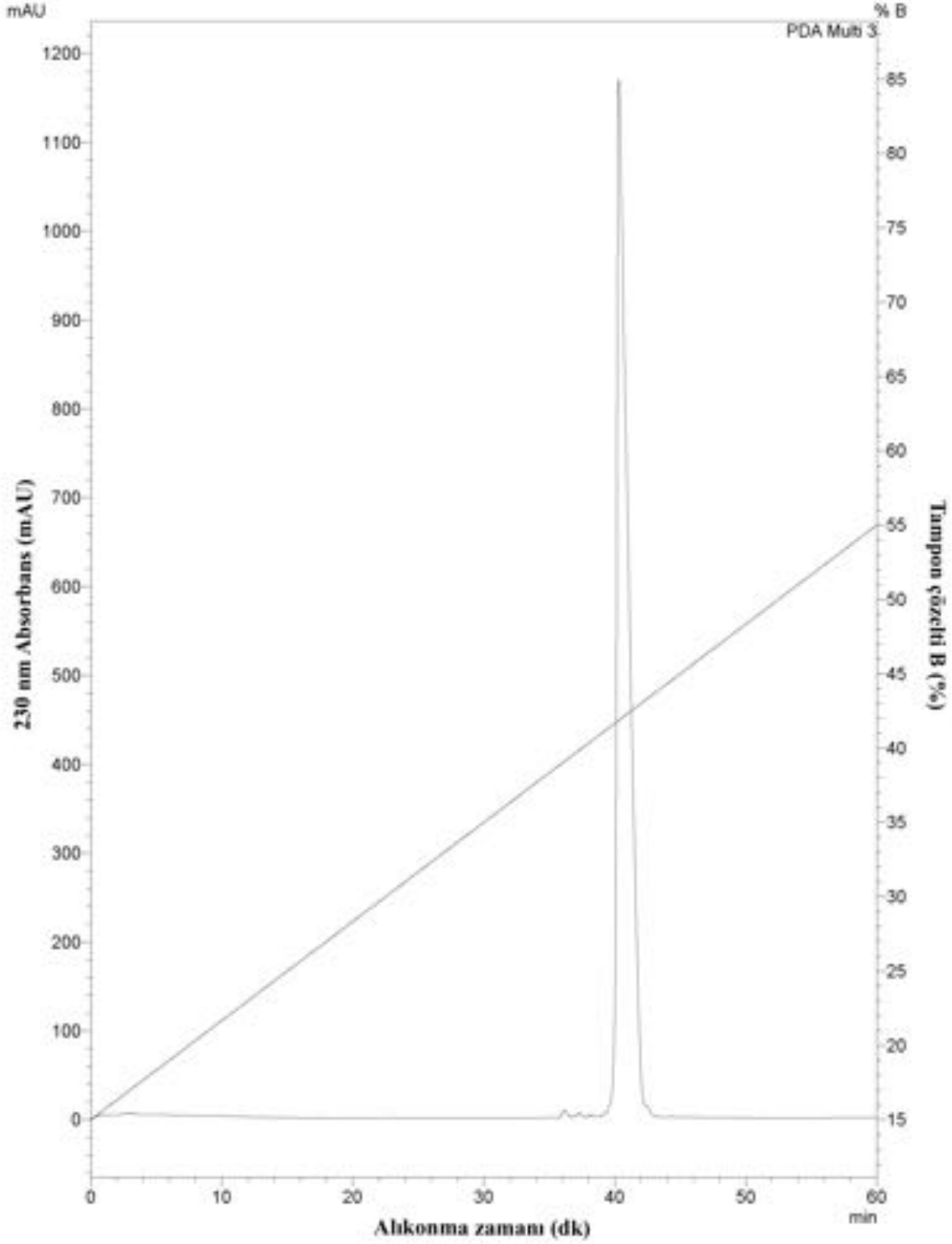
Şekil 4.60. Ana 11 fraksiyonunun katyon değişim HPLC kromatogramı.

Katyon değişim kromatografisini takiben ikincil olarak 15-55 %B gradient ayırım metoduyla ters faz sıvı kromatografisi yapılmıştır. Burada B gradienti daraltılarak varsa fraksiyondaki diğer bileşenlerin fraksiyondan ayrılması amaçlanmıştır. Bu yöntem ile de yine alıkonma zamanı ( $R_T$ ) 44,40. dakikada olan tek bir fraksiyon elde edilmiştir (Şekil 4.61.)

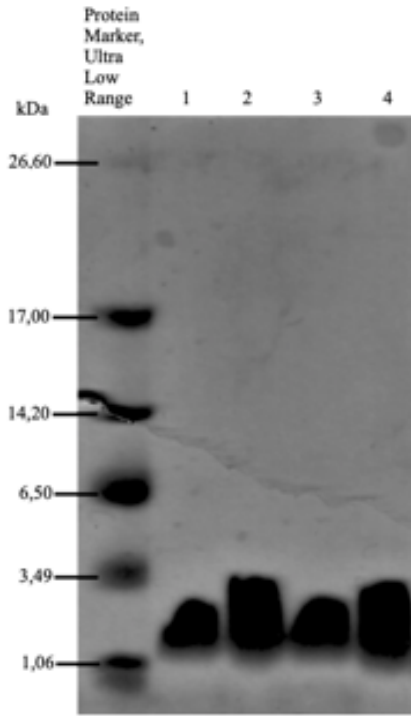
Ana 11 fraksiyonunun 15-55 %B gradienti ile kromatografik olarak ayrıştırılan fraksiyon kolondan geri toplanırken fraksiyonun sol ve sağ tarafı ayrı ayrı toplanmış ve vakum konsantratörde ayrı ayrı kurutulmuştur. Distile su içinde çözülerek protein miktarı NanoDrop spektrofotometreyle belirlenmiştir. Fraksiyonun saflığından elektroforetik olarak da emin olmak amacıyla bu kez ayırma gücü çok daha yüksek olan (<5kDa) %10 ve %16'lık Tris-Trisin SDS-PAGE elektroforezi yapılmıştır. Fraksiyonun sol ve sağ kolları ayrı ayrı olmak üzere her bir kuyuya 5 ve 10  $\mu$ g madde yüklenerek Coomassie Blue boyaması yardımıyla analiz edilmiştir (Şekil 4.62. ve 4.63.).

Her iki jel görüntüsü de incelendiğinde tüm kuyularda 1,06 kDa ile 3,49 kDa arasında tek bir bantın varlığı gözlenmektedir. %16 ve %10 Tris-Trisin jel görüntüleri arasında bant sayısı bakımından bir fark görülmemektedir. Bunun yanında sol kol ve sağ kol olarak ayrılan fraksiyonların birbiriyle aynı yerde bant oluşturduğu görülmektedir. 2. ve 4. kuyulardaki bantların diğerlerine kıyasla biraz daha yukarıda görünmesi fazla miktarda protein yüklenmiş olmasından kaynaklanmaktadır.

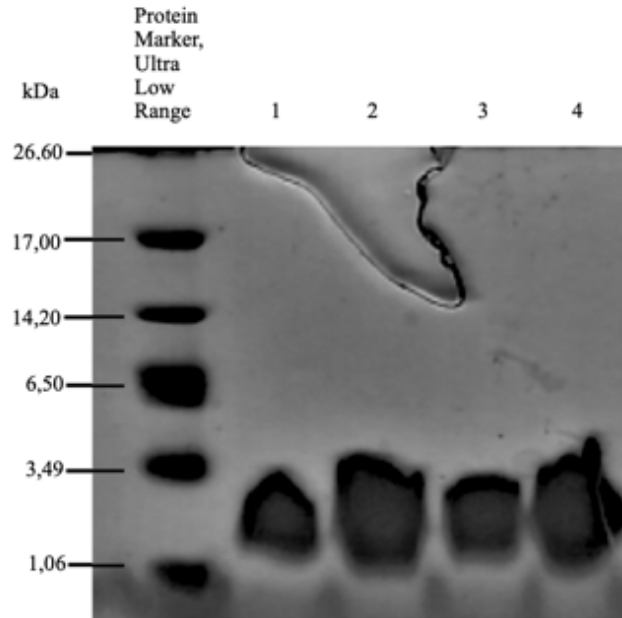
Jel görüntülerinin analizi ve kromatogramlardan alınan veriler doğrultusunda Ana 11 fraksiyonunun saf bir peptid fraksiyon olduğu sonucuna varılmıştır. Saflığının gösterilmesi sebebiyle bundan böyle Ana 11 fraksiyonu “Ana 11 peptidi” olarak anılmıştır.



Şekil 4.61. Ana 11 fraksiyonunun 15-55% B gradient RP-HPLC kromatogramı.



Şekil 4.62. Ana 11 fraksiyonunun %10'luk Tris-Trisin SDS-PAGE analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü. Ana 11 fraksiyon; 1: sol kol, 5µg, 2: sol kol, 10 µg, 3: sağ kol, 5 µg, 4: sağ kol, 10 µg.

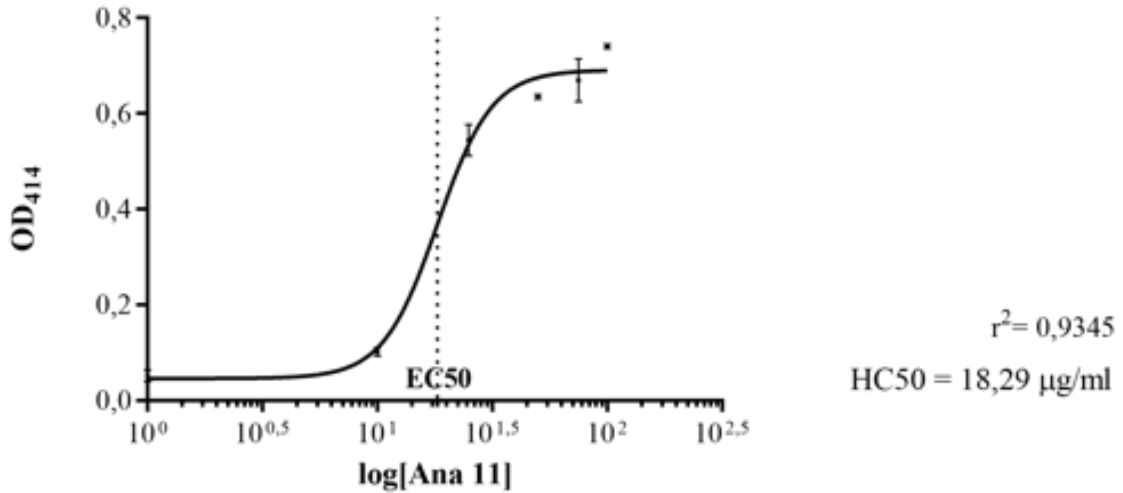


Şekil 4.63. Ana 11 fraksiyonunun %16'luk Tris-Trisin SDS-PAGE analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü. Ana 11 fraksiyon; 1: sol kol, 5µg, 2: sol kol, 10 µg, 3: sağ kol, 5 µg, 4: sağ kol, 10 µg.



#### 4.9. Ana 11 Peptidinin Hemolitik Aktivitesinin Belirlenmesi

Arı venomunun ve bazı venom bileşenlerinin güçlü hemolitik aktivitesi bulunduğu bilinmektedir. Bu sebeple Ana 11 peptidinin işlevsel karakterizasyonu yapılmadan önce direkt hemolitik aktivitesinin belirlenmesinin gerekli olduğu düşünülmüştür. İnsan eritrositleri ile gerçekleştirilen direkt hemolitik aktivite testi sonucunda HC<sub>50</sub> değeri 18,29 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.64.). Bu konsantrasyonun belirlenen anti-proliferatif dozların çok üzerinde olması sebebiyle çalışmaya belirlenen anti-proliferatif dozlarla devam edilebileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.64. Ana 11 peptidinin hemolitik aktivitesini gösteren HC<sub>50</sub> grafiği.

Literatürde farklı yöntemlerle ve farklı kaynaklardan elde edilen eritrositler üzerinde belirlenen hemolitik aktivite değerleri çok çeşitlilik gösterse de bu konuda yapılmış oldukça kapsamlı öncül bir çalışmanın sonuçları ile tez çalışması kapsamında bulunan HC<sub>50</sub> değerinin birbiriyle uyumlu olduğu bulunmuştur (Blondelle ve Houghten, 1991).

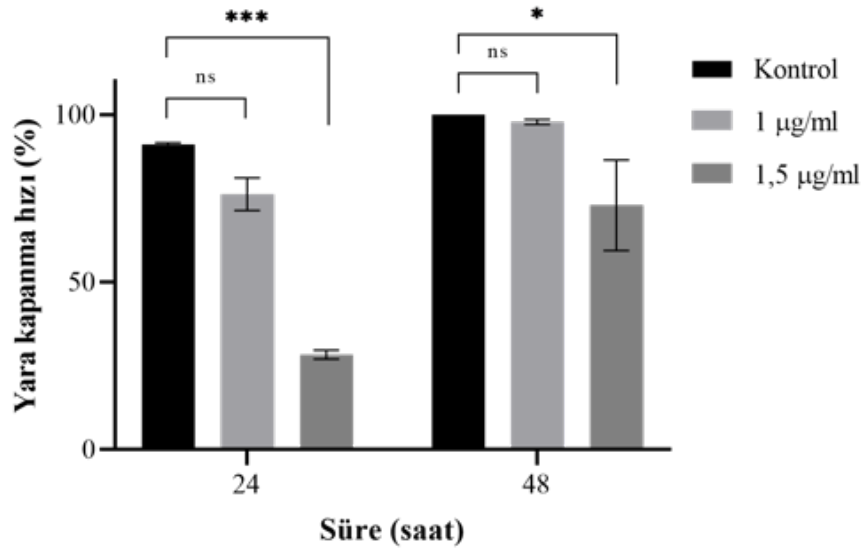
#### 4.10. Ana 11 Peptidinin Hücre Hareketliliği Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında etkinliği belirlenen peptidin olası anti-metastatik etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. İki boyutlu yönde hücre hareketliliği ve ekstraselüler matriksin degrade edilerek hücrelerin damar içine invazyonu kanser

metastazının en karakteristik özelliklerindedir. Dolayısıyla çalışmanın bu aşamasında, Ana 11 peptidinin kullanılan hücre hatları içinde hareketlilik özelliği gösteren, metastatik karakterdeki MDA-MB-231 hücre hattının hücre hareketliliği üzerine etkisinin belirlenmesi için çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

#### 4.10.1. Ana 11 peptidinin hücre lateral motilitesi üzerine etkileri

Ana 11 peptidinin hücrelerin lateral motilitesi üzerine etkisini belirlemek üzere kullanılacak konsantrasyon belirlenirken test sonuçlarının proliferasyon etkisinden etkilenmemesi için hücre çoğalmasını engelleyen bir doz olması amaçlanmıştır. Lateral motilite testi 24 ve 48 saatlerde takip edileceğinden T<sub>48</sub> GI<sub>50</sub> dozu olan 1,5 µg/ml üst sınır olarak belirlenmiştir. Bunun dışında 1 µg/ml konsantrasyonu da uygulanarak etkisi test edilmiştir.



Şekil 4.65. MDA-MB-231 hücre hattına ait 24 ve 48 saat sonunda elde edilen % yara kapanma hızı grafiği.

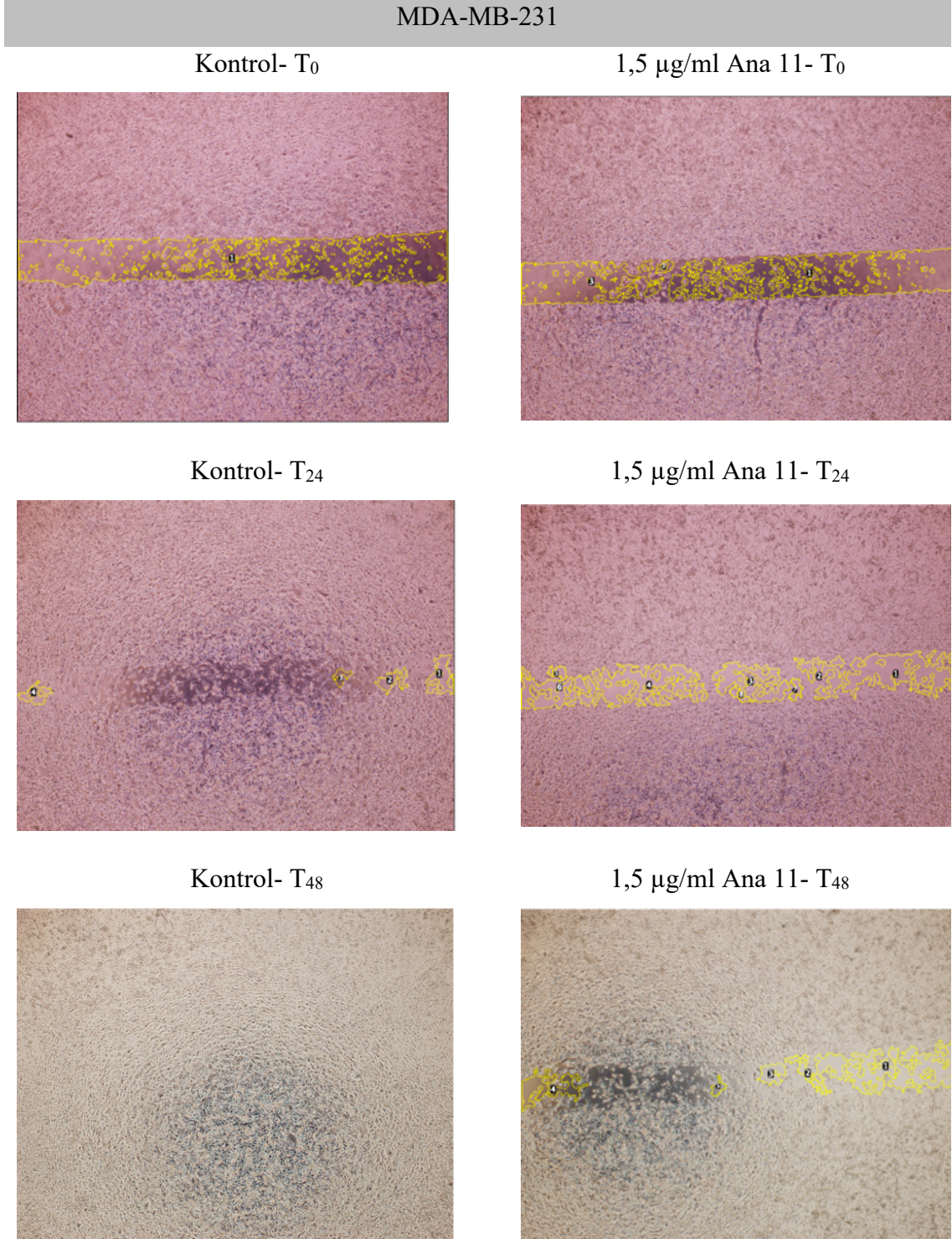
Şekil 4.66.'da silikon hücre kültür insertleri ile oluşturulan hücresiz alanlar ve alanlardaki kapanmanın zamana bağlı olarak değişimi Image J yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde ilk 24 saat içinde 1,5 µg/ml konsantrasyonda Ana 11 uygulanan deney grubunda kontrol grubuna kıyasla yara kapanma hızının %62,81 oranında azaldığı görülmüştür. İki yönlü ANOVA analizi sonucunda bu

farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p = 0,0007$ ). Uygulama süresi 48 saate uzatıldığında aynı gruptaki yara kapanma hızı bir miktar artış göstermiş olsa da yine de kontrol grubuna kıyasla %27,10 oranında azaldığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p = 0,0401$ ). Bunun yanında 1  $\mu\text{g/ml}$  Ana 11 uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla bir fark görülmemiştir (Şekil 4.65).

#### **4.10.2. Ana 11 peptidinin hücre invazyonu üzerine etkileri**

Bu aşamada ekstraselüler matriks bileşeni olan Matrigel üzerinden hücrelerin göçünü incelemek amacıyla yapılacak hücre invazyon testi için; kullanılan Matrigel konsantrasyonu, miktarı, ekilen hücre yoğunluğu, test süresi ve kullanılan ölçüm yönteminin optimize edilmesi gerekmiştir. Verileri burada sunulmayan optimizasyon çalışmalarının sonucunda 62,5  $\mu\text{g}$  Matrigel ile kaplanarak 16 saat inkübasyon gerçekleştirilen test koşulları optimum olarak belirlenmiştir. İnsert membranlar üzerine ekilecek hücre yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla yapılan deney sonucu en uygun hücre yoğunluğu  $5 \times 10^4$  hücre olarak belirlenmiştir (Şekil 4.67.).

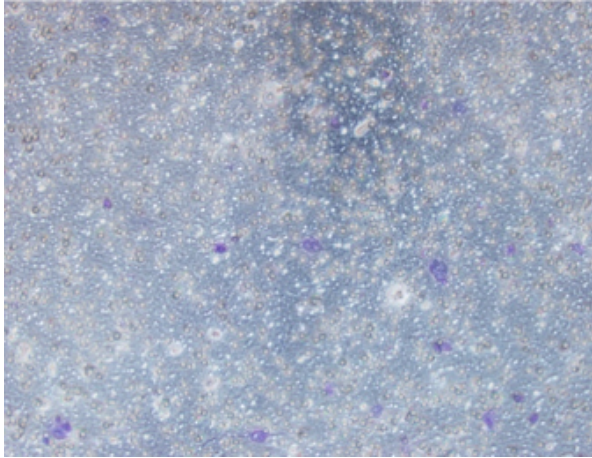
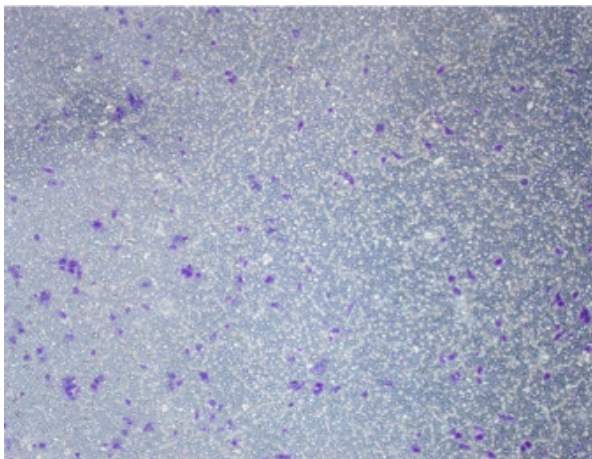
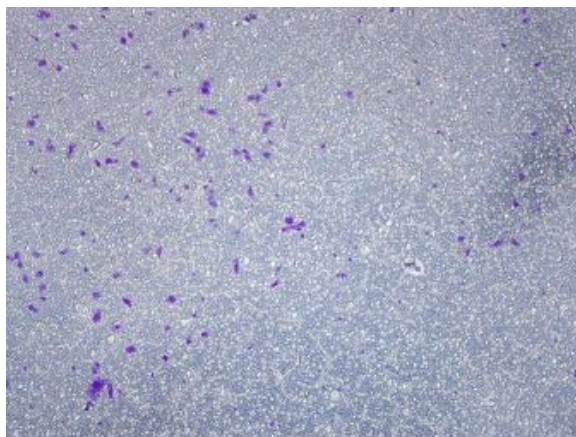
Ölçüm yöntemi olarak tez önerisinde belirtilen spektrofotometrik yöntem beklendiği şekilde çalışmamıştır. Bunun yerine, membran üzerine hücre fiksasyonu ve boyaması ve sonrasında hücre sayımı yöntemiyle göç eden hücre yoğunluğunun belirlenmesine karar verilmiştir. Hücre sayımı Image J yazılımı hücre sayım eklentisi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.



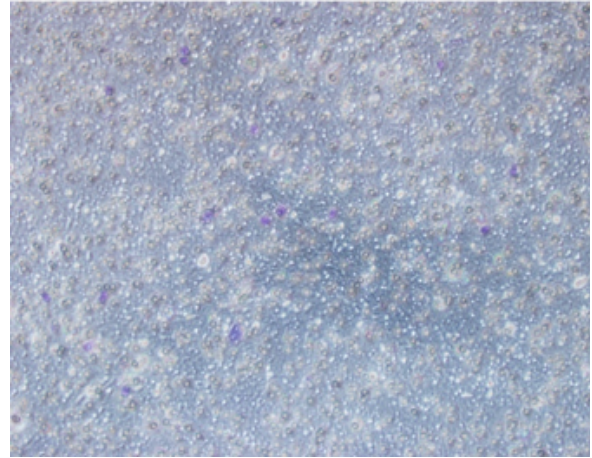
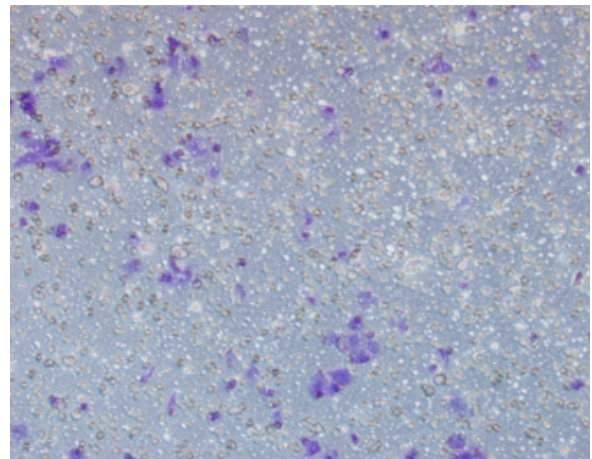
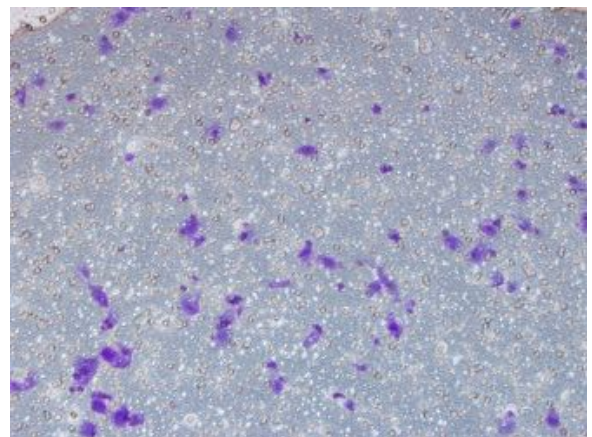
Şekil 4.66. MDA-MB-231 hücre hattına 1,5 µg/ml Ana 11 peptidi uygulaması yapılarak gerçekleştirilen lateral motilite testinin zamana bağlı fotoğrafları. Görüntüler inverted ışık mikroskobu kullanılarak, 10X büyütme altında her defasında aynı alan fotoğraflanarak elde edilmiştir. Analiz sırasında yazılım tarafından hesaplanan alanlar sarı çizgi ile çevrelenerek belirtilmiştir.

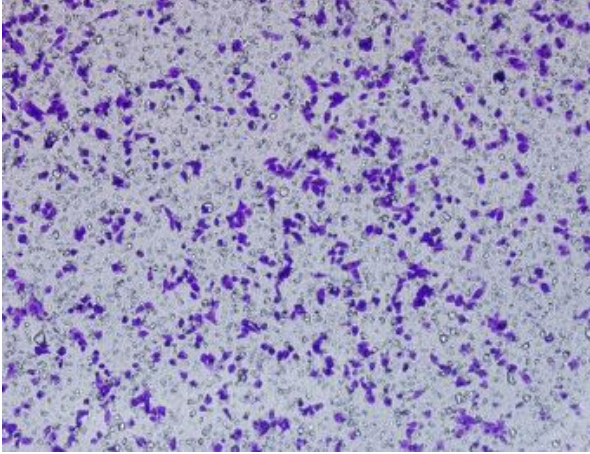
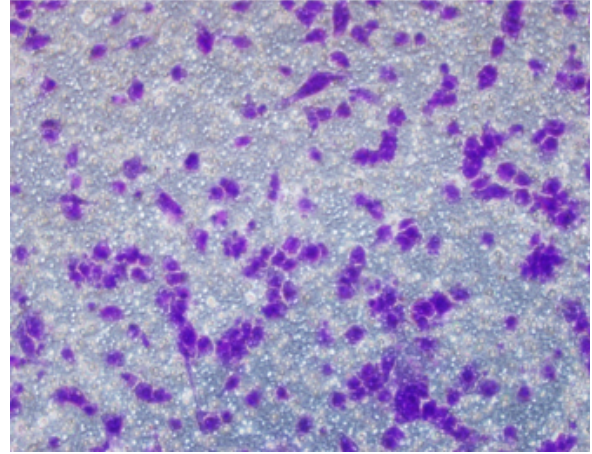
## MDA-MB-231

10X büyütme

 $2 \times 10^4$  hücre $3 \times 10^4$  hücre $4 \times 10^4$  hücre

40X büyütme

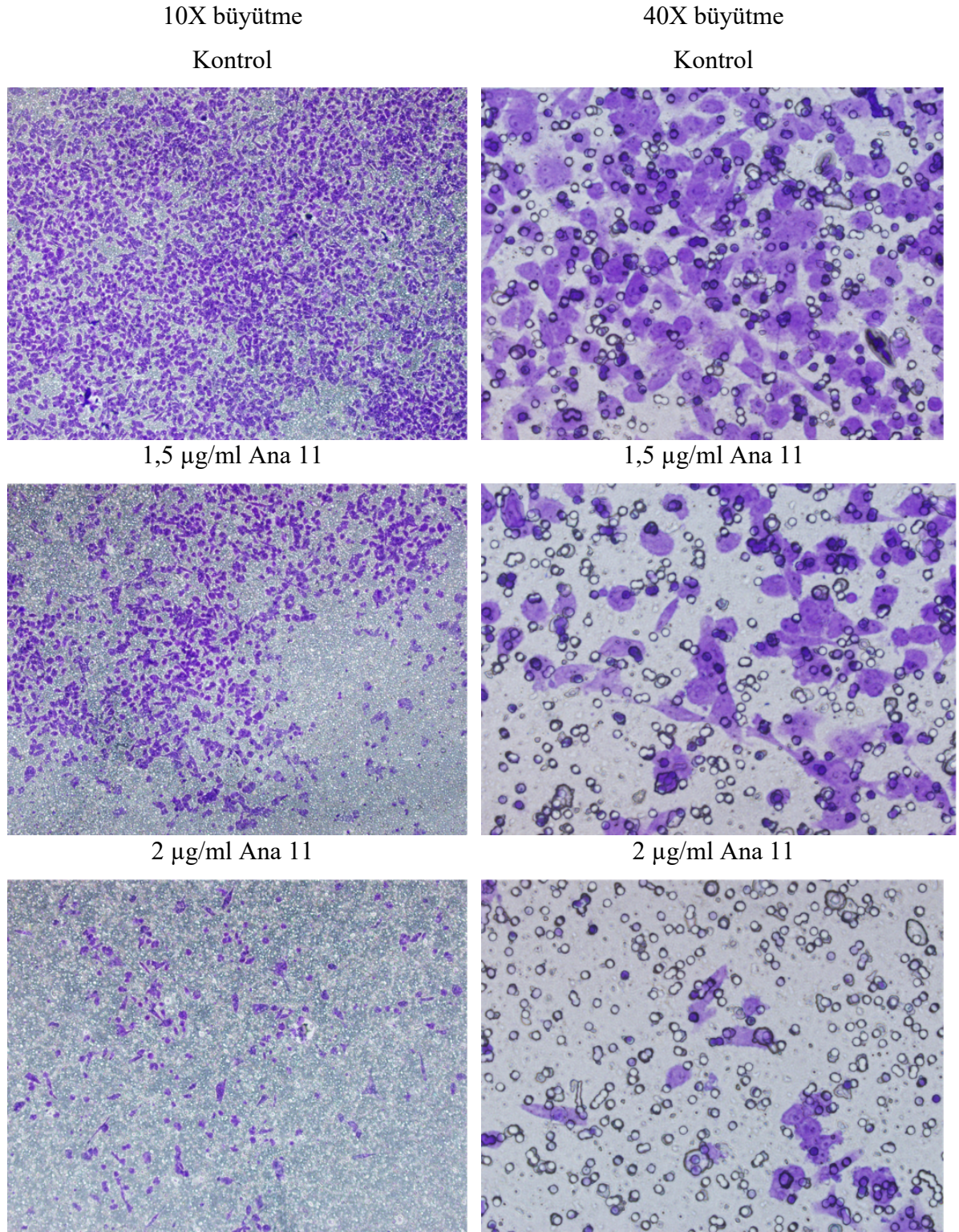
 $2 \times 10^4$  hücre $3 \times 10^4$  hücre $4 \times 10^4$  hücre

5 x 10<sup>4</sup> hücre5 x 10<sup>4</sup> hücre

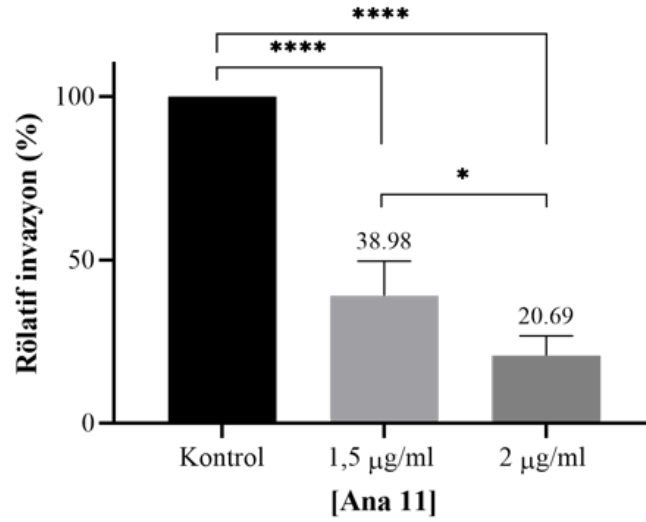
Şekil 4.67. Transwell invazyon testi için MDA-MB-231 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen optimum hücre sayısı denemesinin 10X ve 40X büyütme ile inverted mikroskop altında görüntülenmesiyle elde edilen fotoğraflar.

Lateral motilite testinde olduğu gibi bu testte de hücre proliferasyonu üzerinde etkisi olmayan bir konsantrasyon seçilmesi, deney sonuçlarıyla etkileşim olmaması açısından önem taşımaktadır. Bu amaçla, optimum deney süresinin 16 saat olduğu belirlendiği için etkisi araştırılacak Ana 11 fraksiyonu konsantrasyonu olarak MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat için belirlenen GI<sub>50</sub> değerinin alt konsantrasyonlarının seçilmesi uygun bulunmuştur. Diğer yandan lateral motilite testi sonuçlarıyla birlikte değerlendirilebilmesi amacıyla o test sonucu etkin bulunan 1,5 µg/ml ve bir üst dozu 2 µg/ml Ana 11 peptidinin transwell invazyon üzerindeki etkisinin test edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

## MDA-MB-231



Şekil 4.68. İki farklı dozda Ana 11 peptidi uygulanmış MDA-MB-231 hücre hattı ile gerçekleştirilen transwell invazyon deneyi sonucunda 10X ve 40X büyütme ile mikroskop altında görüntülenen membranların fotoğrafları.



Şekil 4.69. İki farklı dozda Ana 11 peptidi uygulanmış MDA-MB-231 hücre hattı ile gerçekleştirilen transwell invazyon deneyi sonucunda elde edilen rölatif invazyon yüzdeleri.

Şekil 4.68.'de bir örneği görülen kontrol ve uygulama gruplarının fotoğraflarında ekstraselüler matris materyalini degrade ederek membranın alt yüzeyine geçmiş hücreler görülmektedir. Deneyler sırasında örneklenen tüm alanlara ait fotoğraflar deneyden ve tez çalışmasından tamamen habersiz bir araştırmacı tarafından kör bir bakışla Image J yazılımı aracılığıyla sayılmıştır. Elde edilen veriler kontrol grubuna göre normalize edilerek birleştirilmiş ve rölatif invazyon hesaplanmıştır (Şekil 4.69.). Veriler incelendiğinde 1,5 µg/ml Ana 11 uygulanan deney grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında transwell invazyonda %61,02 oranında bir azalma görülürken, 2 µg/ml Ana 11 uygulanan grupta ise kontrol grubuna kıyasla %79,31 oranda bir azalma belirlenmiştir. Transwell invazyondaki bu dramatik azalma iki yönlü ANOVA analizi sonucuna göre de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.11. Akış Sitometrisi ile Ana 11 Peptidinin Fonksiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi

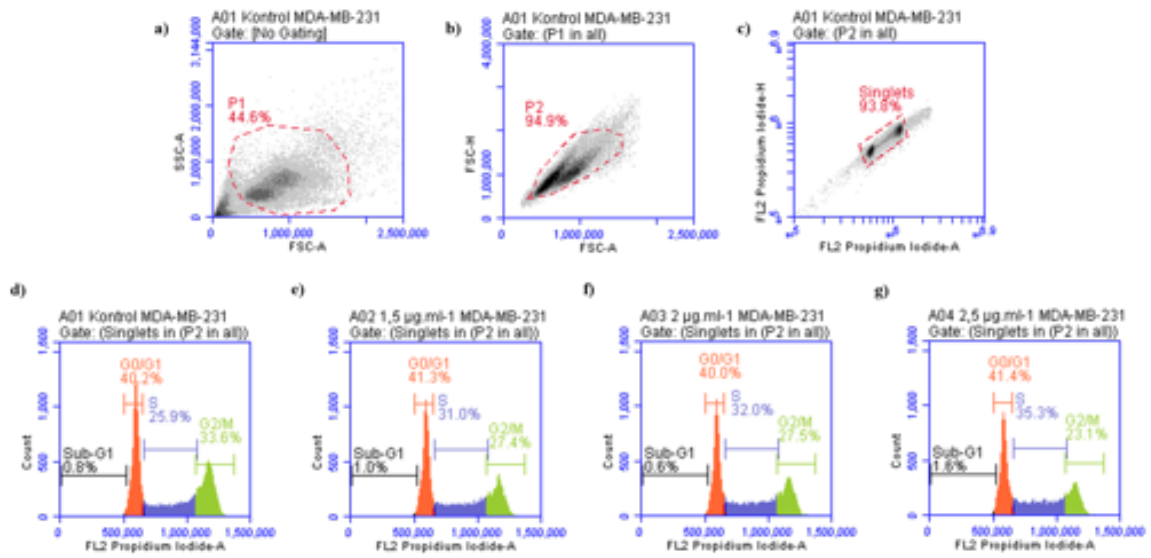
##### 4.11.1. Ana 11 peptidinin hücre döngüsü üzerine etkilerinin belirlenmesi

Hücre döngüsü analizi, bir hücre popülasyonunda bulunan hücrelerin oransal olarak hücre döngüsünün hangi aşamasında bulunduğu DNA miktarındaki değişime bağlı olarak analiz edilmesidir. Hücre döngüsü hücre proliferasyonunun regülasyonu olduğundan ve kanser hücreleri normalden farklı bir şekilde proliferasyon yaptıklarından hücre döngüsü analizi kanser çalışmaları içinde önemli bir yere sahiptir. Tez çalışması

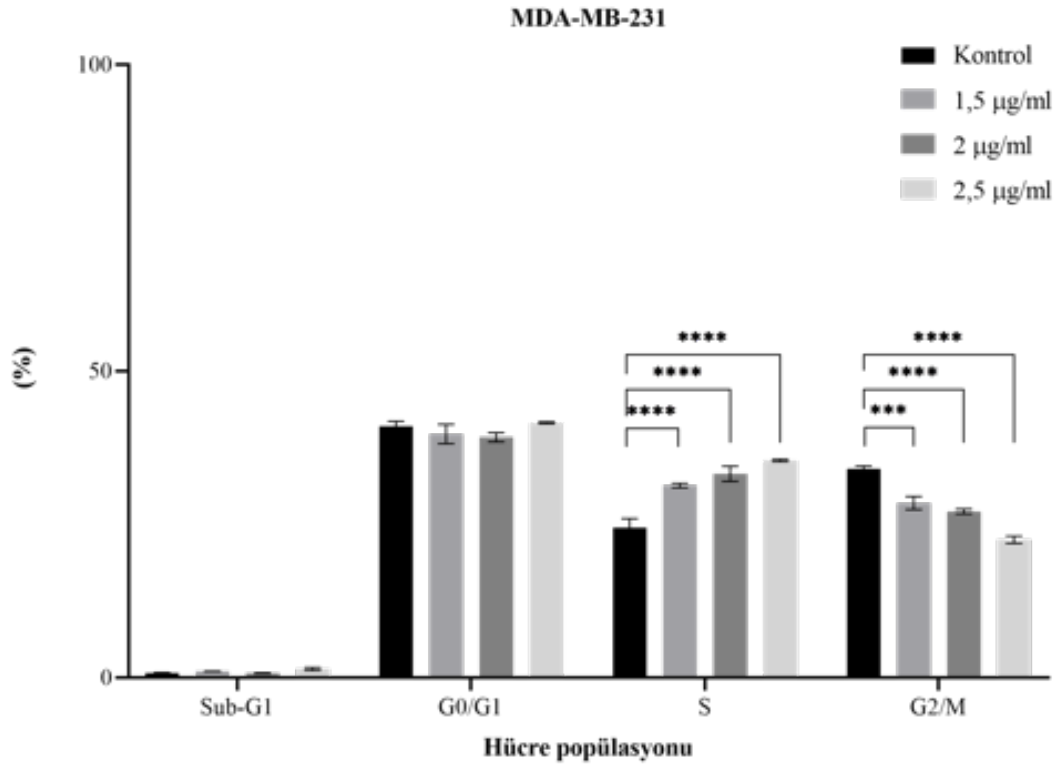


kapsamında bu amaçla DNA interkalasyon boyası PI ile boyanan ethanol ile fikse edilmiş hücreler akış sitometre cihazı ile analiz edilmiştir.

Hücre döngüsü analizi için 24 saatlik test süresi kullanılacağından, Ana 11 peptidinin kanser hücre hatları MDA-MB-231 ve MCF-7'nin GI<sub>50</sub> konsantrasyonları ve bunun diğer çalışmalarda kullanılmış olan alt konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. MCF-10A hücre hattı için ise kanser hücre hatlarında etkisi araştırılan konsantrasyonların kullanılması uygun bulunmuştur.



Şekil 4.70. MDA-MB-231 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi grafikleri. a ve b) Uygulama verilmeyen kontrol grubuna ait ışık saçılım grafikleri ve debris dışındaki hücre grubunu temsil eden P1 ve P2 kapısı, c) kontrol grubu hücreleri içindeki tekli hücreleri temsil eden Singlets kapısı, d) kontrol, e) 1,5 µg/ml, f) 2 µg/ml, g) 2,5 µg/ml Ana 11 uygulanan hücrelerin PI floresan yoğunluğuna karşı sayı grafikleri.



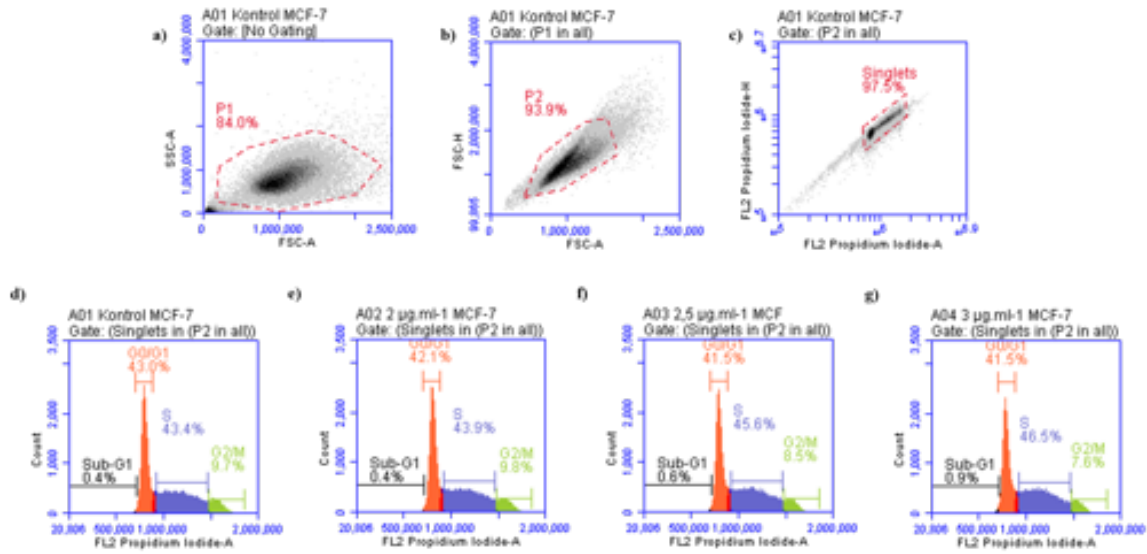
Şekil 4.71. MDA-MB-231 hücre hattının, artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra, akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerini gösteren bar grafiği.

Şekil 4.70. ve Şekil 4.71. incelendiğinde MDA-MB-231 hücre hattına artan konsantrasyonlarda Ana 11 peptidi uygulandığında Sub-G1 ve G0/G1 evresindeki hücre yoğunluğunda bir değişim gözlenmezken, S evresindeki hücre yoğunluğunda artış ve buna paralel olarak G2/M evresindeki hücre yoğunluğunda bir azalma gözlenmiştir. İki yönlü ANOVA analizi sonucu, uygulama gruplarındaki bu artış ve azalışların kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu da gösterilmiştir ( $p < 0,0001$ ). Çizelge 4.9.'da Şekil 4.71. oluşturulurken kullanılan değerler sayısal olarak özetlenmiştir.

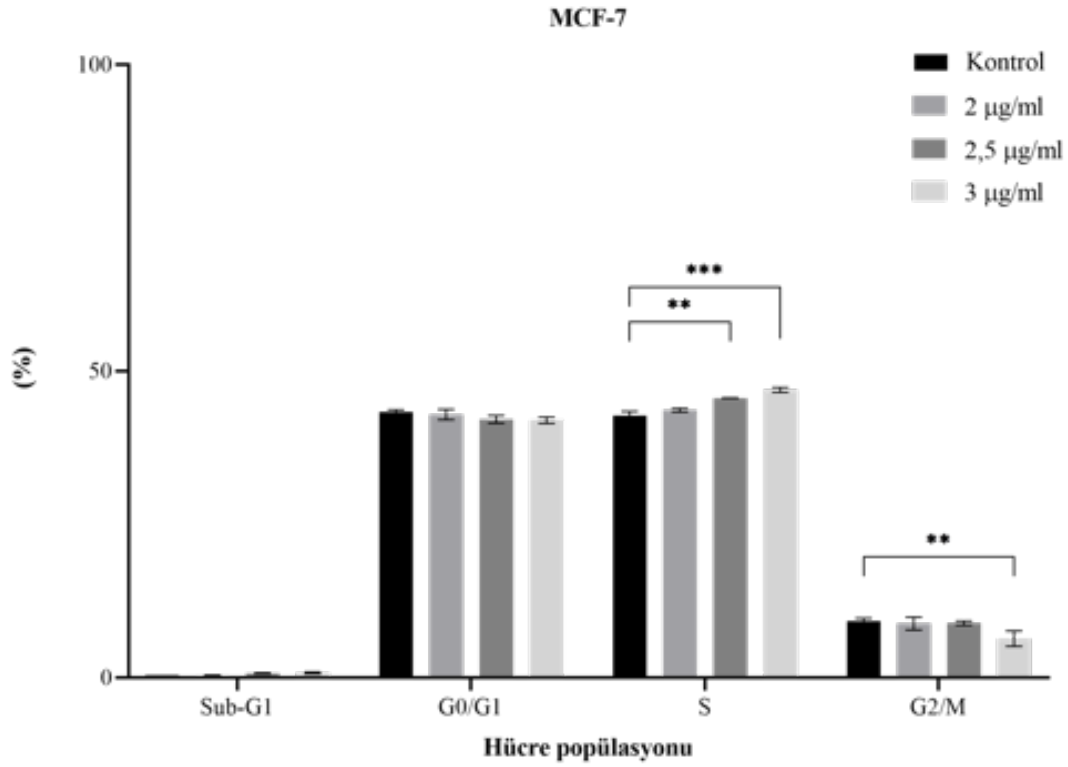
Çizelge 4.9. MDA-MB-231 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin Sub-G1, G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelерinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.

(%)	Kontrol			2 µg/ml			2,5 µg/ml			3 µg/ml		
	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n
Sub-G1	0,73	0,07	2	1,02	0,01	2	0,72	0,08	2	1,4	0,23	2
G0/G1	40,99	0,82	2	39,73	1,565	2	39,21	0,75	2	41,57	0,16	2
S	24,43	1,51	2	31,35	0,36	2	33,25	1,23	2	35,43	0,18	2
G2/M	34,06	0,47	2	28,47	1,06	2	27,09	0,385	2	22,5	0,57	2

DNA replikasyonunun gerçekleştiği S evresinde hücre yoğunluğunun artması ve buna paralel olarak mitotik bölünmenin gerçekleştiği G2/M evresindeki yoğunluğun azalması DNA replikasyonunda bir aksama veya gecikme olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.72. MCF-7 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi grafikleri. a ve b) Uygulama verilmeyen kontrol grubuna ait ışık saçılım grafikleri ve debris dışındaki hücre grubunu temsil eden P1 ve P2 kapısı, c) kontrol grubu hücreleri içindeki tekli hücreleri temsil eden Singlets kapısı, d) kontrol, e) 1,5 µg/ml, f) 2 µg/ml, g) 2,5 µg/ml Ana 11 uygulanan hücrelerin PI floresan yoğunluğuna karşı sayı grafikleri.



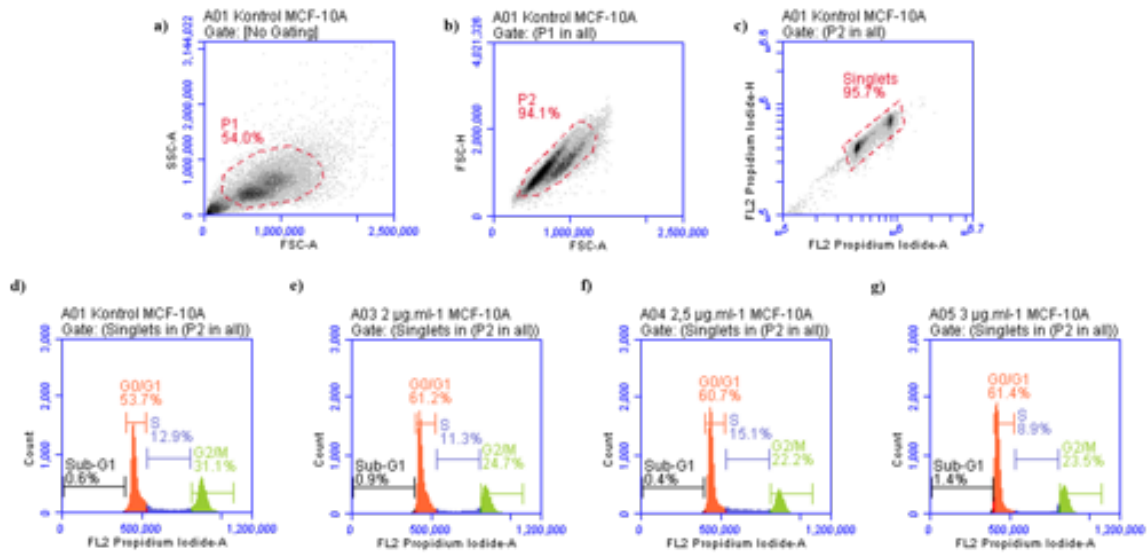
Şekil 4.73. MCF-7 hücre hattının, artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra, akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerini gösteren bar grafiği.

Şekil 4.72. ve Şekil 4.73. incelendiğinde MCF-7 hücre hattına artan konsantrasyonlarda Ana 11 peptidi uygulandığında Sub-G1 ve G0/G1 evresindeki hücre yoğunluğunda bir değişim gözlenmezken, S evresindeki hücre yoğunluğunda küçük bir artış ve buna paralel olarak G2/M evresindeki hücre yoğunluğunda bir azalma gözlenmiştir. İki yönlü ANOVA analizi sonucu, 2,5 µg/ml ve 3 µg/ml Ana 11 uygulanan gruplarda S evresindeki hücre yoğunluğunda kontrol grubuna göre gerçekleşen artış ve 3 µg/ml Ana 11 uygulanan grupta G2/M evresindeki hücre yoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla gerçekleşen azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (metindeki sırasıyla  $p=0,0070$ ,  $p= 0,0003$  ve  $p= 0,0070$ ). Çizelge 4.10.'da ise Şekil 4.72. oluşturulurken kullanılan değerler sayısal olarak özetlenmiştir.

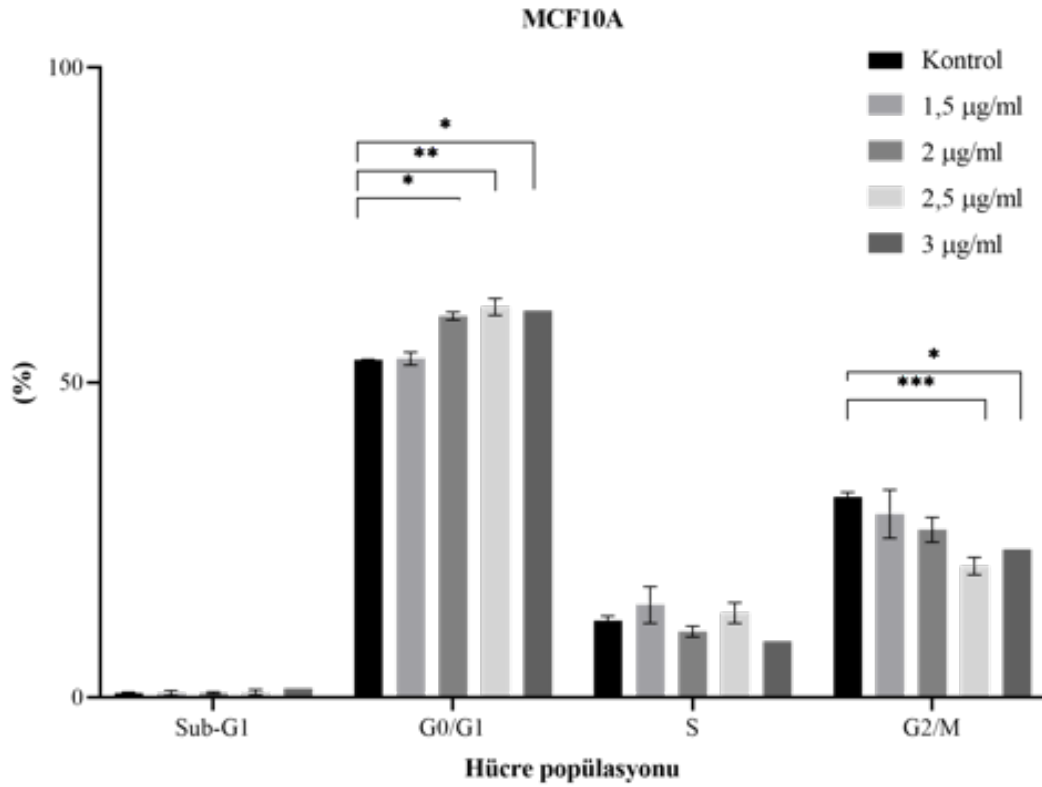
Çizelge 4.10. MCF-7 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin Sub-G1, G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelерinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.

(%)	Kontrol			2 µg/ml			2,5 µg/ml			3 µg/ml		
	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n
Sub-G1	0,415	0,01	2	0,27	0,13	2	0,7	0,1	2	0,79	0,13	2
G0/G1	43,35	0,34	2	42,93	0,85	2	42,12	0,60	2	41,98	0,50	2
S	42,75	0,66	2	43,63	0,30	2	45,60	0,02	2	46,92	0,38	2
G2/M	9,22	0,45	2	8,82	1,04	2	8,85	0,34	2	6,37	1,26	2

Aynı zamanda her iki kanser hücre hattında da kontrol gruplarına bakıldığında S evresinde bulunan hücrelerin oransal olarak fazla olması, buna kıyasla G0/G1 evresindeki yoğunluğun normal bir hücre döngüsüne kıyasla düşük olması hücrelerin analiz öncesi serumsuz ortamda bırakılarak senkronize edilmesinden ve kanser hücre hatları olması sebebiyle hızlı bölünmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. MCF-7 hücre hattındaki G2/M evresinde bulunan hücre yoğunluğunun MDA-MB-231'e göre daha düşük olmasının sebebi ise iki hücre hattının popülasyon ikilenme süreleri arasında 4 saat süre olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.74. MCF-10A hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi grafikleri. a ve b) Uygulama verilmeyen kontrol grubuna ait ışık saçılım grafikleri ve debris dışındaki hücre grubunu temsil eden P1 ve P2 kapısı, c) kontrol grubu hücreleri içindeki tekli hücreleri temsil eden Singlets kapısı, d) kontrol, e) 1,5 µg/ml, f) 2 µg/ml, g) 2,5 µg/ml Ana 11 uygulanan hücrelerin PI floresan yoğunluğuna karşı sayı grafikleri.



Şekil 4.75. MCF-10A hücre hattının, artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra, akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerinin ortalama ve standart hata grafiği.

Şekil 4.74. ve Şekil 4.75. incelendiğinde MCF-10A hücre hattına artan konsantrasyonlarda Ana 11 peptidi uygulandığında Sub-G1 ve S evresindeki hücre yoğunluğunda bir değişim gözlenmezken, G0/G1 evresindeki hücre yoğunluğunda bir artış ve buna paralel olarak G2/M evresindeki hücre yoğunluğunda bir azalma gözlenmiştir. İki yönlü ANOVA analizi sonucu, 2 µg/ml, 2,5 µg/ml ve 3 µg/ml Ana 11 uygulanan gruplarda G0/G1 evresindeki hücre yoğunluğunda kontrol grubuna göre gerçekleşen artış ve 2,5µg/ml ve 3 µg/ml Ana 11 uygulanan grupta G2/M evresindeki hücre yoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla gerçekleşen azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (metindeki sırasıyla  $p= 0,0172$ ,  $p= 0,0042$ ,  $p= 0,0302$  ve  $p= 0,0004$ ,  $p= 0,0199$ ). Çizelge 4.11.'de ise Şekil 4.75. oluşturulurken kullanılan değerler sayısal olarak özetlenmiştir.

Çizelge 4.11. MCF-10A hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonucu, hücrelerin Sub-G1, G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelерinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.

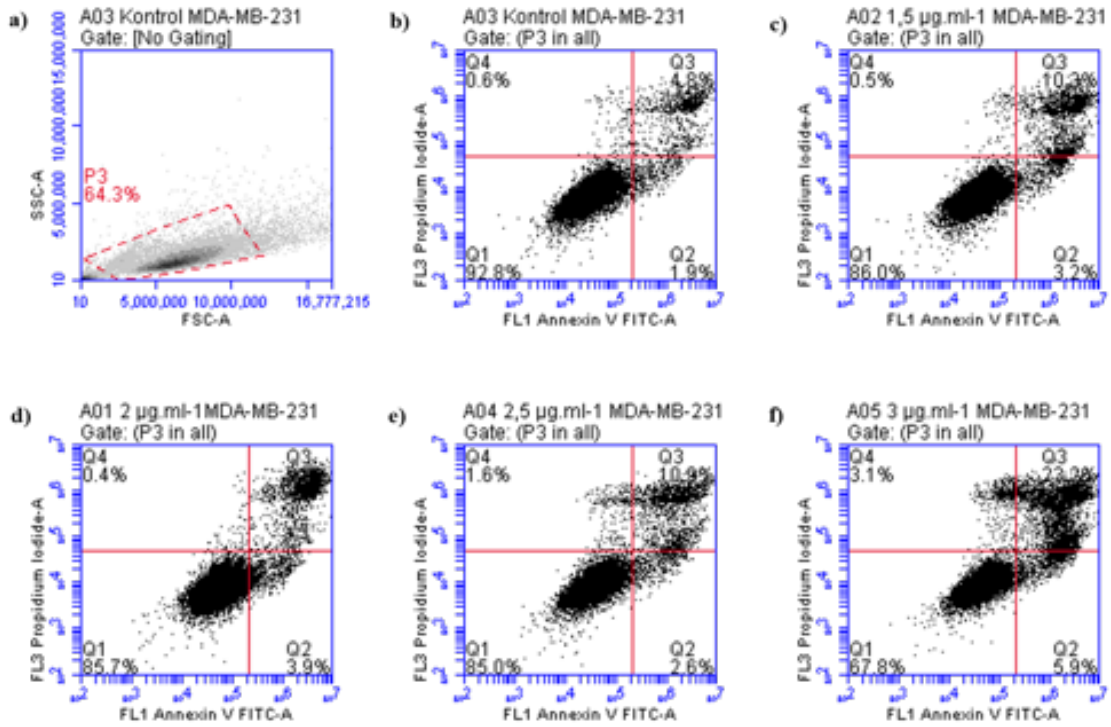
(%)	Kontrol			2 µg/ml			2,5 µg/ml			3 µg/ml		
	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n
Sub-G1	0,71	0,13	2	0,70	0,15	2	0,85	0,42	2	1,42	0	1
G0/G1	53,61	0,07	2	60,57	0,61	2	62,03	1,33	2	61,41	0,00	1
S	12,20	0,75	2	10,49	0,84	2	13,43	1,64	2	8,93	0,00	1
G2/M	31,86	0,72	2	26,64	1,97	2	20,86	1,37	2	23,51	0,00	1

Ana 11 peptidinin normal meme hücre hattı MCF-10A hücre döngüsü üzerindeki etkisinin kanser hücre hatlarından farklı olması dikkat çekmektedir. Bu sonuç, Ana 11 peptidinin kanser hücre hatlarına spesifik bir mekanizmayla etki ediyor olabileceği fikrini uyandırmaktadır.

#### 4.11.2. Ana 11 peptidinin hücre ölüm modu üzerine etkilerinin belirlenmesi

Annexin V/FITC ile boyama yöntemi bir popülasyon içindeki aktif olarak apoptoza yönelen hücrelerin kantitatif olarak ölçülmesini sağlamaktadır. Hücrelerin eş zamanlı olarak bir canlılık boyası olan PI ile de boyanması ile popülasyon içindeki canlı (AV/FITC-, PI-), erken apoptotik (AV/FITC+, PI-), geç apoptotik (AV/FITC+, PI+) ve nekrotik (AV/FITC-, PI+) alt hücre popülasyonlarının belirlenmesini sağlamaktadır.

Şekil 4.76. ve Şekil 4.77. incelendiğinde artan konsantrasyonlarda Ana 11 peptidi uygulaması sonucu MDA-MB-232 hücre popülasyonunun canlıdan apoptotik bir popülasyona doğru kaydığı görülmektedir. Kontrol grubundaki geç apoptotik alt-popülasyon oranı %5,78 iken, geç apoptotik hücre alt-popülasyonu oranlarının 24 saatlik 2 µg/ml, 2,5 µg/ml ve 3 µg/ml Ana 11 uygulaması sonunda sırasıyla %12,34, %13,25, %16,54 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12.). Buna bağlı olarak canlı hücre alt-popülasyonunda da azalma gözlenmiştir.

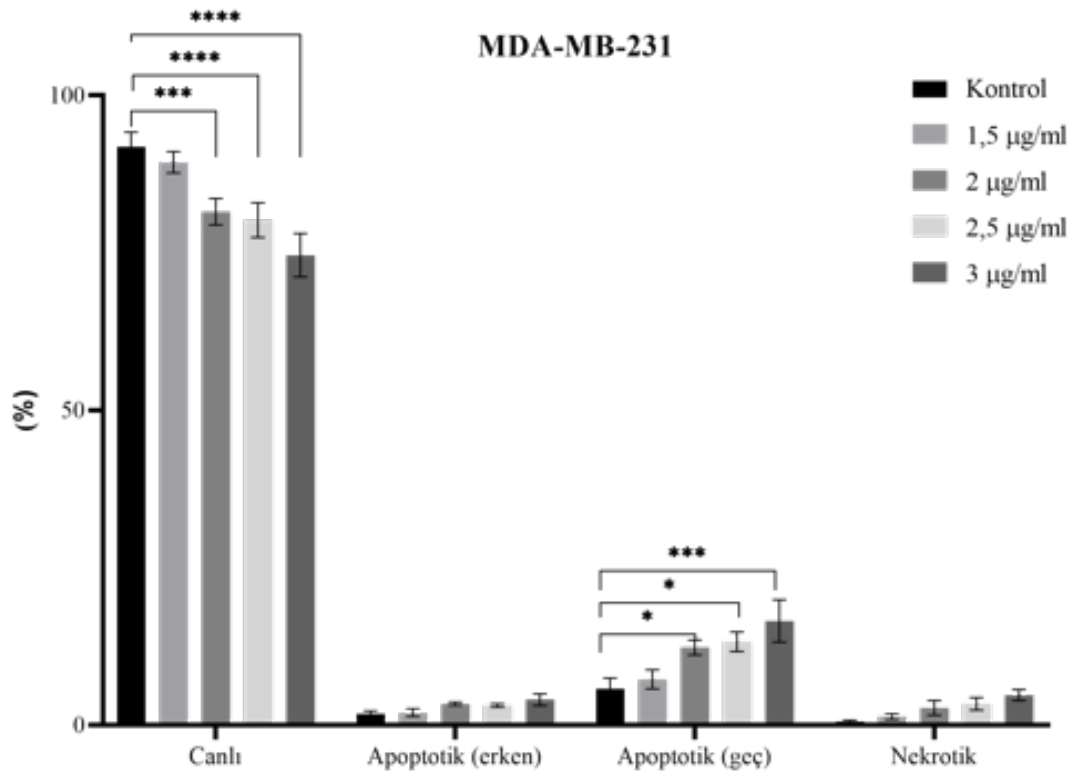


Şekil 4.76. MDA-MB-231 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen apoptoz analizi grafikleri. a) Uygulama verilmeyen kontrol grubuna ait ışık saçılım grafiği ve debris dışındaki hücre grubunu temsil eden P3 kapısı, b) kontrol, c) 1,5 µg/ml, d) 2 µg/ml, e) 2,5 µg/ml ve f) 3 µg/ml Ana 11 uygulanan hücrelerin AV/FITC – PI floresan yoğunluğu grafikleri. Kadranın etrafındaki alanlardan Q1: canlı, Q2: erken apoptotik, Q3: geç apoptotik, Q4: nekrotik hücreleri temsil etmektedir.

İki yönlü ANOVA analizi sonucu, 2 µg/ml, 2,5 µg/ml ve 3 µg/ml Ana 11 uygulanan gruplarda geç-apoptotik hücre alt-popülasyon oranında kontrol grubuna göre gerçekleşen artış ve 2µg/ml, 2,5µg/ml ve 3 µg/ml Ana 11 uygulanan gruplarda canlı hücre yoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla gerçekleşen azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (metindeki sırasıyla  $p = 0,0312$ ,  $p = 0,0118$ ,  $p = 0,0002$  ve  $p = 0,0004$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ).

Bu sonuçlar Ana 11 peptidinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde apoptotik bir etkisi olduğunu göstermektedir.

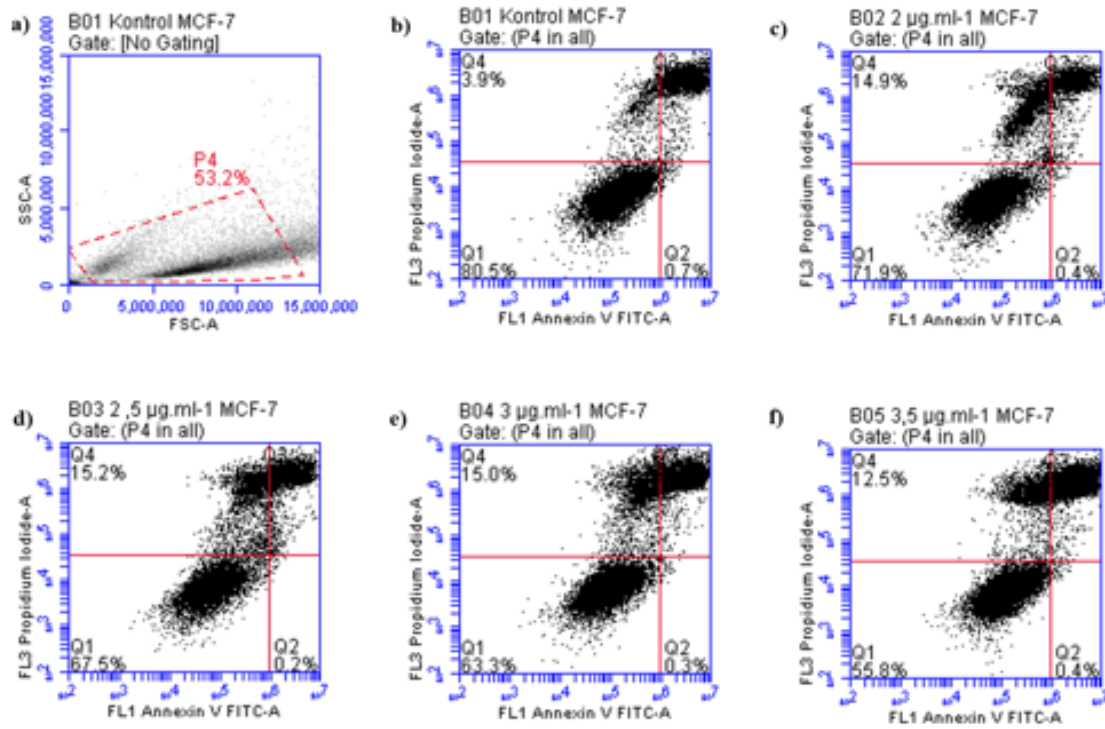




Şekil 4.77. MDA-MB-231 hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, populasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik bulunma yüzdelerinin bar grafiği.

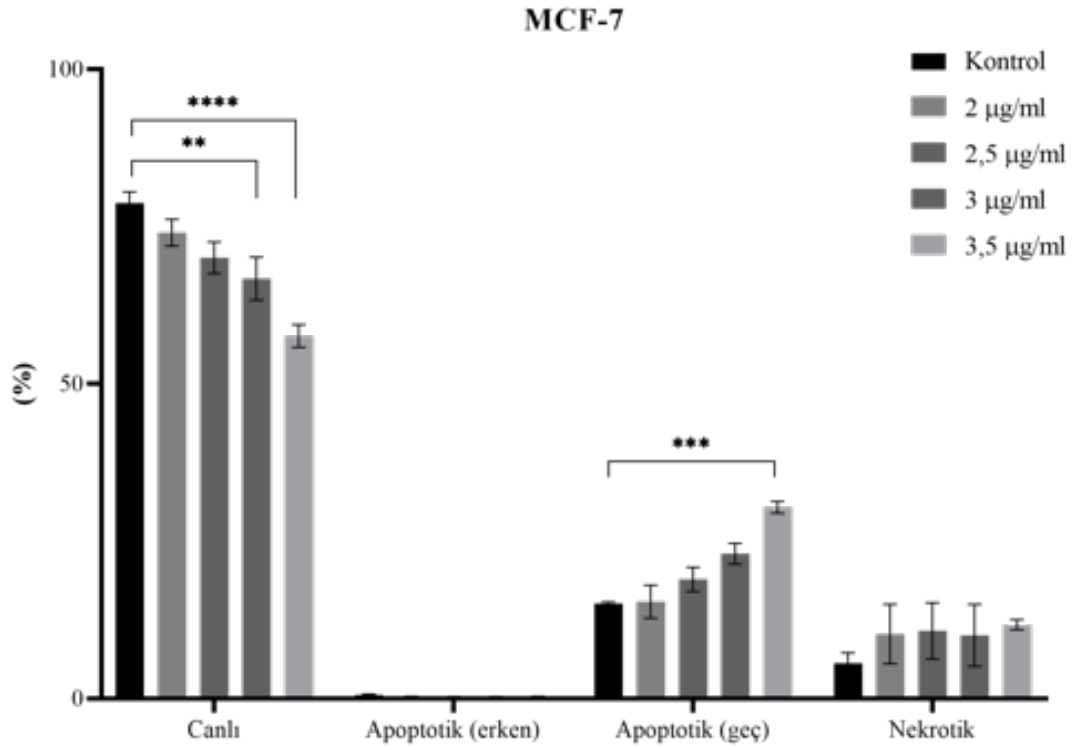
Çizelge 4.12. MDA-MB-231 hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, populasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik bulunma yüzdelerinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.

(%)	Kontrol			1,5 µg/ml			2 µg/ml			2,5 µg/ml			3 µg/ml		
	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n
Canlı	91,84	2,34	3	89,39	1,69	3	81,54	2,10	3	80,21	2,74	3	74,64	3,44	3
Apoptotik (erken)	1,79	0,47	3	1,98	0,60	3	3,38	0,27	3	3,13	0,27	3	4,04	0,95	3
Apoptotik (geç)	5,78	1,69	3	7,27	1,51	3	12,34	1,20	3	13,25	1,56	3	16,54	3,36	3
Nekrotik	0,59	0,21	3	1,35	0,43	3	2,74	1,17	3	3,40	0,99	3	4,78	0,86	3



Şekil 4.78. MCF-7 hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen apoptoz analizi grafikleri. a) Uygulama verilmeyen kontrol grubuna ait ışık saçılım grafiği ve debris dışındaki hücre grubunu temsil eden P4 kapısı, b) kontrol, c) 2 µg/ml, d) 2,5 µg/ml, e) 3 µg/ml ve f) 3,5 µg/ml Ana 11 uygulanan hücrelerin AV/FITC – PI floresan yoğunluğu grafikleri. Kadranın etrafındaki alanlardan Q1: canlı, Q2: erken apoptotik, Q3: geç apoptotik, Q4: nekrotik hücreleri temsil etmektedir.

Şekil 4.78. ve Şekil 4.79. incelendiğinde artan konsantrasyonlarda Ana 11 peptidi uygulaması sonucu MCF-7 hücre popülasyonunun canlıdan apoptotik bir popülasyona doğru kaydığı görülmektedir. Kontrol grubundaki geç apoptotik alt-popülasyon oranı %15,11 iken, geç apoptotik hücre alt-popülasyonu oranlarının doza bağlı olarak artış gösterdiği ve 24 saatlik 3,5 µg/ml Ana 11 uygulaması sonunda %30,38 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12.). Buna bağlı olarak canlı hücre alt-popülasyonunda da artan doza bağlı olarak azalma gözlenmiş, kontrol grubunda %78,74 olan canlı hücre alt-popülasyonu oranı 3µg/ml ve 3,5 µg/ml Ana 11 uygulama gruplarında sırasıyla %66,72 ve %57,61'e düşmüştür. Aynı zamanda gruplar arası fark anlamlı olmasa da nekrotik hücre popülasyonunda da artan doza bağlı olarak bir artış olduğu görülmektedir.



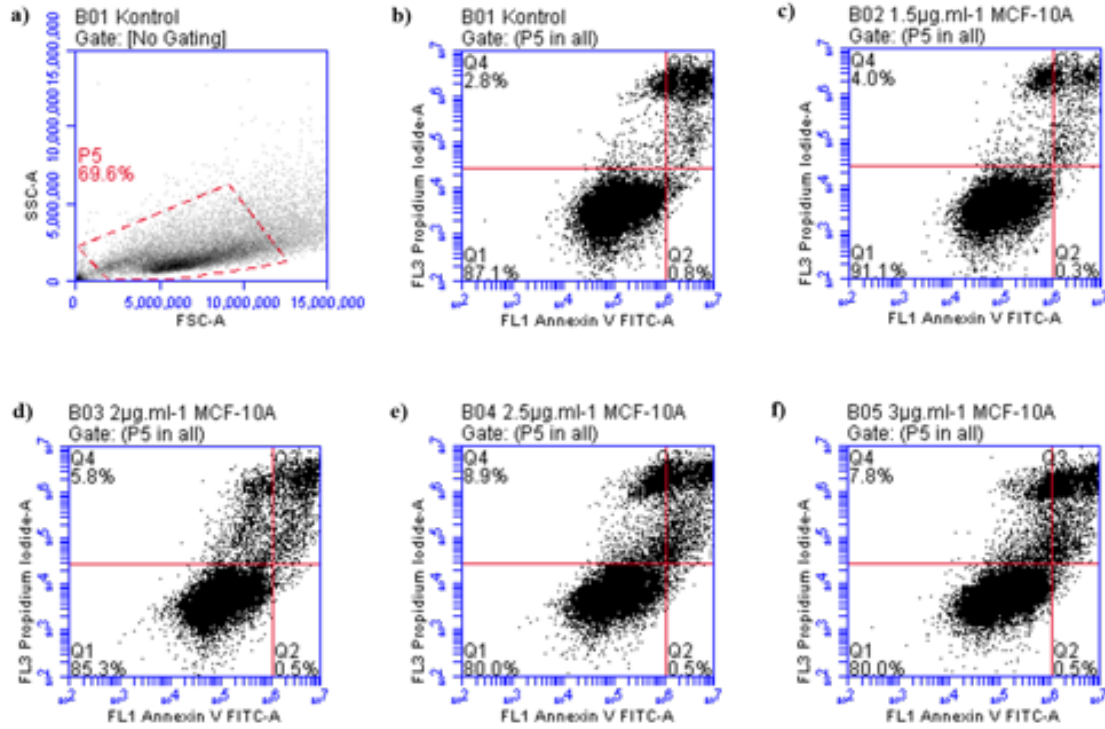
Şekil 4.79. MCF-7 hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, popülasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik bulunma yüzdelerinin bar grafiği.

İki yönlü ANOVA analizi sonucu, 3,5 µg/ml Ana 11 uygulanan gruplarda geç-apoptotik hücre alt-popülasyon oranında kontrol grubuna göre gerçekleşen artış ve 3 µg/ml ve 3,5 µg/ml Ana 11 uygulanan gruplarda canlı hücre yoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla gerçekleşen azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (metindeki sırasıyla  $p=0,0007$  ve  $p=0,0067$ ,  $p<0,0001$ ).

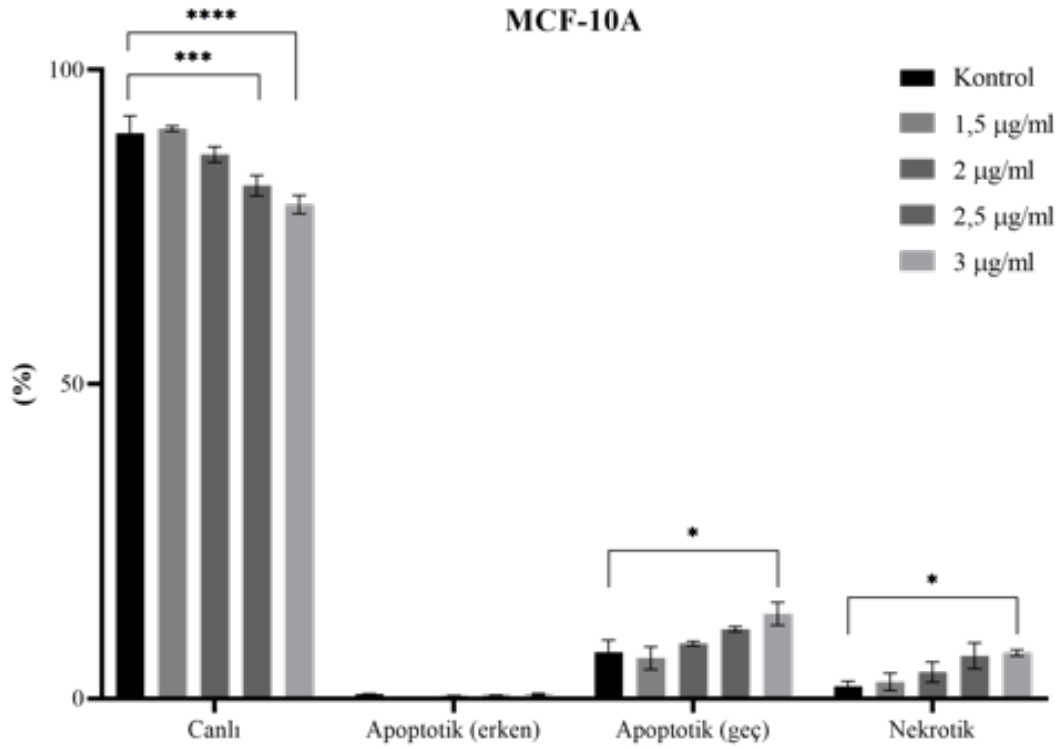
Bu sonuçlar Ana 11 peptidinin MCF-7 hücre hattı üzerinde apoptotik bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.13. MCF-7 hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, populasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik bulunma yüzdelerinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.

(%)	Kontrol			2 µg/ml			2,5 µg/ml			3 µg/ml			3,5 µg/ml		
	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n
Canlı	78,73	1,78	2	74,02	2,10	2	70,03	2,49	2	66,72	3,40	2	57,60	1,79	2
Apoptotik (erken)	0,56	0,13	2	0,34	0,02	2	0,26	0,05	2	0,21	0,11	2	0,29	0,09	2
Apoptotik (geç)	15,10	0,24	2	15,38	2,62	2	18,93	1,92	2	23,03	1,65	2	30,375	0,93	2
Nekrotik	5,59	1,67	2	10,24	4,71	2	10,76	4,47	2	10,03	4,93	2	11,725	0,76	2



Şekil 4.80. MCF-10A hücre hattının akış sitometrisi ile gerçekleştirilen apoptoz analizi grafikleri. a) Uygulama verilmeyen kontrol grubuna ait ışık saçılım grafiği ve debris dışındaki hücre grubunu temsil eden P5 kapısı, b) kontrol, c) 1,5 µg/ml, d) 2 µg/ml, e) 2,5 µg/ml ve f) 3 µg/ml Ana 11 uygulanan hücrelerin AV/FITC – PI floresan yoğunluğu grafikleri. Kadranın etrafındaki alanlardan Q1: canlı, Q2: erken apoptotik, Q3: geç apoptotik, Q4: nekrotik hücreleri temsil etmektedir.



Şekil 4.81. MCF-10A hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, popülasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik bulunma yüzdelerinin bar grafiği.

Şekil 4.80. ve Şekil 4.81. incelendiğinde artan konsantrasyonlarda Ana 11 peptidi uygulaması sonucu MCF-10A hücre popülasyonunun canlıdan apoptotik bir popülasyona doğru kaydığı görülmektedir. Kontrol grubundaki geç apoptotik alt-popülasyon oranı %7,38 iken, geç apoptotik hücre alt-popülasyonu oranlarının doza bağlı olarak artış gösterdiği ve 24 saatlik 3 µg/ml Ana 11 uygulaması sonunda %13,47 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.13.). Aynı zamanda kontrol grubunda %1,97 olan nekrotik hücre alt-popülasyonu oranlarının doza bağlı olarak artış gösterdiği ve 24 saatlik 3 µg/ml Ana 11 uygulaması sonunda %7,30 olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak canlı hücre alt-popülasyonunda da artan doza bağlı olarak azalma gözlenmiş, kontrol grubunda %89,93 olan canlı hücre alt-popülasyonu oranı 2,5 µg/ml ve 3 µg/ml Ana 11 uygulama gruplarında sırasıyla %81,59 ve %78,57'ye düşmüştür.

Çizelge 4.14. MCF-10A hücre hattının artan dozlarda Ana 11 peptidi uygulandıktan sonra akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre ölüm modu analizi sonucu, populasyondaki hücrelerin canlı, erken apoptotik, geç apoptotik bulunma yüzdelerinin ortalama, standart hata ve tekrar sayısı (n) tablosu.

(%)	Kontrol			1,5 µg/ml			2 µg/ml			2,5 µg/ml			3 µg/ml		
	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n	Ortalama	Standart Hata	n
Canlı	89,92	2,78	2	90,65	0,41	2	86,56	1,22	2	81,58	1,63	2	78,57	1,47	2
Apoptotik (erken)	0,72	0,07	2	0,24	0,01	2	0,47	0,01	2	0,56	0,01	2	0,67	0,14	2
Apoptotik (geç)	7,38	1,92	2	6,44	1,80	2	8,76	0,37	2	11,03	0,40	2	13,47	1,82	2
Nekrotik	1,97	0,79	2	2,66	1,38	2	4,21	1,60	2	6,81	2,05	2	7,29	0,48	2

İki yönlü ANOVA analizi sonucu, 3 µg/ml Ana 11 uygulanan gruplarda geç-apoptotik ve nekrotik hücre alt-popülasyon oranlarında kontrol grubuna göre gerçekleşen artış ve 2,5 µg/ml ve 3 µg/ml Ana 11 uygulanan gruplarda canlı hücre yoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla gerçekleşen azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (metindeki sırasıyla p= 0,0128, p= 0,0315 ve p= 0,0008, p<0,0001).

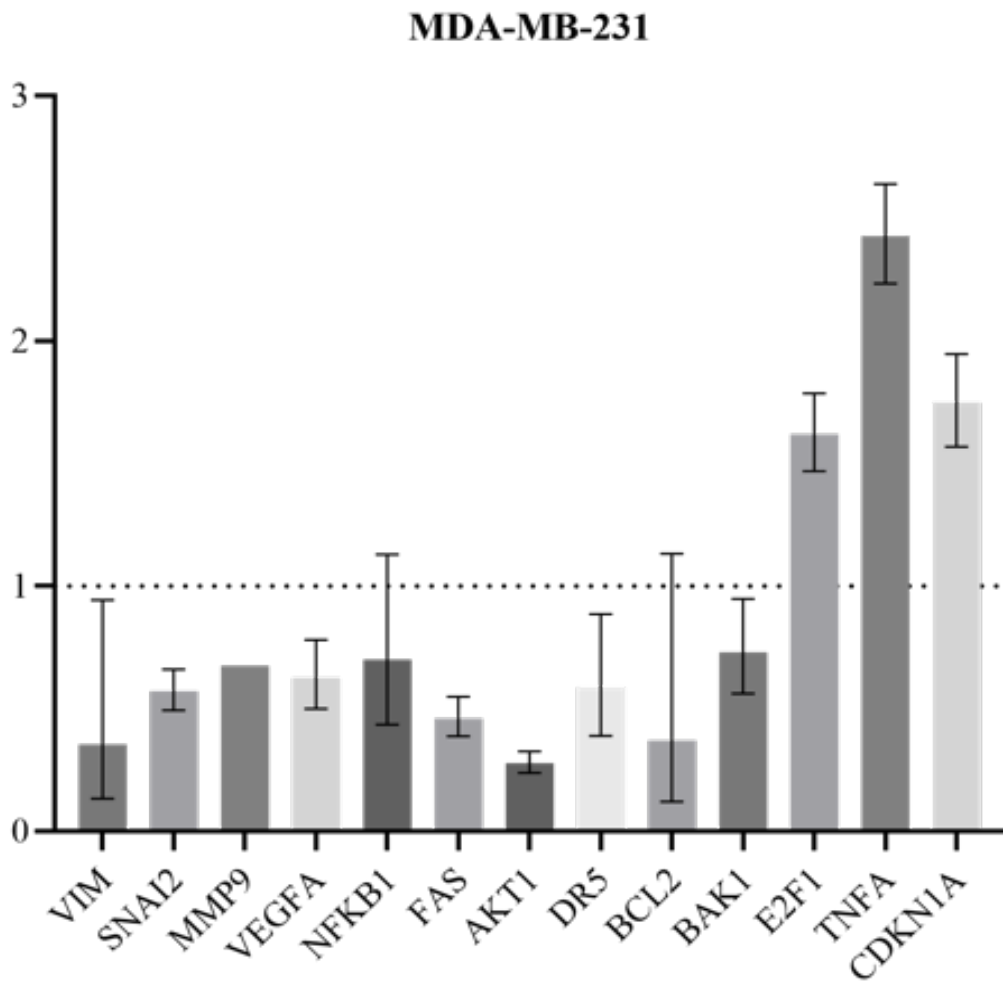
Bu sonuçlar Ana 11 peptidinin MCF-10A hücre hattı üzerinde apoptotik bir etkisi olduğunu göstermektedir.

#### 4.12. Fonksiyonel Aktivitenin Transkripsiyon Seviyesinde Analizi

Çalışmanın bu aşamasında epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) (VIM, SNAI1), invazyon ve metastaz (MMP9, VEGFA), ekstrinsik apoptoz (NFKB1, FAS, AKT1, DR5), intrinsik apoptoz (BCL2, BAK1), hücre döngüsü (CDKN1A, E2F1) ve inflamasyon (TNFα) yollarında rol alan 13 adet genin beta aktin geni ekspresyonuna kıyasla transkripsiyonel olarak ekspresyonu analiz edilmiştir. Böylece Ana 11 peptidinin bundan önceki aşamalarda gösterilen fonksiyonel etkilerinin moleküler mekanizmalarının transkripsiyonel seviyede araştırılması amaçlanmıştır.

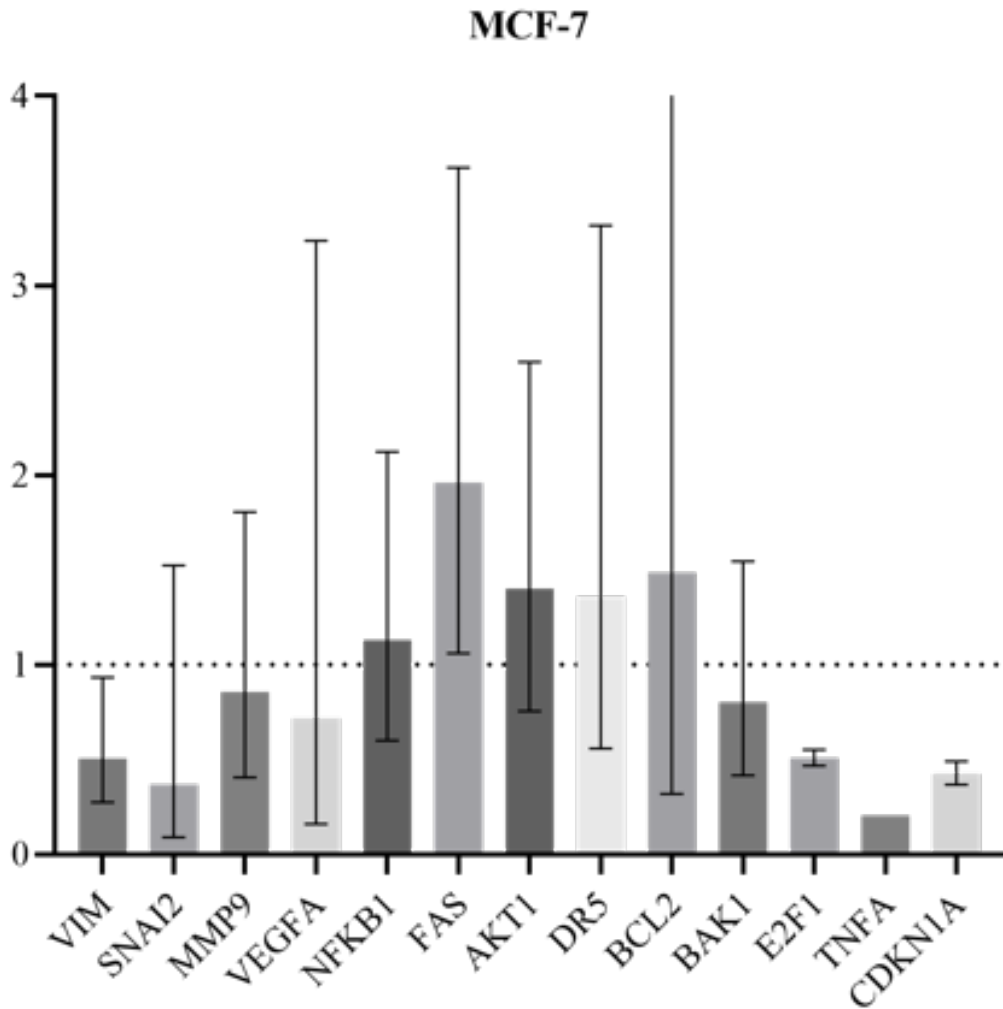
MDA-MB-231 hücre hattı için elde edilen sonuçlar Şekil 4.82.'de özetlenmiştir. Buna göre, EMT, invazyon ve metastazla ilişkili genlerin ekspresyonu Ana 11 uygulaması etkisiyle azalmıştır. Bu sonuç ilerde detaylı olarak tartışılacağı üzere motilite ve invazyon testlerinin sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Apoptozla ilişkili genlerden DR5, BCL2, BAK1 ekspresyon analizi sonucu verilerinde grafikte de özetlenen standart sapma

değerlerinin çok yüksek olması sebebiyle kesin bir yorum yapılamamaktadır. Apoptozla ilişkili genlerden FAS ve AKT1 ekspresyonunda ise azalma olduğu görülmektedir. AKT1 ekspresyonundaki bu azalma hücre ölüm modu analizi bulgularını desteklemektedir. Hücre döngüsü genlerinden CDKN1A ve E2F1 ekspresyon seviyelerindeki artış hücre döngüsü analizindeki S evresindeki popülasyon birikimini açıklamaktadır. Aynı zamanda hem hücre sağ kalımı hem de apoptozu için iki yönlü olarak görev yapabilen, aynı zamanda inflamasyon yollarında rolü olan TNFA ekspresyonunun ise arttığı görülmektedir.



Şekil 4.82. MDA-MB-231 hücre hattına 2,5 µg/ml Ana 11 peptidi uygulanmış deney grubunda araştırılan genler için ekspresyon seviyesini gösteren bar grafiği. (Uygulama verilmeyen kontrol grubunun ilgili genler için ekspresyonu, y ekseninde 1 ile belirtilmiş ve grafik üzerinde kesikli çizgi ile gösterilmiştir.) Sonuçlar  $\Delta\Delta CT$  yöntemi ile beta aktin geni referans alınarak elde edilmiş olup, kat-değişimi olarak ifade edilmiştir.

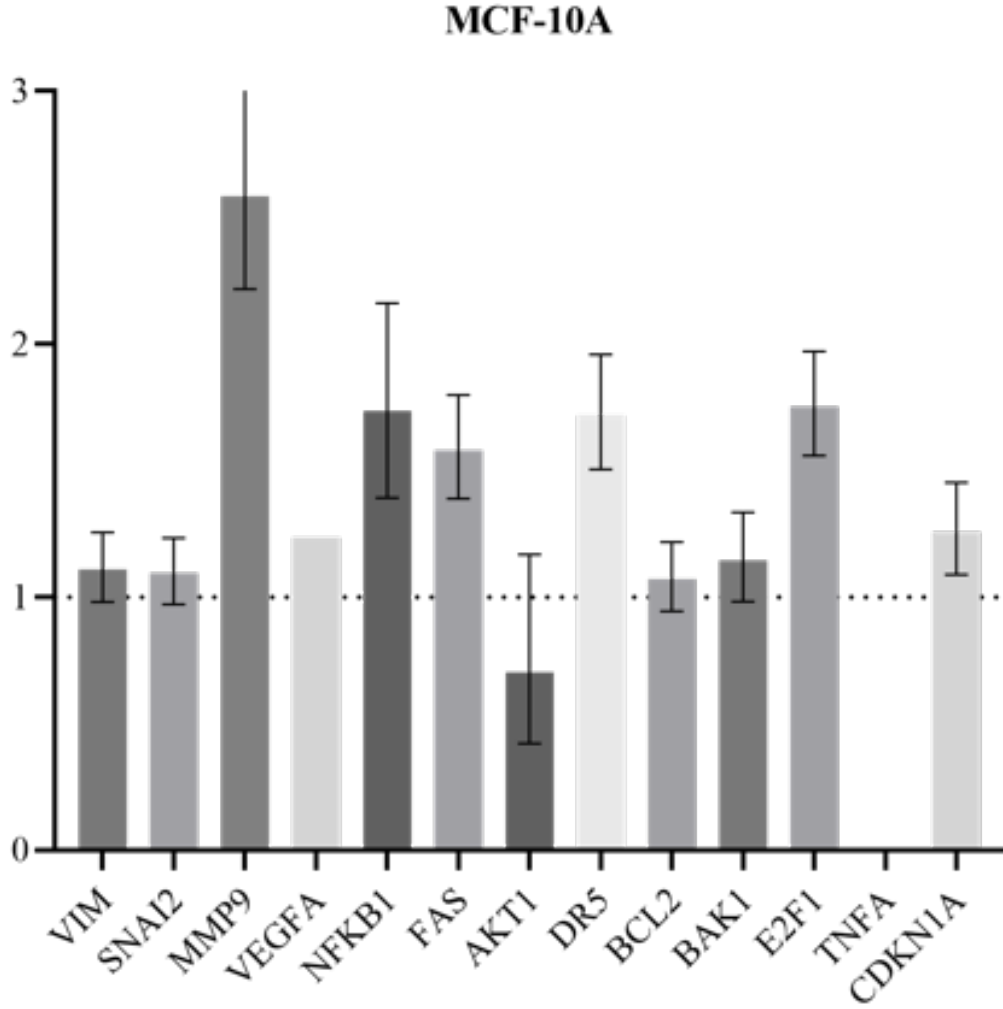
MCF-7 hücre hattı için elde edilen sonuçlar Şekil 4.83.'de özetlenmiştir. Grafikte özetlendiği şekilde belirlenen gen ekspresyon seviyeleri için hesaplanan standart sapma değerleri oldukça yüksektir. Bu sebeple değerlendirilmesi doğru bulunmamıştır. Sadece FAS ekspresyonu için elde edilen veri incelendiğinde standart sapma alt sınırının 1'in üzerinde olduğu, bunun da gen ekspresyonunun artması olarak yorumlanabileceği düşünülmektedir. E2F1, CDKN1A ve TNFA gen ekspresyon seviyelerinde ise bir azalma belirlenmiştir.



Şekil 4.83. MCF-7 hücre hattına 3 µg/ml Ana 11 peptidi uygulanmış deney grubunda araştırılan genler için ekspresyon seviyesini gösteren bar grafiği. (Uygulama verilmeyen kontrol grubunun ilgili genler için ekspresyonu, y ekseninde 1 ile belirtilmiş ve grafik üzerinde kesikli çizgi ile



*gösterilmiştir.*) Sonuçlar  $\Delta\Delta CT$  yöntemi ile beta aktin geni referans alınarak elde edilmiş olup, kat-değişimi olarak ifade edilmiştir.



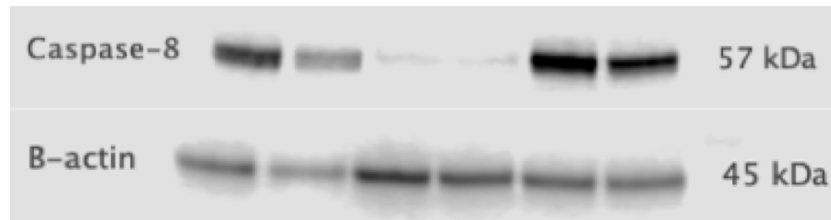
Şekil 4.84. MCF-10A hücre hattına 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Ana 11 peptidi uygulanmış deney grubunda araştırılan genler için ekspresyon seviyesini gösteren bar grafiği. (Uygulama verilmeyen kontrol grubunun ilgili genler için ekspresyonu, y ekseninde 1 ile belirtilmiş ve grafik üzerinde kesikli çizgi ile gösterilmiştir.) Sonuçlar  $\Delta\Delta CT$  yöntemi ile beta aktin geni referans alınarak elde edilmiş olup, kat-değişimi olarak ifade edilmiştir.

MCF-10A hücre hattı için elde edilen sonuçlar Şekil 4.84.'de özetlenmiştir. EMT genleri ekspresyon seviyelerinde bir değişim görülmemektedir. Aynı şekilde intrinsik apoptoz yolağı ile ilişkili BCL2 ve BAK1 ve CDKN1A gen ekspresyon seviyelerinde de bir değişim görülmemektedir. İlginç olarak Ana 11 uygulaması ile birlikte invazyon ve

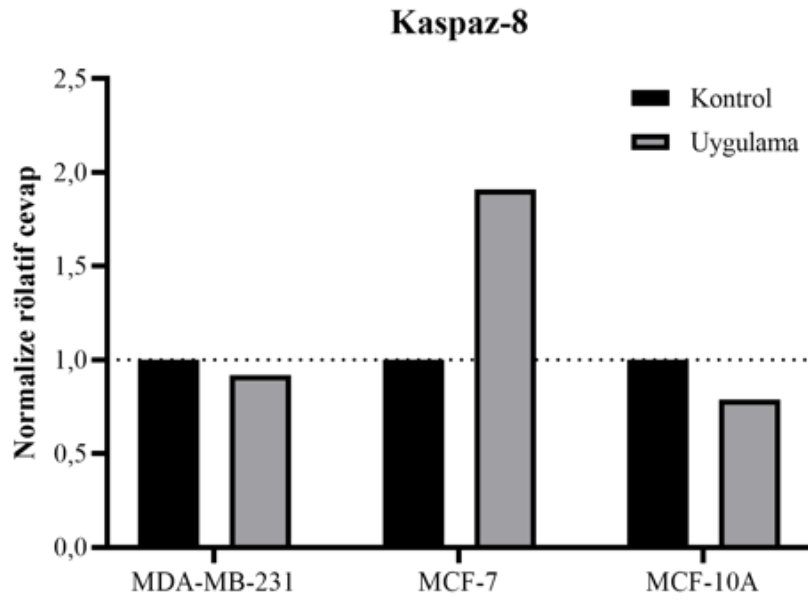
metastazla ilişkili genlerden MMP9 ve NFKB1 ekspresyon seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir. Ancak aynı zamanda FAS, DR5 ekspresyonunda artış ve AKT1 ekspresyonunda azalma ekstrinsik apoptoz yolağının çalıştığı yönünde bir fikir vermektedir. E2F1 ekspresyonundaki artış ise hücre döngüsü analizi bulguları ile uyumludur. TNFA ekspresyonu ise baskılanmıştır.

#### 4.13. Fonksiyonel Aktivitenin Translasyon Seviyesinde Analizi

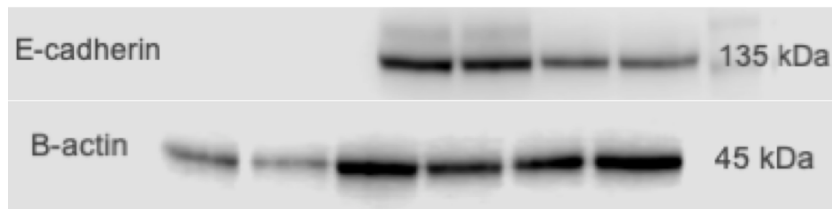
Tez çalışmasının bu aşamasında ekspresyon seviyeleri araştırılan genlerin rol aldığı yollarda efektör olarak rol alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Ana 11 peptidinin hücre hatları üzerindeki fonksiyonel etkilerinin, moleküler seviyede aydınlatılması amacıyla, her biri farklı bir moleküler yolda rol alan 9 adet efektör proteinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler western blot analizi ile araştırılmıştır (Bkz. Çizelge 3.2.). Çalışma kaynaklarının sınırlı olması sebebiyle her bir protein için sadece bir tekrar gerçekleştirilebilmiştir. Aşağıdaki şekillerde sonuçları verilen dört protein dışında kalan beş proteinin (Sitokrom c, TRAIL, FASL, VEGFR2, Siklin A2) ekspresyonu tespit edilememiştir. Ancak çalışılan tüm membranlar striplenerek hepsinde B-actin housekeeping proteininin ekspresyonu gösterilmiştir.



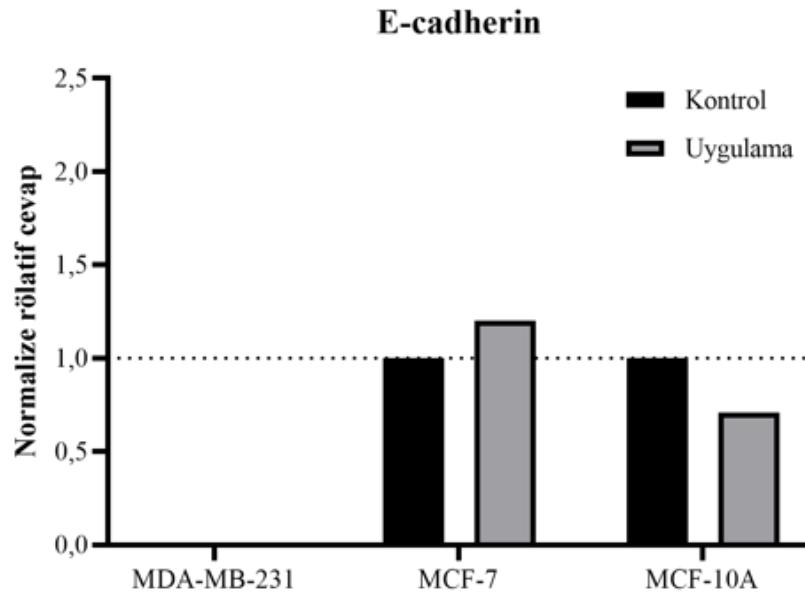
Şekil 4.85. Sırasıyla; MDA-MB-231 kontrol, MDA-MB-231 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-7 kontrol, MCF-7 3 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-10A kontrol, MCF-10A 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması sonrası caspase 8 (üstte) ve aynı membranda B-aktin (altta) ekspresyonu.



Şekil 4.86. Her bir hücre hattı için Kaspaz-8 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş rölâtif ekspresyon seviyelerini gösteren grafik. (Şekil 4.85'deki bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır.)



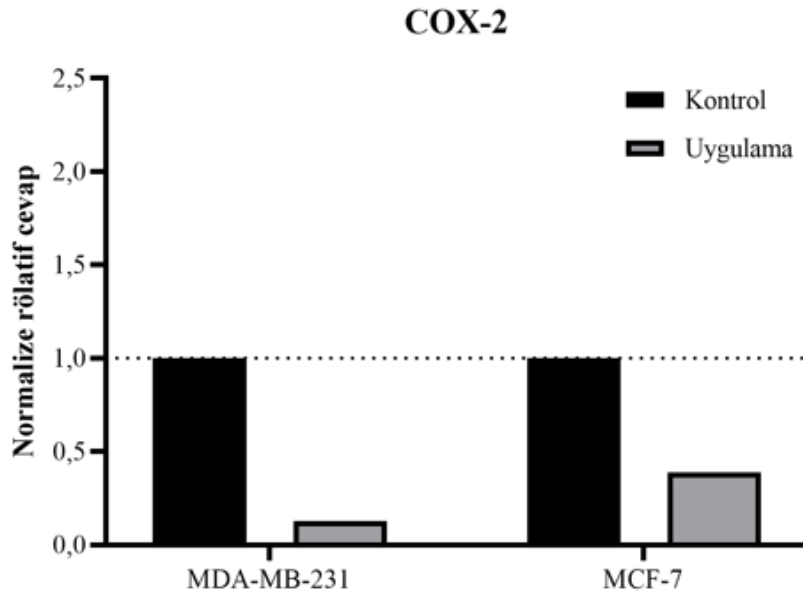
Şekil 4.87. Sırasıyla; MDA-MB-231 kontrol, MDA-MB-231 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-7 kontrol, MCF-7 3 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-10A kontrol, MCF-10A 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması sonrası E-cadherin (üstte) ve aynı membranda B-aktin (altta) ekspresyonu.



Şekil 4.88. Her bir hücre hattı için E-cadherin proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş rölatif ekspresyon seviyelerini gösteren grafik. (Şekil 4.87'deki bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır.)



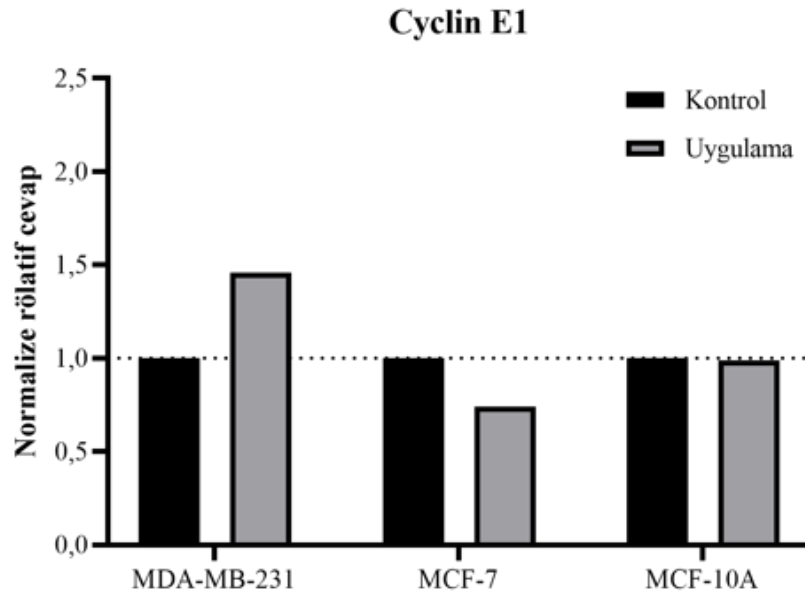
Şekil 4.89. Sırasıyla; marker bant, MDA-MB-231 kontrol, MDA-MB-231 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması, marker bant, MCF-7 kontrol, MCF-7 3 µg/ml Ana 11 uygulaması sonrası Cox2 (üstte) ve aynı membranlarda B-aktin (altta) ekspresyonu.



Şekil 4.90. Her bir hücre hattı için Cox2 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş rölâtif ekspresyon seviyelerini gösteren grafik. (Şekil 4.89'daki bant sinyali yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır.)



Şekil 4.91. Sırasıyla; MDA-MB-231 kontrol, MDA-MB-231 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-7 kontrol, MCF-7 3 µg/ml Ana 11 uygulaması, MCF-10A kontrol, MCF-10A 2,5 µg/ml Ana 11 uygulaması sonrası Cyclin E1 (üstte) ve aynı membranda B-actin (altta) ekspresyonu.



Şekil 4.92. Her bir hücre hattı için Siklin E1 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş rölative ekspresyon seviyelerini gösteren grafik. (Şekil 4.91.'deki bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır.)

Şekil 4.85. ile Şekil 4.92. arasındaki grafiklerle özetlenen veriler incelendiğinde, MCF-7 hücre hattında apoptotik yolda yer alan Caspase-8 ekspresyonunun arttığı belirlenmiş olup, diğer iki hücre hattında belirgin bir etki görülmemektedir. E-cadherin gen promotorunun hipermetilasyonu sebebiyle MDA-MB-231 hücrelerinde ekspresyon olmamaktadır. Bu sebeple bir ekspresyon gözlenmemiştir. MCF-10A hücre hattında ise gen ekspresyon bulguları ile uyumlu olarak E-Cadherin ekspresyonunun bir miktar arttığı görülmektedir. Cyclin E1 hücre döngüsünde G0/G1 fazından S fazına geçişi regüle eden bir proteindir. Hücre döngüsü sonuçlarıyla da uyumlu olarak MDA-MB-231 hücre hattında bu proteinin ekspresyonu artmıştır. Hücrenin G0/G1 fazından S fazına geçişi her ne kadar kötü prognozla ilişkili gibi düşünülse de hücre döngüsü analizi sonuçlarına göre Ana 11 peptidinin, hücre döngüsünü S evresinde sekteye uğrattığı görülmektedir. Her iki kanser hücre hattında da Cox2 ekspresyonu belirgin ölçüde azalmıştır. Apoptotik direnci, proliferasyonu, inflamasyonu, invazyon ve metastazı artıran bu proteinin ekspresyonunun önemli ölçüde azalması hücre ölüm modu analizi sonuçlarıyla uyumlu olup Ana 11 peptidinin anti-kanser etkisini göstermektedir.

#### 4.14. Elde Edilen Fonksiyonel Aktivite Bulgularının Transkripsiyon ve Translasyon Seviyesindeki Analiz Bulguları ile Birlikte Değerlendirilmesi

Malign hücrelerin metastatik yayılımı, bugün hala kanser sebebiyle ölümlerin %90'dan fazlasını oluşturmaktadır (Lambert, vd., 2017). Metastaz, kanser biyolojisinin en gizemli özelliklerinden biridir. İnvazyon-metastaz kaskadı olarak adlandırılan, karmaşık, sıralı ve birbiriyle ilişkili bir süreç sonucunda primer bölgeden uzakta ikincil tümörlerin oluşumuna yol açmaktadır (Talmadge ve Fidler, 2010).

Şekil 4.65. ve Şekil 4.69. birlikte değerlendirildiğinde Ana 11 peptidinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde migrasyonu ve invazyonu inhibe edici bir etkisinin bulunduğu açıkça görülmektedir. Literatürde arı venomunun ve majör toksik bileşeni melittinin çeşitli hücre hatlarının migrasyonu ve invazyonunu inhibe ettiğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır (Liu, vd., 2008; Cho vd., 2010; Huh, vd., 2010; Park vd., 2010; Jeong, vd., 2012; Jeong, vd., 2014; Wang vd., 2017; Lim vd., 2019; Sangboonruang vd., 2020). Bu çalışmalar ile hem hepatoselüler karsinom hücre hatlarında hem de in vivo fare modellerinde melittinin Rac-1'i inhibe ederek JNK aracılı hücre migrasyon ve invazyonunu engellediği (Wang, vd., 2017), renal, servikal ve meme kanser hücre hatlarında NF-kB ekspresyonunu bloke ederek MMP-9 ekspresyonunu inhibe ettiği (Park, vd., 2010), arı venomunun MCF-7 hücre hattında p38/JNK fosforilasyonunu baskılayarak NF-kB aktivitesini baskıladığı ve böylece MMP-9 ekspresyonunu inhibe ettiği (Cho, vd., 2010), melittinin aort düz kas hücre hattında NF-kB aktivasyonunu bloke ederek MMP-9 transkripsiyonunu inhibe ettiği (Jeong, vd., 2012), MCF-7 hücre hattında MMP-9 transkripsiyonunu inhibe ettiği (Wang, vd., 2017) gösterilmiştir. Hem arı venomu hem de melittinin etkisinin araştırıldığı birinde farklı melanoma hücre hatları, diğerinde MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları ile gerçekleştirilen çalışmalar ile PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı ve NF-kB inhibisyonu ile MMP-9 transkripsiyonunun azalması sonucu migrasyon ve invazyon üzerinde inhibitör etkisi bulunduğu gösterilmiştir (Jeong, vd., 2014; Lim, vd., 2019). Aynı zamanda arı venomunun gözlenen migrasyon ve invazyon inhibe edici etkisinin bileşimindeki diğer bir majör peptid apaminden değil melittinden kaynaklandığı da ortaya konulmuştur (Jeong, vd., 2014). Tez çalışması kapsamında migrasyon ve invazyon üzerindeki etkinin transkripsiyonel seviyede araştırılması için belirlenen MMP-9, VEGFA, NF-kB genlerinin ekspresyon seviyelerinin

kontrol grubuna kıyasla azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.82.). Gen seviyelerindeki bu azalma literatür ile birebir uyumlu görünmektedir.

Epitel hücreler onkojenik transformasyon sırasında hareketlilik özelliği kazanmadan önce epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) adı verilen bir süreç geçirerek epitelyal polaritelerini ve hücre-hücre bağlantılarını kaybetmektedirler (Kokkinos vd., 2007). Vimentin ise EMT yeniden programlanma sürecinin kanonik bir belirteçidir ve hareketli ve invazif tümör hücre fenotipinin kazanılması ile ilişkilidir. Artmış vimentin ekspresyon seviyeleri pek çok tümörde bulunmakta ve agresiflik ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte vimentin ekspresyonuna SNAI1 geni artan ekspresyon seviyeleri eşlik etmektedir. (Satelli ve Li, 2011). Kanser kaynaklı ölümlerin büyük bir çoğunluğundan doğrudan veya dolaylı olarak metastaz sorumlu olduğundan, etkili bir anti-metastatik tedavi geliştirmek yeni ve güncel bir hedef olarak öne çıkmaktadır (Strouhalova vd., 2020). Vimentinin EMT içindeki önemli yeri onu bu amaçla ilgi çekici bir ilaç hedefi yapmaktadır. Bu sebeple tez çalışması kapsamında VIM ve SNAI1 genlerinin ekspresyon seviyeleri de araştırılmıştır. Ana 11 peptidinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde gösterilen hücre hareketliliği ve invazyon üzerindeki inhibitör etkisi ile ilişkili olarak VIM ve SNAI1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.82.).

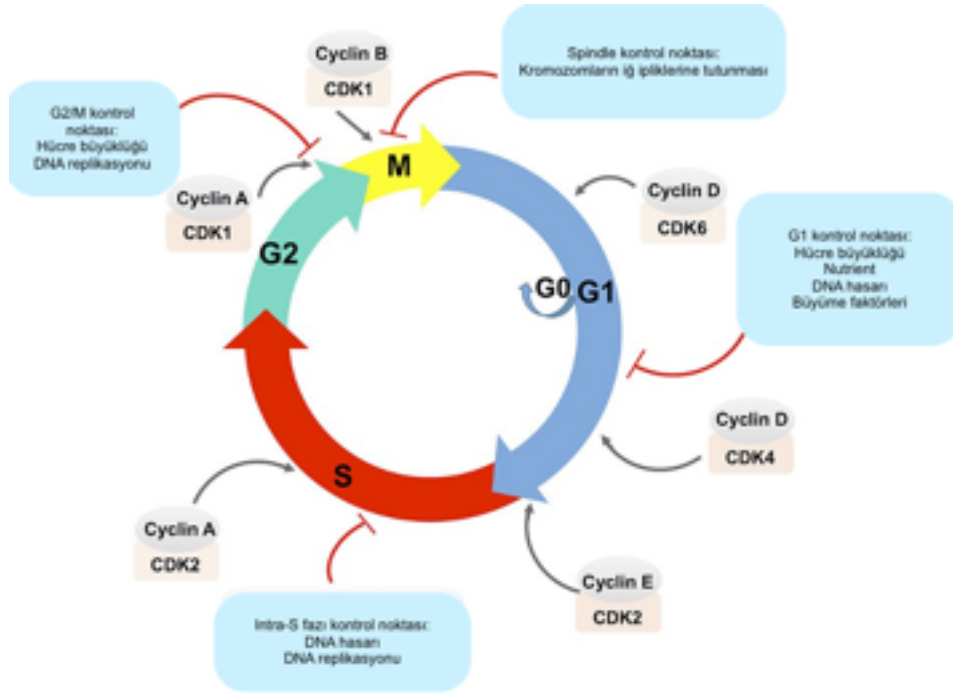
Epitelyal mezenkimal fenotipe geçişin translasyonel seviyede de araştırılması amacıyla E-cadherin proteininin ekspresyon seviyesinin araştırılması amaçlanmıştır. MDA-MB-231 hücre hattında gen promotörünün metilasyonu sebebiyle E-cadherin ekspresyonunun baskılandığı bilinmektedir. Bunun yanında meme karsinom hücre hatları ile gerçekleştirilen bir çalışmada sekonder metastatik bölgeye göç eden hücrelerde mezenkimal fenotipten epitelyal fenotipe geçiş ve E-cadherin yeniden ekspresyonu gösterilmiştir (Chao vd., 2010). Ancak Ana 11 peptid uygulaması böyle bir etki oluşturmadığından tez çalışması kapsamında E-cadherin'in protein seviyesinde ekspresyonu MDA-MB-231 hücre hattında gösterilememiştir (Şekil 4.88.).



Hücre döngüsü, hücrelerin geliştiği ve bölüdüğü bir süreç olup normal bir hücrenin büyüdüğü, DNA'sını çoğalttığı ve bölüdüğü bir dizi sinyal yolları tarafından düzenlenmektedir. Bu süreç aynı zamanda hataların düzeltilmesini sağlayan mekanizmaları da içermekte ve düzeltilmezse hücrelerin apoptoza girmesi sağlanmaktadır. Ancak, kanserde bu düzenleyici süreç arızalı olduğu için kontrolsüz hücre proliferasyonu ve nihayetinde tümörün büyümesi ve ilerlemesi ile sonuçlanmaktadır.

Hücre döngüsü; hücre büyümesi ile karakterize G1 evresi, DNA replikasyonu ile karakterize S evresi, hücrenin bölünme için hazırlandığı G2 evresi ve hücrenin iki hücreye bölüdüğü mitoz evresinden oluşmaktadır. Aynı zamanda hücreler döngüden ayrılıp aktif olmayan bir evre olan G0 evresine girebilmektedirler. Hücre döngüsünün ilerlemesi siklinler (A, B, D, E) ve siklin bağımlı protein kinazlar (CDK)'dan oluşan kompleksler tarafından yönlendirilmektedir. D-tipi siklinler CDK4 ve CDK6'yı aktive ederek hücrenin hücre döngüsüne girmesini ve G1 fazına ilerlemesini sağlamaktadır. G1 fazından S fazına ilerleyişi ise Siklin E'nin CDK2 ile etkileşimi sağlamaktadır. Hücrenin S fazı boyunca ilerlemesini sağlayan Siklin A ile CDK2 kompleksinin oluşumudur. G2 fazında ise Siklin A bu defa CDK1 ile kompleks oluşturarak hücrenin mitotik evreye girmesini sağlamaktadır. Son olarak Siklin B CDK1 ile etkileşime girerek hücrenin M fazında ilerlemesini sağlamaktadır. Hücre döngüsü boyunca oluşan Siklin-CDK kompleksleri Siklinlerin sentezi veya degradasyonu, CDK'ların fosforilasyonu veya CDK inhibitörlerinin bu komplekslere bağlanması ile regüle edilmektedir (Vermeulen vd., 2003; Lim ve Kaldis, 2013).

Hücre döngüsünün modülasyonuna ek olarak, hücre döngüsü kontrol yolları ile DNA onarım yollarının kontrolü, transkripsiyonel programların aktivasyonu ve kalıcı hasar durumunda apoptozun uyarılması sağlanmaktadır. Hücre kontrol noktalarındaki tutuklanmalar; G1/S geçişindeki G1 kontrol noktası, S evresi içinde bulunan intra-S evresi kontrol noktası, G2/M geçişindeki G2 kontrol noktası ve mitoz sırasında metafazdan anafaza geçişi kontrol eden spindle noktası olmak üzere döngü boyunca çeşitli aşamalarda gerçekleşebilmektedir. Bu kontrol noktalarının aktivasyonu ise hücrenin ölümü veya hayatta kalması için iyileşmesi ile sonuçlanmaktadır (El-Aouar Filho vd., 2017).



Şekil 4.93. Ökaryotik hücre döngüsü ve regülasyonunun şematik gösterimi (Vermeulen, vd., 2003).

G1/S ve G2/M kontrol noktalarından geçişin moleküler mekanizması detaylıca çalışılmış olmasına rağmen, hücre döngüsünün S evresinde ilerlemesinin kontrolü ile ilgili bilinenler sınırlıdır. Ökaryotik hücre DNA'sının replikasyonu oldukça sıkı kontrol edildiği ve sadece S evresinde ve sadece bir defa replike olduğu için ekzojen bir hasarın hücreyi ne ilerlemeye ne de G1 evresine geri dönmeye tetiklememesi durumunda S evresinde tutulmanın bir mekanizması olmalıdır (Zhu vd., 2004). Chk1 ve Chk2 aktivasyonu S evresinden G2'ye geçişi kontrol eden ana mediyatörler olup Chk2 aktivasyonu intra-S evresi kontrol noktasını kontrol ederek S evresinde tutulmaya sebep olmaktadır (Falek vd., 2002). Chk2 klasik olarak replikatif stres, DNA hasarı veya kromatin yeniden modellenmesi ile aktive olmaktadır (Matsuoka vd., 1998). Chk1 aktivasyonu ise S evresi veya G2/M noktasında hücre döngüsünde tutuluma sebep olmaktadır. Bu mediyatörlerin ise PNAS-4 geni ile aktive olduğu farklı p53 durumlarındaki akciğer kanser hücre hatlarında gösterilmiştir (Yuan vd., 2015). Bunun yanında bu mekanizma ATM ve ATR adı verilen iki protein ile yönetilmektedir (Sancar vd., 2004; Smith vd., 2010).

İnsan meme adenokarsinom hücre hattı MCF-7 üzerinde anti-kanser etkisi araştırılan bir bileşiğin zaman ve doz bağımlı olarak proliferasyonu engellediği, cyclin A, D1, D3, CDK4, CDK6 protein ekspresyonlarında azalma ile birlikte p21, p27, p53

indüksiyonu ve sonuç olarak hücre döngüsünün S fazında tutulumu gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bunu takiben apoptozu destekleyecek şekilde caspase aktivasyonu, PARP yıkılımı ve DNA fragmentasyonu olduğu belirlenmiştir. Apoptoz aktivasyonu, S-fazında tutulum görüldükten ancak 24 saat sonra belirlenebilmiş olup, bileşiğin tetiklediği hücre döngüsü tutulumunun apoptotik cevaptan önce gerçekleştiği vurgulanmıştır. Aynı zamanda JNK, p38, MAPK, ERK, ve Akt aktivasyonu ve Cyclin E, fosforile Rb ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir (Chen ve Wong, 2008).

Daha önce anti-tümör etkileri gösterilen bir polifenolün üçlü negatif meme kanser hücre hatları üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada hücrelerin proliferatif kapasitesindeki azalmaya hücre döngüsünde yavaşlama ve S evresinde tutulmanın eşlik ettiği belirlenmiştir. S evresindeki tutulma ise Chk2 fosforilasyonu ve cyclin D1 seviyesindeki belirgin azalma ile karakterize edilmiştir (Zhao vd., 2014). Hücre döngüsünün S evresinin bir kemoterapötik aksiyon mekanizması olarak hedeflenmesinin pratikteki önemi, klinik olarak etkin bir anti-kanser ajan olarak kullanılan Topoizomeraz I inhibitörü irinotekan ile vurgulanmaktadır (Ramnath vd., 2005). Kemoterapötik ilaç Irofulven buna benzer olarak S evresinde hücre döngüsünün tutulmasına sebep olmaktadır (Wang vd., 2004).

Bir alkaloidin pankreas kanser hücre hatları Miapaca-2 ve PANC-1 üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada mitokondriyal membran potansiyelinin azalarak ROS oluşumunun gözlendiği, ERK ve JNK fosforilasyonunun aktive olduğu gösterilmiştir. Bcl-2/Bax modülasyonu, caspase-3 aktivasyonu PARP1 yıkımı temelinde JNK aktivasyonu ile gerçekleşerek hücrenin mitokondriyal yolakla apoptoza gittiği belirtilmiştir. Aynı zamanda ERK aktivasyonunun ise hücre döngüsünün S-fazında tutulumu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuş olup Cyclin A, Cyclin D1 protein ekspresyonlarındaki azalma ile S-fazındaki tutuluma eşlik eden moleküler araçlar belirlenmiştir (Xu vd., 2017).

Benzer şekilde DLD-1 insan kolon kanser hücre hatlarında hücre döngüsünün S evresinde tutulduğu ve buna p21 up-regülasyonu ve ERK aktivasyonunun eşlik ettiği belirlenmiştir (Zhu, vd., 2004). p21 CDK direk inhibitörü olarak G1 ve G2 evrelerinde tutuluma sebep olmaktadır. Ancak aynı zamanda proliferatif olan hücre nükleer antijenine (PCNA) doğrudan bağlanarak DNA sentezini inhibe edebilmektedir. DNA'ya zarar veren

herhangi bir uygulama, daha sonra p53'ü aktive eden ve p21 geninin p53'e bağılı indüksiyonuna yol açan ATM veya ATR'nin aktivasyonuna yol açacaktır. p21 ekspresyonu, ATM/ATR-ERK yolu aracılığıyla DNA'ya zarar veren ajanlar tarafından da indüklenebilir. Bu durumda, etkinleştirilmiş ATM/ATR, p21 ifadesini p53'ten bağımsız bir şekilde indükleyen ERK'yi etkinleştirir. Diğer çalışmalar ayrıca, ERK yolağının proteinin fosforlanması yoluyla p21 protein seviyelerini artırdığını göstermiştir (Zhu, vd., 2004).

S evresinde hücre döngüsünün tutulduğu ve ERK ve STAT3 yolaklarının down-regüle olduğu ovaryum kanser hücre hattı (Zhu vd., 2014) ve akciğer kanser hücre hatları A549 ve 95D'de gösterilmiştir (Liu, vd., 2008).

Halk tıbbında kullanılan bir bitki ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri araştırıldığında ekstraktın hücre döngüsünün S evresinde tutuluma ve erken apoptoza sebep olduğu, apoptozun ise caspase 2, 6, 8 ve 9 aktivasyonu ile gerçekleştiği belirlenmiştir (Kwan vd., 2016). Farklı bir bitkiden elde edilen bir terpenoidin insan akciğer hücre kanser hattı A-549 proliferasyonunu engellediği, apoptozunu indüklediği ve hücre döngüsünün S evresinde tutuluma yol açtığı belirtilmiştir. Doza bağılı olarak cyclin B1 ekspresyonunun azaldığı, Bax/Bcl-2 oranının arttığı, PI3K/AKT ve STAT3 yolağının down regüle olduğu gösterilmiştir (Chen vd., 2020). Yine bitki kaynaklı bir alkaloid, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının proliferasyonunu doz ve zamana bağılı olarak baskıladı, hücre döngüsünün her iki hücre hattında da S evresinde tutulumuna sebep olduğu ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (caspase-3, caspase-9, PARP, Bax/Bcl-2) (Wu vd., 2017).

Tez çalışması kapsamında akış sitometresi ile gerçekleştirilen analizler sonucunda, Ana 11 peptidinin artan konsantrasyonları G1 evresinde senkronize edilmiş MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerine uygulandığında S evresindeki hücre yoğunluğunda artış ve buna paralel olarak G2/M evresindeki hücre yoğunluğunda azalma olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.70. – Şekil 4.73., Çizelge 4.9. – Çizelge 4.10.). Bu durum hücre döngüsü sırasında hücrelerin Ana 11 uygulaması ile G0/G1 kontrol noktasından geçtiğini ancak replikasyonun gerçekleştiği S evresinde ilerleyemediği veya yavaş ilerlediğini ve mitotik evreye geçemediğini göstermektedir. MCF-10A hücre hattının hücre döngüsü analiz bulgularına göre ise Ana 11 uygulaması ile G0/G1 evresindeki hücre yoğunluğunda bir

artış ve bununla uyumlu olarak G2/M evresindeki hücre yoğunluğunda bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.74. ve Şekil.4.75., Çizelge 4.11.). Bu durum ise hücre döngüsü sırasında hücrelerin Ana 11 uygulaması ile G0/G1 kontrol noktasından daha ileriye hücrelerin replikatif aşamaya geçemediğini göstermektedir. Transkripsiyonel seviyede CDKN1A (p21) ekspresyon seviyesi bu bulgular ile uyumlu bir şekilde MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında Ana 11 uygulaması ile artış göstermiştir (Şekil 4.82 ve 4.84.). Bu da siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21 ile hücre döngüsünün ilgili evrelerde tutulduğunu göstermektedir.

Bir transkripsiyon regülatörü olan Retinoblastoma proteini (pRb)'nin varlığı hücre döngüsünde G1'den S evresine geçiş için kritiktir. E2F ailesi hücre döngüsü transkripsiyon faktörleri ile etkileşimi ise bu geçişi baskılamaktadır. E2F1 transkripsiyon faktörünün pRB'den ayrılmasını takiben E2F1'in DNA replikasyonunun başlaması ve hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli genlerin ekspresyonunu aktive etmesi memeli hücre proliferasyonu için anahtar bir basamak olarak kabul edilmektedir (Van Den Heuvel ve Dyson, 2008). Ancak bir taraftan E2F1'in hem normal hücrelerin hücre döngüsüne girişini kontrol ederken diğer yandan pro-tümörijenik ve pro-apoptotik olduğu belirtilmektedir (Fang vd., 2020). Bu konuda E2F1 ekspresyon seviyelerinin işlevini belirlediğine dair gerçekleştirilen ilgi çekici bir çalışmada ise mRNA seviyelerine göre düşük seviyede E2F1 ekspresyonunun hücre döngüsünü uyarıcı genleri aktive ettiği, orta seviyelerde ekspresyonunun p18, p19, p27 gibi hücre döngüsünü durduran genleri aktive ederken yüksek seviyelerde ise apoptotik genleri indüklediği ortaya konulmuştur (Shats vd., 2017). Tez çalışması kapsamında MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında RNA düzeyinde E2F1 ekspresyon seviyeleri artarken MCF-7'de azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.82. – Şekil 4.84.). Literatürde E2F1 fazla ekspresyonunun S fazına geçişi ve ardından apoptozu indüklediğine dair gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları ile MDA-MB-231 hücre hattı için elde edilen sonuçlar birbirini desteklemektedir (Shan ve Lee, 1994). Ancak yine de E2F1 transkripsiyon faktörünün hücrenin kaderi ile ilgili yukarıda açıklanan paradoksal durumu sebebiyle bu ekspresyon verilerinin diğer veriler ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği, tek başına belirteç olarak bir anlam ifade etmeyeceği düşünülmektedir.

Hücre döngüsü düzenleyici proteinlerden Cyclin E1 ekspresyon seviyesindeki değişim araştırılmıştır (Şekil 4.91. ve Şekil 4.92.). Ana 11 uygulaması sonucunda MDA-

MB-231 hücre hattında Cyclin E1 ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,5 kat artmıştır. Diğer hücre hatları için belirgin bir değişim görülmemiştir. Hücre döngüsünde S evresine ilerleyişi yönlendiren bu proteinin MDA-MB-231 hücre hattında ekspresyonunun artması, akış sitometresi analizi sonucu S evresindeki hücre popülasyonundaki artışı destekler nitelikte bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Tümör hücre büyümesini yavaşlatan en önemli sebeplerden biri apoptotik aktivitedir. Bu konuda literatürdeki ilk örneği oluşturan çalışmada, melittinin lösemi hücrelerinde calmodulini inhibe ederek apoptoza yol açtığı gösterilmiştir. Bu inhibisyon ile  $Ca^{+2}$  pompaları  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa sebep olarak hücre ölümü indüklenmiştir (Hait vd., 1985). Bu çalışmadan günümüze, arı venomunun ve melittinin başta apoptotik olmak üzere anti-kanser etkilerinin gösterilmesi ve moleküler mekanizmaların aynı zamanda hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin aydınlatılması amacıyla çok farklı kanser hücre tipleri ile çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir.

Arı venomu ile gerçekleştirilen bir çalışmada insan servikal epidermoid karsinom Ca Ski hücrelerinde, mitokondri-ilişkili yolaklar ve Fas reseptör yolağı ile hücre döngüsünde tutulma ve apoptozun indüklendiği gösterilmiştir. Akış sitometri çalışmaları arı venomu uygulamasının reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu indüklediği, sitoplazmik  $Ca^{+2}$  seviyelerini artırdığı, bunu takiben mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ile sitokrom c salınımı, caspase-3 aktivasyonu ve apoptozu indüklediğini göstermiştir. Arı venomu aynı zamanda Fas, p53, p21, Bax seviyelerinde artışı indüklerken, Bcl-2 seviyelerini azaltmıştır. Caspase-8 ve caspase-9 aktiviteleri arı venomu uygulaması ile artmış, bu da caspase-3 aktivasyonunu desteklemiş ve sonuçta DNA fragmentasyonuna sebep olmuştur (Ip, vd., 2008b). Kaspaz bağımlı yolak dışında, araştırmacılar aynı zamanda apoptoz-inducing factor (AIF) ve endonüklaz G (Endo G) ekspresyonu ile kaspaz-bağımsız yolağın da aktive olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar daha sonra MCF-7 meme kanser hücre hattı üzerinde aynı etkileri, hücre popülasyonunun G0/G1 ve S evresindeki miktarının arttığını göstermişlerdir (Ip, vd., 2008a).

Akut ve kronik myeloid lösemi hücre hatları ile yakın zamanda yapılan bir çalışmada da melittinin mitokondriyal membran potansiyelinin azaltıp, caspase 3/7

aktivitesini artırarak hücreleri apoptoza yönlendirdiği rapor edilmiştir (Ceremuga vd., 2020).

Melittinin lösemi hücre hattı U397 üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, Akt sinyal yolaklarını downregüle ederek apoptoza yol açtığı, aynı zamanda Bcl-2 down-regülasyonu ve caspase-3 aktivasyonu gerçekleştiği rapor edilmiştir (Moon, vd., 2008).

Wang, vd. (2009) tarafından sunulan çalışmada melittinin CaMKII-TAK1-JNK/p38 yolağını aktive edip IKK/NF-kB'yi inhibe ederek TRAIL ile sinerji oluşturarak insan hepatoselüler karsinom (HCC) hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bu da TRAIL-dirençli kanser tedavisi için umut vaat eden bir kombinasyon terapisi olarak önerilmiştir.

Melittinin mide kanser hücre hattı SGC-7901 üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, melittinin reaktif oksijen türleri seviyelerini arttırdığı, caspase-3 aktivitesini indükleyerek apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Cyt C, Endo G ve AIF protein seviyelerini artırırken, Smac/Diablo protein ekspresyonunun azaldığı da belirlenmiştir (Kong, vd., 2016).

2018 yılında insan bronkojenik karsinom hücre hattı ChaGo-K1 üzerinde melittinin etkisi incelenmiş ve bu hücrelerin melittinin sitotoksik etkisine normal akciğer fibroblast hücrelerinden (Wi-38) daha yatkın olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda melittin proliferasyonu baskılamış ve apoptoza ve hücre döngüsünün G1 evresinde tutuluma sebep olmuştur (Tipgomut, vd., 2018).

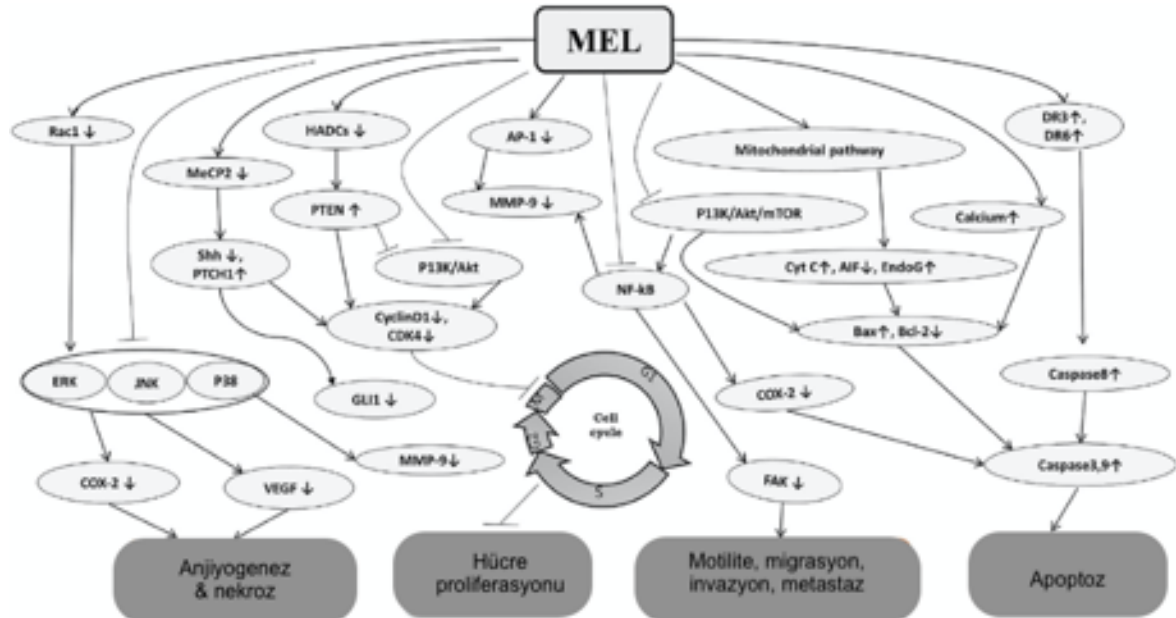
Pek çok kanser hücresinde tümör baskılayıcı genlerin DNA metilasyonu ile susturulmuş bulunmasından yola çıkılarak insan hepatoselüler karsinom hücre hattı SMMC-7721 ile gerçekleştirilen bir çalışmada, melittinin Methyl-CpG bağlanma proteini 2 (MeCP2) ekspresyonunu azaltarak hücre proliferasyonunu engellediği ortaya konulmuştur. Bunu takiben melittinin hücre farklılaşması, proliferasyonu ve doku polaritesinde önemli bir rolü olan Shh sinyalizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda Cyclin D1 ve CDK4 ekspresyonunda azalma ile desteklenen akış sitometre

analizine göre hücre döngüsünde G0/G1 evresinde bir gecikme olduğu belirlenmiştir (Wu, vd., 2015).

Arı venomu ve melittin prostat kanser hücre büyümesi üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Bu etkinin ise Bcl-2, Cox-2, XIAP, iNOS gibi anti-apoptotik gen ürünlerinin aşağı regülasyonu ile gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu da NF-kB transkripsiyonel aktivitesinin inhibisyonu sonucu apoptotik hücre ölümüne sebep olmuştur (Park, vd., 2011).

Arı venomu ve melittinin indüklediği apoptozla ilişkili yollar ovaryum kanser hücrelerinde de gösterilmiştir. Bu çalışmada melittin ölüm reseptörlerini indükleyip JAK2/STAT3 yolağını inhibe ederek apoptotik etkisini göstermiştir. STAT3 inaktivasyonu ve DR3, 4 ve 6 overekspresyonu ile ovaryum kanser hücrelerinin büyümesi yavaşlamıştır. Bu ölüm reseptörlerinin ekspresyonu ise caspase-8 aracılı apoptozun aktivasyonu ile sonuçlanmıştır (Jo, vd., 2012).

Melittinin yukarıdaki çalışmalarla anlatılan bugüne kadar aydınlatılmış anti-kanser etkilerine sebep olan moleküler etki mekanizmaları Şekil 4.94.'de özetlenmiştir.



Şekil 4.94. Melittinin moleküler mekanizmalarını özetleyen şema. (Rady vd., 2017)

Hücre ölüm modunun AnneksinV/FITC-PI ile akış sitometresi analiz sonuçları incelendiğinde, Ana 11 peptidinin tüm hücre hatları üzerinde apoptozu indükleyici bir



etkisi olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda apoptotik etkinin doza bağımlı olarak değiştiği de görülmektedir (Şekil 4.77. – Şekil 4.81., Çizelge 4.12. – Çizelge 4.14.). Apoptozun hangi moleküler yollar aracılığı ile gerçekleştiğinin araştırılması için transkripsiyon seviyesinde gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre MDA-MB-231 hücre hattında (Şekil 4.82.) FAS ve AKT1 genlerinin ekspresyon seviyelerinde bir azalma olduğu belirlenmiştir. Arı venomundan elde edilen majör peptidin AKT1 genindeki ekspresyon seviyesinde azalmaya sebep olarak literatürde pek çok örneklerinde olduğu gibi PI3/AKT yolağını baskıladığı, caspase-3 aracılı olarak hücreyi apoptoza götürdüğü düşünülmektedir. Aynı zamanda standart sapma değerleri çok yüksek olmasına rağmen BCL2/BAK1 oranının da düşmüş olması da bu çıkarımı desteklemektedir. MCF-7 hücre hattında ise (Şekil 4.83.) daha önce de değinildiği üzere standart sapma aralığının çok yüksek olması sebebiyle çoğu genin transkripsiyon seviyelerinin değerlendirilmesi mümkün olmamıştır. Ancak FAS geninin standart sapma alt sınır değerinin 1'in üzerinde olması sebebiyle FAS ekspresyonunun arttığı yönünde bir yorum yapılabilmektedir. Hücre membranında bulunan bir ölüm reseptörünün ifadesinden sorumlu olan FAS geninin ekspresyonunun artması apoptozun ekstrinsik yolla indüklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Gerçekten de protein seviyesindeki ekspresyon analizi değerlendirildiğinde (Şekil 4.85. – Şekil 4.86.) MCF-7 hücre hattında ekstrinsik apoptoz yolağı efektörlerinden caspase-8 protein ekspresyonunun kontrole göre arttığı belirlenmiştir. MCF-10A hücre hattında ise apoptozla ilişkili ekspresyon analizi yapılan genlerden FAS ve DR5 seviyelerinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.84.). Bu sonuçlar bu hücre hattı için de Ana 11 peptidinin ekstrinsik apoptoz yolağı üzerinde etkili olabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu hücre hattı için caspase-8 seviyesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Bunun sebebinin ölçüm yapılan uygulama saati ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Tümör nekroz faktör  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) apoptoz ve hücre sağ kalımının yanı sıra inflamasyon ve bağışıklıkta da anahtar rol oynayan çok işlevli bir sitokindir. TNF-  $\alpha$  'nın TNF reseptörü 1 ve 2 (TNFR-1, TNFR-2) ile etkileşimi, TNF- $\alpha$ 'nın bu çok çeşitli işlevlerine yol açan çeşitli sinyal iletim yollarını aktive etmektedir. TNFR-1 ölüm reseptörleri ailesinin bir üyesi olarak apoptozu indüklemektedir. Ancak aynı zamanda hücre sağ kalımı için gerekli sinyallerin iletimini de sağlamaktadır. TNF- $\alpha$  TNFR-1 etkileşimi sonrasında JNK, PI3/AKT, p38/MAPK yollarının aktivasyonu sağlanmaktadır. Sonuç olarak, c-Fos/c-Jun ve NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörlerinin

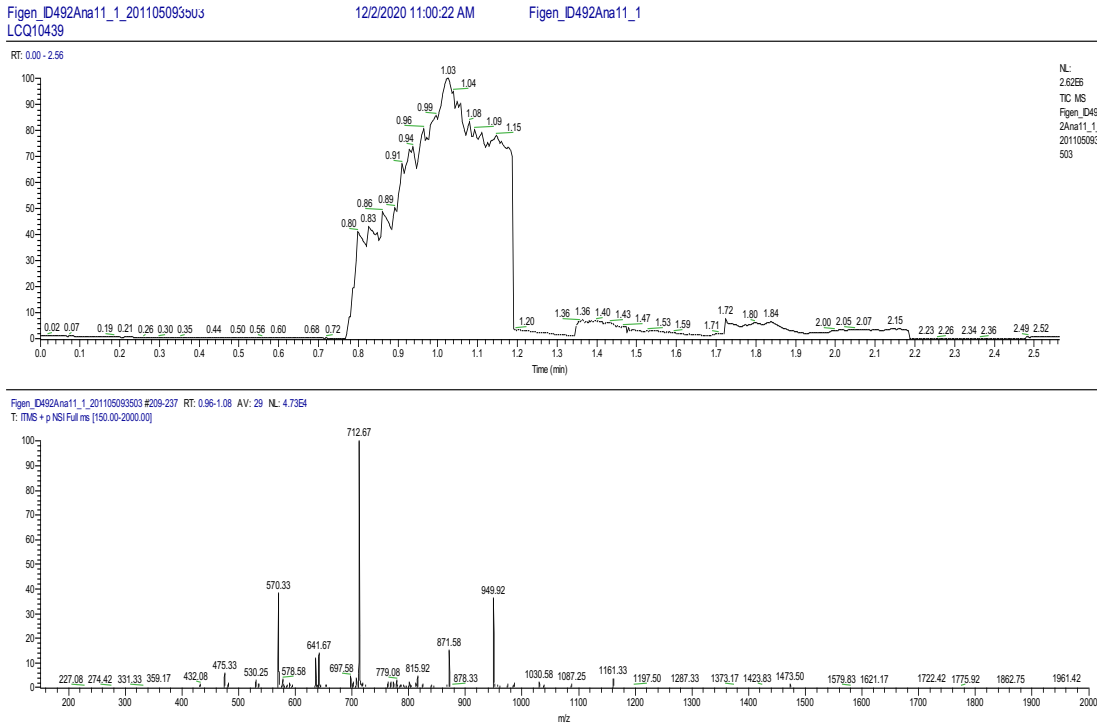
aktivasyonu anti-apoptotik, proliferatif, immünomodülatör ve inflamatuvar genlerin transkripsiyonu indüklenmektedir (van Horssen vd., 2006). Bunlardan biri de COX-2 genidir. NF-kB inaktivasyonunun bazı tümörleri TNF- $\alpha$ 'ya duyarlı hale getirdiği bilinmektedir (Orlowski ve Baldwin Jr, 2002). Ana 11 uygulanan MDA-MB-231 hücre hattında TNFA ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat artmıştır (Şekil 4.84.). Aynı hücre hattında standart sapma değerleri kesin bir yargıya varmayı engellese de kontrole kıyasla NFKB1 ve BCL2/BAK1 oranı düşük olarak değerlendirildiğinde akış sitometresi sonuçlarına göre belirlenen apoptotik etki açıklanabilmektedir. Literatürde benzer şekilde renal tübül epitel hücreleri ve fareler ile gerçekleştirilen bir çalışmada melittin uygulamasının TNFA ekspresyon seviyesini artırdığı, in vitroda apoptoza sebep olduğu, Bax/Bcl-2 oranının arttığı belirlenmiştir. Bu durum Bax/Bcl-2 oranının artması ve TNF- $\alpha$  ölüm reseptörleri aracılı sinyal yolağının up-regülasyonu ile açıklanmıştır (Shu vd., 2019). Diğer yandan MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarında TNFA ekspresyonu çok azalmış veya baskılanmıştır (Şekil 4.83. – Şekil 4.84.). Baskılanmış TNFA seviyeleri gerçekten de protein seviyesinde gerçekleştirilen ekspresyon analizi bulgularına göre Cox-2 ekspresyonunda belirgin bir azalma ile karakterize edilebilmektedir (Şekil 4.89. – Şekil 4.90.). Cox-2 ekspresyonunun inhibisyonunu takiben NFKB1 mRNA seviyelerinde de azalma görülmesi beklenmektedir. MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarında bu azalmanın gözlenmemesinin zamana bağlı bir değerlendirme yapılamamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Akciğer kanser hücre hatları ile gerçekleştirilen bir çalışmada arı venom uygulamasının COX-2 mRNA sentezini ve PGE2 sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Jang, vd., 2003). Farklı bir çalışmada melittinin COX-2 ve PGE2 ekspresyonunu azaltırken, p38 MAPK fosforilasyonunu artırarak anti-kanser etki gösterdiği rapor edilmiştir (Huh, vd., 2012).

Melittinin anti-kanser etkisini yaratan bir diğer özelliği de yüksek dozlarda fosfolipid membranlar ile etkileşime girip membranda porlar oluşturan litik bir peptid olmasıdır. Bu özelliği mide ve kolon kanseri hücreleri üzerinde çalışılmış, melittinin 20  $\mu$ g/ml dozda 1 dakika içinde granülasyon, vakuollenme ve hücre şişmesine sebep olduğu gösterilmiştir (Soliman vd., 2019). Ancak bu özellik kanser hücresine spesifik olmadığı için nano taşıyıcı yapılar ile melittinin kanser hücrelerine hedefli olarak yönlendirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Peeler vd., 2019).

#### 4.14. Ana 11 Peptidinin Biyokimyasal Yapı Tayini

##### 4.14.1. Ana 11 peptidinin moleküler ağırlığının belirlenmesi

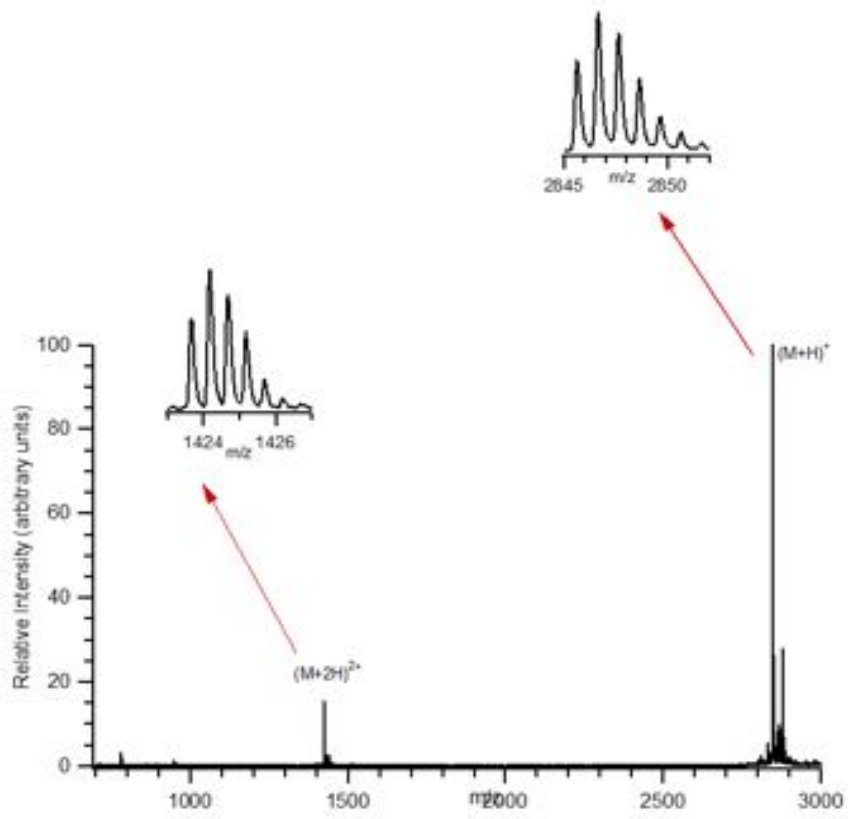
Ham venomun HPLC’de farklı gradient yürüyüşler ile saflaştırılması sonucu elde edilen etken Ana 11 fraksiyonu için herhangi bir enzimatik işlem yapılmaksızın ESI kütle spektrometresi ile elde edilen spektrum aşağıdaki gibidir (Şekil 4.95.).



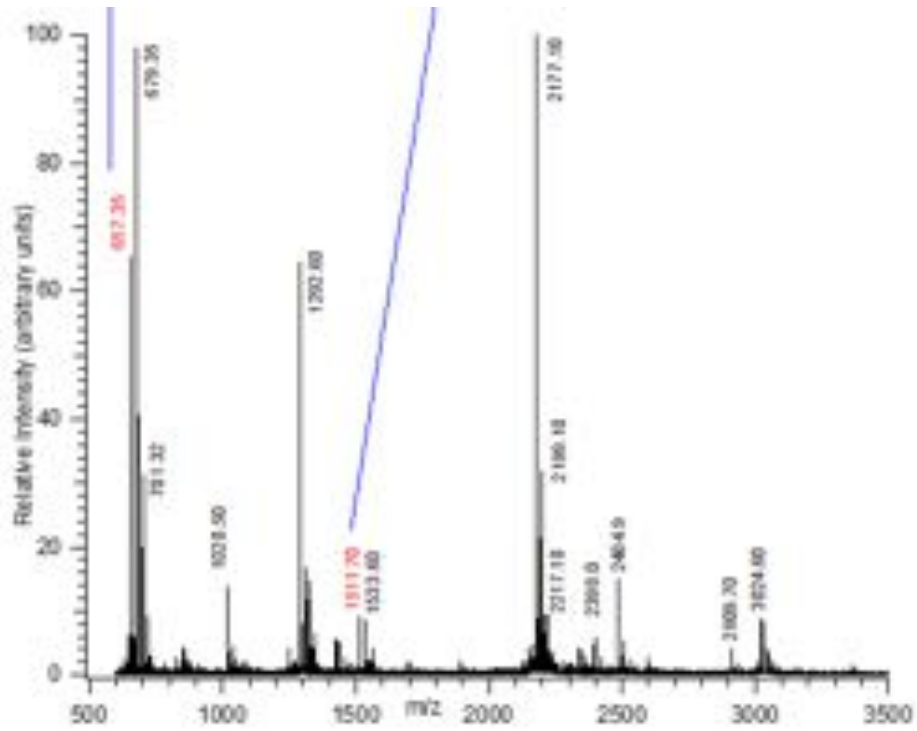
Şekil 4.95. Ana 11 peptidinin ESI – Ion trap kütle spektrometresi analizi sonucu elde edilen kütle kromatogramı.

ESI kütle spektrometresi sistemi ile elde edilen veriler Ana 11 peptidinin 2846,45 Da moleküler ağırlığında olduğunu göstermiştir. Ayrıca Ana 11 peptidi için hiçbir işlem uygulanmadan MALDI-TOF-TOF sistemi ile de analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.96.).

Çalışmalar Ana 11 peptidinin tripsin enzimi ile muamele edilip ardından triptik peptidlerin MALDI-TOF-TOF ile yeniden m/z oranlarının belirlenmesi ile devam etmiştir. Triptik peptidlere ait kütle spektrumu aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.97.).



Şekil 4.96. Ana 11 peptidinin MALDI-TOF-TOF kütle spektrumu.



Şekil 4.97. Ana 11'in tripsin enzimi ile yıkımı sonrasında triptik peptidlerin MALDI-TOF-TOF kütle spektrumu.

HPLC’de gerçekleştirilen saflaştırma basamakları ile Ana 11 peptidi ham venomdan ayrıştırılarak tek bir pik olarak elde edilmiştir. HPLC’den alınan bu fraksiyonun SDS-PAGE ile belirlenen elektroforetik profilinde ise molekül ağırlığı ise 1,060 ile 3,496 Da aralığında geniş ve tek bir bant olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE tekniğinin kısmen bilgi vermesi ancak çok hassas bir teknik olamaması nedeni ile molekül ağırlığı iki farklı kütle spektrometresi sistemi ile ayrıca belirlenmiştir. ESI MS sistemi ile peptidin molekül ağırlığı 2846,45 Da olarak belirlenmiştir. Bu veriler ve ayrıca etkin bileşenin arı venom bileşeni olarak karışım içinde yüksek oranda bulunması nedeni ile bu peptidin melittin ya da melittin-benzeri bir peptid olduğu fikrini kuvvetlendirmiştir. Mevcut literatür baz alındığında da melittinin 2846,46 Da molekül ağırlığında olduğu da görülmektedir (Habermann, 1972). Diğer yandan belirlenen sekans için ExPASy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) ile teorik molekül ağırlığı hesaplandığında 2847,49 bulunmaktadır. Peptidin deneysel ve teorik olan iki bulgu arasındaki 1 Da olan bu fark peptidin C-terminal bölgesinde yer alan Glutamin amino asidinin amidasyona uğradığını göstermektedir. Bu nedenle Ana 11 peptidinin aminoasit dizilimi GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub> olarak belirlenmiştir.

Diğer yandan MALDI-TOF-TOF sistemi ile yapılan analizde görüldüğü üzere +1, ve +2 yüklü iyon sinyalleri gözlenmiştir (Şekil 4.96., Şekil 4.97.). Yüksek çözünürlükte elde edilen bu sinyallerin bulunduğu noktalara odaklanınca her bir sinyalin monoizotopik sinyalleri net olarak görülmektedir. Ana 11 peptidini hiçbir işleme tabi tutmadan alınan kütle spektrumunda çok güçlü sinyaller elde edilmiştir. Ancak örnek tripsin enzimi ile muamele edildiğinde enzim parçalanması ile kopan tüm sinyallerin görülmesi mümkün olmuştur. Diğer sinyallerin ise Ana 11 peptidinin RP-HPLC kromatogramına göre sol tarafında yer alan Ana 10 fraksiyonu kaynaklı olarak alınmış olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan bazıları tripsin enziminin otolizizi sonucu oluşan peptid sinyalleri olsa da bu peptidler kontrollü karşılaştırma ile tespit edilmiş ve ayrı değerlendirilmiştir. Melittin olduğu düşünülen ve m/z 2845,6 Da da gözlenen sinyalin, literatür taramasında amino asit dizisinin yaygın olarak rapor edilmiş olan ve molekül ağırlığı 2846,46 Da olarak belirtilen GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ olduğu görülmektedir. Oysa ki MALDI-TOF-TOF analizde ise bu değer 2845,6 Da olarak gözlenmiştir. Literatür ile aralarında 1,0 Da’luk kütle farkı bulunmaktadır. Kütle sinyali protonlanmış olduğundan gerçekte 2,0 Da’luk bir kütle farkı bulunmaktadır. Ancak, tripsin ile muamele edilen örnekten elde

edilen peptid sinyalleri incelendiğinde, m/z 657,35 Da gözlenen peptid sinyalinin, *GIGAVLK* e karşılık gelmesi, aynı şekilde m/z 1511,70 Da gözlenen peptid sinyalinin *VLTGLPALISWIK* ile örtüşmesi bu sinyallerin örnekteki 2845,6 Da sinyalinin triptik parçalanma ürünleri olduğu fikrini güçlendirmektedir. ESI-MS sonuçları da amidasyon olduğunu doğrular niteliktedir.

#### 4.14.2. Ana 11 peptidinin birincil yapısının belirlenmesi

Ana 11 peptidinin Edman reaksiyonu kullanan protein dizilim belirleyici cihazına yüklenmesi ile amino asit dizilimi belirlenmiştir. Dizileme sonucu Ana 11 peptidi, “GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ” amino asit dizisine sahip 26 amino asit uzunluğunda bir peptid olarak belirlenmiştir. Dizilim BLAST kullanılarak diğer dizilimler ile karşılaştırıldığında; 26 amino aside en benzer dizilimler aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.98.).

Query	1	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	26
<a href="#">3QRX_B</a>	1	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	26
<a href="#">1BH1_A</a>	1	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	26
<a href="#">QGP71485.1</a>	35	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	60
<a href="#">CAC42164.1</a>	41	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	66
<a href="#">XP_016916903.2</a>	44	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	69
<a href="#">0404199A</a>	44	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	69
<a href="#">NP_001011607.1</a>	44	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	69
<a href="#">Q8LW54.1</a>	51	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	76
<a href="#">ADU04020.1</a>	92	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	117
<a href="#">P0DPR9.1</a>	44	GIGAVLKVLTGLPALINWIKRKRQQ	69
<a href="#">P59261.1</a>	44	GIGAVLKVLATGLPALISWIKRKRQQ	69
<a href="#">AAO12201.2</a>	44	GIGAVLKVLTGLPALIGWIKRKRQQ	69
<a href="#">P01502.1</a>	1	GIGAILKVLSTGLPALISWIKRKRQE	26
<a href="#">AMP81999.1</a>	1	GIGAILKVLSTGLPALISWIKRKRQE	26
<a href="#">MEHB2</a>	1	GIGAVLKVLTGLPALISWISIKRKRQQ	27

Şekil 4.98. Melittin peptidinin BLAST kullanılarak elde edilen benzerlik analizi

Diğer yandan emin olunmak için peptid dizisi direk olarak Edman degradasyonu reaksiyonu ile belirlenmiştir. Edman dizileme bulgularına göre dizilim; kütle bulgularını destekler nitelikte bulunmuş olup, GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ olarak belirlenmiştir. Kütle spektrometre bulgularına göre peptidin amidasyona uğradığı gösterildiğinden Ana 11 olarak belirtilen peptidin dizilimi; GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub> olan amidasyona uğramış bir peptid olduğu ve melittin dizilimine sahip olduğu belirlenmiştir.

Böylelikle *Apis mellifera anatoliaca* arı venomunda %58,1 gibi yüksek bir oranda bileşen olarak belirlenen ilk peptidin melittin olduğu ortaya konulmuştur. Farklı *Apis* türlerinde 1-2 aminoasitlik farklılıkla ifade edilen melittin peptidinin *Apis mellifera anatoliaca* alt türü için bir farklılık göstermediği ve literatürdeki örnekleri ile aynı dizilime sahip olduğu belirlenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışması kapsamında ülkemiz doğal zenginlikleri arasında yer alan *Apis mellifera anatoliaca* venom bileşenleri literatürde ilk defa elektroforetik ve kromatografik yöntemler ile karakterize edilmiştir. Ham venom RP-HPLC analizine göre 11 adet majör fraksiyona ayrılmış olup bu fraksiyonlar Ana 1'den Ana 11'e kadar isimlendirilmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucu bu bileşenlerin bal arısı ham venomu içinde bulunan, apamin, PLA2, MCD-peptid ve hyaluronidaz gibi potansiyel terapötik etkinlikteki moleküllere karşılık gelebileceği de öngörülmüştür.

Majör venom venom fraksiyonlarının insan meme kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve anti-proliferatif etkileri değerlendirilmiştir. Ham venomun %58,1'ini oluşturan Ana 11 fraksiyonunun ileri saflaştırması gerçekleştirilmiş ve saf Ana 11 peptidinin kimyasal ve biyolojik özelliklerinin kısmen aydınlatılması amaçlanmıştır. Ana 11 peptidinin meme kanser hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerindeki anti-metastatik ve anti-kanser etkinliği in vitro yöntemler ile değerlendirilerek araştırılmıştır. Aynı zamanda etkili bulunan peptid ve dozlarının normal meme epitel hücre hattı MCF-10A üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen bulgular ile izole edilen bu peptidin insan meme kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif ve apoptotik etkisi gösterilmiştir. Bunun yanında yüksek metastatik özellik taşıyan MDA-MB-231 hücre hattının motilite ve invazyonunu yavaşlatıcı etkisi belirlenmiştir. Elde edilen bu fonksiyonel aktivite bulgularının moleküler mekanizmasında görev almış olabileceği düşünülen yolaklar mRNA ve protein seviyesinde öncül olarak araştırılmış olup, her bir hücre hattı için biyolojik etkinin farklı mekanizmalar ile gerçekleşiyor olabileceği görülmüştür. Özellikle üçlü negatif özellik taşıyan hücre hattı üzerinde peptidin diğer iki hücre hattından farklı bir mekanizmayla etki ediyor gibi görünmesi peptidin etki mekanizmasıyla ilgili cevap bekleyen yeni sorular oluşturmuştur. Bu de etki mekanizmasının tartışmasız olarak aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalar yapılması gerekliliğini vurgulamaktadır.



Çalışmanın son basamağında Ana 11 peptidinin kütle spektrometresi ile kesin moleküler ağırlığı 2846,45 Da ve birincil yapısı GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub> olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgular peptid veri tabanında benzerliği için araştırılmış literatürde bugüne kadar rapor edilmiş diğer *Apis mellifera* ırklarından izole edilen melittin dizileri ile aynı olduğu belirlenmiştir. Bilgilerimize göre melittin peptidinin *Apis mellifera anatoliaca*'da varlığı ve karakterizasyonu ilk kez gerçekleştirilmiştir.

*Apis mellifera*'dan izole edilmiş melittinin güçlü anti-kanser aktiviteleri bugüne kadar çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Literatüre göre hem in vitro hem in vivo çalışmalar melittinin proliferasyonun inhibisyonu, apoptoz, anjiyogenezin inhibisyonu, hücre döngüsü tutulması, kanser hücre hareketliliği, hareketi, invazyonu ve metastazının inhibisyonu ile sonuçlanacak sinyal transdüksiyon ve regülatör yolları etkilediğini göstermektedir.

Arı venomu, bileşenleri ve uygulamaları ile sayısız araştırma ve derleme çalışması bulunuyor olsa da bu alanda hala kat edilmesi gereken büyük bir yol mevcuttur. Arı venom bileşenleri ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma yapılmış olmasına ve yüksek terapötik potansiyeline rağmen aksiyon mekanizmaları ve etkilediği metabolik yollarla ilgili bir konsensüs bulunmamakta ve bilinmeyen çok sayıda detay bulunmaktadır (Zhang et al., 2018). Bu nedenle, arı venomu ve etkin bileşenlerinin hücresel ve moleküler hedeflerini incelemek ve ana hedef bölgelerin yanı sıra ana etki yollarını bulmak önem taşımaktadır (Carpena et al., 2020).

Bunun yanında, arı venomu veya etkin bileşenleri tek başına terapötik ajanlar olarak değil, sinerjistik etkisi için hali hazırda mevcut olan diğer klinik ve terapötik modern tıp uygulamaları ile birlikte kullanımı için araştırılması umut vaat eden bir başka çalışma alanı olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte literatürdeki çalışmalar hem in vitro hem in vivo örnekleri kapsıyor olsa da in vivo çalışmaların performansının gerçeğe daha yakın olması sebebiyle bu çalışmaların sayısının artırılması daha çok önem taşımaktadır.

Melittin ve arı venomunun protein yapıdaki doğası, kısa yarılanma ömrü ve bu sebepler ile somut bir doz belirlemenin sorunlu doğası göz önünde bulundurulduğunda etkin bileşenlerin polimer veya diğer nano taşıyıcı yapılar ile kombine edilerek çalışılması da bu alandaki çalışmaların geleceğinde önemli bir yere sahip olacaktır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abrantes, A. F., Rocha, T. C. d., Lima, A. B. S. d. and Cavalcanti, M. T., 2017, Honeybee venom: Influence of collection on quality and cytotoxicity, *Ciência Rural*, 47, 10.
- Abreu, R., Moraes, R. and Malaspina, O., 2000, Histological aspects and protein content of *apis mellifera* l. Worker venom glands: The effect of electrical shocks in summer and winter, *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6, 1, 87-98.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. and Khan, A. U., 2017, Awareness and current knowledge of breast cancer, *Biological research*, 50, 1, 1-23.
- Al-Badri, Z. M., Som, A., Lyon, S., Nelson, C. F., Nüsslein, K. and Tew, G. N., 2008, Investigating the effect of increasing charge density on the hemolytic activity of synthetic antimicrobial polymers, *Biomacromolecules*, 9, 10, 2805-2810.
- Albini, A. and Benelli, R., 2007, The chemoinvasion assay: A method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation, *Nature protocols*, 2, 3, 504.
- Alpatov, W., 1948, *The races of honeybees*, Moscow: Moscow Society of Naturalists,
- Arias, M. and Sheppard, W., 1996, Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*apis mellifera*l.) inferred from mitochondrial DNA sequence, *Molecular phylogenetics and evolution*, 5, 3, 557-566.
- Arias, M. C. and Sheppard, W. S., 2005, Phylogenetic relationships of honey bees (hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data, *Molecular phylogenetics and evolution*, 37, 1, 25-35.
- Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M. and González-Fernández, Á., 2011, Assessment of the evolution of cancer treatment therapies, *Cancers*, 3, 3, 3279-3330.
- Aufschnaiter, A., Kohler, V., Khalifa, S., El-Wahed, A., Du, M., El-Seedi, H. and Büttner, S., 2020, Apitoxin and its components against cancer, neurodegeneration and rheumatoid arthritis: Limitations and possibilities, *Toxins*, 12, 2, 66.
- Baer, D. M., 2004, Critical values for therapeutic drug levels, *MLO: medical laboratory observer*, 36, 13 Suppl, 9.
- Banin Hirata, B. K., Oda, J. M. M., Losi Guembarovski, R., Ariza, C. B., Oliveira, C. E. C. d. and Watanabe, M. A. E., 2014, Molecular markers for breast cancer: Prediction on tumor behavior, *Disease markers*, 2014,
- Banks, B., Dempsey, C. E., Vernon, C. A., Warner, J. A. and Yamey, J., 1990, Anti-inflammatory activity of bee venom peptide 401 (mast cell degranulating peptide) and compound 48/80 results from mast cell degranulation in vivo, *British journal of pharmacology*, 99, 2, 350.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bellik, Y., 2015, Bee venom: Its potential use in alternative medicine, *Anti-infective agents*, 13, 1, 3-16.
- Benton, A. W., Morse, R. A. and Stewart, J. D., 1963, Venom collection from honey bees, *Science*, 142, 3589, 228-230.
- Blondelle, S. E. and Houghten, R. A., 1991, Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogs of melittin, *Biochemistry*, 30, 19, 4671-4678.
- Bogdanov, S., 2016, *The bee venom book*, Switzerland: e-book Bee Product Science,
- Bustin, S., 2002, Invited review quantification of mrna using real-time reverse transcription pcr (rt-pcr): Trends and problems, *Journal of molecular endocrinology*, 29, 23-39.
- Buttel-Reepen, H. v., 1906, *Apistica*, Beiträge zur Systematik, Biologie, sowie zur geschichtlichen und geographischen Verbreitung der Honigbiene, 117-201.
- Caliskan, F., García, B. I., Coronas, F. I., Batista, C. V., Zamudio, F. Z. and Possani, L. D., 2006, Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of turkey: Peptides and genes, *Toxicon*, 48, 1, 12-22.
- Caliskan, F., Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Batista, C., Zamudio, F., Coronas, F. and Possani, L., 2012, Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: General characterization of the venom and description of bu1, a potent mammalian  $Na^+$ -channel  $\alpha$ -toxin, *Toxicon*, 59, 3, 408-415.
- Camargo, A. C., Ianzer, D., Guerreiro, J. R. and Serrano, S. M., 2012, Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril, *Toxicon*, 59, 4, 516-523.
- Carlson, E. E., 2010, Natural products as chemical probes, *ACS chemical biology*, 5, 7, 639-653.
- Carpaena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez, A. and Simal-Gandara, J., 2020, Bee venom: An updating review of its bioactive molecules and its health applications, *Nutrients*, 12, 11, 3360.
- Cecchini, M. J., Amiri, M. and Dick, F. A., 2012, Analysis of cell cycle position in mammalian cells, *Journal of visualized experiments: JoVE*, 59,
- Ceremuga, M., Stela, M., Janik, E., Gorniak, L., Synowiec, E., Sliwinski, T., Sitarek, P., Saluk-Bijak, J. and Bijak, M., 2020, Melittin—a natural peptide from bee venom which induces apoptosis in human leukaemia cells, *Biomolecules*, 10, 2, 247.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chao, Y. L., Shepard, C. R. and Wells, A., 2010, Breast carcinoma cells re-express e-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition, *Molecular cancer*, 9, 1, 1-18.
- Chavez-MacGregor, M., Mittendorf, E. A., Clarke, C. A., Lichtensztajn, D. Y., Hunt, K. K. and Giordano, S. H., 2017, Incorporating tumor characteristics to the american joint committee on cancer breast cancer staging system, *The oncologist*, 22, 11, 1292.
- Chen, Q., Wang, M. and Shen, C., 2020, Baueraene induces s-phase cell cycle arrest, apoptosis, and inhibition of proliferation of a549 human lung cancer cells through the phosphoinositide 3-kinase (pi3k)/akt and signal transducer and activator of transcription 3 (stat3) signaling pathway, *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 26, e919558-919551.
- Chen, T. and Wong, Y.-S., 2008, Selenocystine induces s-phase arrest and apoptosis in human breast adenocarcinoma mcf-7 cells by modulating erk and akt phosphorylation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 22, 10574-10581.
- Cho, E. Y., Chang, M. H., La Choi, Y., Lee, J. E., Nam, S. J., Yang, J.-H., Park, Y. H., Ahn, J. S. and Im, Y.-H., 2011, Potential candidate biomarkers for heterogeneity in triple-negative breast cancer (tnbc), *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68, 3, 753-761.
- Cho, H.-J., Jeong, Y.-J., Park, K.-K., Park, Y.-Y., Chung, I.-K., Lee, K.-G., Yeo, J.-H., Han, S.-M., Bae, Y.-S. and Chang, Y.-C., 2010, Bee venom suppresses pma-mediated mmp-9 gene activation via jnk/p38 and nf- $\kappa$ b-dependent mechanisms, *Journal of ethnopharmacology*, 127, 3, 662-668.
- Choi, K. E., Hwang, C. J., Gu, S. M., Park, M. H., Kim, J. H., Park, J. H., Ahn, Y. J., Kim, J. Y., Song, M. J. and Song, H. S., 2014, Cancer cell growth inhibitory effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and inactivation of nf-kappa b in nsccl cells, *Toxins*, 6, 8, 2210-2228.
- Chu, S.-T., Cheng, H.-H., Huang, C.-J., Chang, H.-C., Chi, C.-C., Su, H.-H., Hsu, S.-S., Wang, J.-L., Chen, I.-S. and Liu, S.-I., 2007, Phospholipase a2-independent ca<sup>2+</sup> entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human mg63 osteosarcoma cells, *Life sciences*, 80, 4, 364-369.
- Danforth, B. N., Cardinal, S., Praz, C., Almeida, E. A. and Michez, D., 2013, The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution, *Annual review of Entomology*, 58, 57-78.
- Danneels, E. L., Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B. and De Graaf, D. C., 2015, Honeybee venom proteome profile of queens and winter bees as determined by a mass spectrometric approach, *Toxins*, 7, 11, 4468-4483.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- de Graaf, D. C., Brochetto Braga, M. R., de Abreu, R. M. M., Blank, S., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., Devreese, B., Ebo, D. G., Ferris, T. J. and Hagendorens, M. M., 2021, Standard methods for apis mellifera venom research, *Journal of Apicultural Research*, 1-31.
- De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I. and Serrano, J., 2009, Biodiversity, conservation and current threats to european honeybees, *Apidologie*, 40, 3, 263-284.
- de la Torre, B. G. and Albericio, F., 2020, The pharmaceutical industry in 2019. An analysis of fda drug approvals from the perspective of molecules, *Molecules*, 25, 3, 745.
- Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A. and von Minckwitz, G., 2017, Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies, *The Lancet*, 389, 10087, 2430-2442.
- Dias, D. A., Urban, S. and Roessner, U., 2012, A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites*, 2, 2, 303-336.
- Diego-García, E., Schwartz, E. F., D'Suze, G., González, S. A. R., Batista, C. V., García, B. I., de la Vega, R. C. R. and Possani, L. D., 2007, Wide phylogenetic distribution of scorpine and long-chain  $\beta$ -ktx-like peptides in scorpion venoms: Identification of “orphan” components, *Peptides*, 28, 1, 31-37.
- Dilalla, V., Chaput, G., Williams, T. and Sultanem, K., 2020, Radiotherapy side effects: Integrating a survivorship clinical lens to better serve patients, *Current Oncology*, 27, 2, 107.
- Donepudi, M. S., Kondapalli, K., Amos, S. J. and Venkanteshan, P., 2014, Breast cancer statistics and markers, *Journal of cancer research and therapeutics*, 10, 3, 506.
- El-Aouar Filho, R. A., Nicolas, A., De Paula Castro, T. L., Deplanche, M., De Carvalho Azevedo, V. A., Goossens, P. L., Taieb, F., Lina, G., Le Loir, Y. and Berkova, N., 2017, Heterogeneous family of cyclomodulins: Smart weapons that allow bacteria to hijack the eukaryotic cell cycle and promote infections, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 208.
- Elkinson, S. and Keating, G. M., 2013, Lixisenatide: First global approval, *Drugs*, 73, 4, 383-391.
- Elrayess, R. A. and El-Hak, H. N. G., 2019, Anticancer natural products: A review, *Cancer Stud Mol Med Open J*, 5, 1, 14-25.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eng, J., Kleinman, W. A., Singh, L., Singh, G. and Raufman, J.-P., 1992, Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from heloderma suspectum venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas, *Journal of Biological Chemistry*, 267, 11, 7402-7405.
- Engel, M. S., 1999, The taxonomy of recent and fossil honey bees (hymenoptera: Apidae; apis),
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A. and Lluch, A., 2012, Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways, *Cancer treatment reviews*, 38, 6, 698-707.
- Falck, J., Petrini, J. H., Williams, B. R., Lukas, J. and Bartek, J., 2002, The DNA damage-dependent intra-s phase checkpoint is regulated by parallel pathways, *Nature genetics*, 30, 3, 290-294.
- Fan, Q., Hu, Y., Pang, H., Sun, J., Wang, Z. and Li, J., 2014, Melittin protein inhibits the proliferation of mg63 cells by activating inositol-requiring protein-1 $\alpha$  and x-box binding protein 1-mediated apoptosis, *Molecular medicine reports*, 9, 4, 1365-1370.
- Fang, Z., Lin, M., Li, C., Liu, H. and Gong, C., 2020, A comprehensive review of the roles of e2f1 in colon cancer, *American journal of cancer research*, 10, 3, 757.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F. and al., e., 2020a, [gco.iarc.fr/today](http://gco.iarc.fr/today) 01.04.2021
- Ferlay, J., Laversanne, M., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I. and Bray, F., 2020b, <https://gco.iarc.fr/tomorrow>, 01.04.2021
- Ferreira, S. H., Bartelt, D. C. and Greene, L. J., 1970, Isolation of bradykinin-potentiating peptides from bothrops jararaca venom, *Biochemistry*, 9, 13, 2583-2593.
- Ferzoco, R. M. and Ruddy, K. J., 2016, The epidemiology of male breast cancer, *Current oncology reports*, 18, 1, 1.
- Foulkes, W. D., Smith, I. E. and Reis-Filho, J. S., 2010, Triple-negative breast cancer, *New England journal of medicine*, 363, 20, 1938-1948.
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B., Hepburn, H., Solignac, M. and Cornuet, J.-M., 2001, Genetic diversity of the honeybee in africa: Microsatellite and mitochondrial data, *Heredity*, 86, 4, 420-430.
- Frangieh, J., Salma, Y., Haddad, K., Mattei, C., Legros, C., Fajloun, Z. and El Obeid, D., 2019, First characterization of the venom from apis mellifera syriaca, a honeybee from the middle east region, *Toxins*, 11, 4, 191.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fraser, S. P., Diss, J. K., Chioni, A.-M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M. and Grzywna, Z., 2005, Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis, *Clinical cancer research*, 11, 15, 5381-5389.
- Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D., King, G. F., Nevalainen, T. J., Norman, J. A., Lewis, R. J. and Norton, R. S., 2009, The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms, *Annual review of genomics and human genetics*, 10, 483-511.
- Fuchs, S., Çakmak, S. S., Koca, A. Ö., Nentchev, P. and Kandemir, İ., 2015, Morphometric analysis of honeybees distributed in northern turkey along the black sea coast,
- Furman, B. L., 2012, The development of byetta (exenatide) from the venom of the gila monster as an anti-diabetic agent, *Toxicon*, 59, 4, 464-471.
- Gajski, G. and Garaj-Vrhovac, V., 2009, Radioprotective effects of honeybee venom (*apis mellifera*) against 915-mhz microwave radiation–induced DNA damage in wistar rat lymphocytes: In vitro study, *International journal of toxicology*, 28, 2, 88-98.
- Gajski, G. and Garaj-Vrhovac, V., 2013, Melittin: A lytic peptide with anticancer properties, *Environmental toxicology and pharmacology*, 36, 2, 697-705.
- Galkina Cleary, E., Beierlein, J. M., Khanuja, N. S., McNamee, L. M. and Ledley, F. D., 2018, Contribution of nih funding to new drug approvals 2010-2016, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 10, 2329-2334.
- Gan, Z., Gould, R., Jacobs, J. W., Friedman, P. and Polokoff, M., 1988, Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *echis carinatus*, *Journal of Biological Chemistry*, 263, 36, 19827-19832.
- Goetze, G., 1940, *Beste biene*,
- Guler, A., 2010, A morphometric model for determining the effect of commercial queen bee usage on the native honeybee (*apis mellifera l.*) population in a turkish province, *Apidologie*, 41, 6, 622-635.
- Habermann, E., 1972, Bee and wasp venoms, *Science*, 177, 4046, 314-322.
- Hait, W. N., Grais, L., Benz, C. and Cadman, E. C., 1985, Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: Phenothiazines and melittin, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 14, 3, 202-205.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J. N., Sweep, F. C. G., Taube, S., Torlakovic, E. E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R. B., Wittliff, J. L. and Wolff, A. C., 2010, American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 28, 16, 2784-2795.
- Han, F., Wallberg, A. and Webster, M. T., 2012, From where did the western honeybee (*Apis mellifera*) originate?, *Ecology and evolution*, 2, 8, 1949-1957.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A., 2000, The hallmarks of cancer, *cell*, 100, 1, 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A., 2011, Hallmarks of cancer: The next generation, *cell*, 144, 5, 646-674.
- Hanahan, D., 2014, Rethinking the war on cancer, *The Lancet*, 383, 9916, 558-563.
- Harris, J., Lippman, M. and Morrow, M., 2014, Pathology of invasive breast cancer, *Journal*, Issue,
- Hegde, P. S. and Chen, D. S., 2020, Top 10 challenges in cancer immunotherapy, *Immunity*, 52, 1, 17-35.
- Herzig, V., Cristofori-Armstrong, B., Israel, M. R., Nixon, S. A., Vetter, I. and King, G. F., 2020, Animal toxins—nature’s evolutionary-refined toolkit for basic research and drug discovery, *Biochemical pharmacology*, 114096.
- Hu, H., Chen, D., Li, Y. and Zhang, X., 2006, Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line smmc-7721 in-vitro and balb/c nude mice in-vivo, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 58, 1, 83-89.
- Huh, J.-E., Baek, Y.-H., Lee, M.-H., Choi, D.-Y., Park, D.-S. and Lee, J.-D., 2010, Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of vegfr-2 in llc-tumor-bearing mice, *Cancer letters*, 292, 1, 98-110.
- Huh, J.-E., Kang, J. W., Nam, D., Baek, Y.-H., Choi, D.-Y., Park, D.-S. and Lee, J.-D., 2012, Melittin suppresses vegf-a-induced tumor growth by blocking vegfr-2 and the cox-2-mediated mapk signaling pathway, *Journal of natural products*, 75, 11, 1922-1929.
- Ip, S.-W., Liao, S.-S., Lin, S.-Y., Lin, J.-P., Yang, J.-S., Lin, M.-L., Chen, G.-W., Lu, H.-F., Lin, M.-W. and Han, S.-M., 2008a, The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer mcf7 cells, *In Vivo*, 22, 2, 237-245.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ip, S.-W., Wei, H.-C., Lin, J.-P., Kuo, H.-M., Liu, K.-C., Hsu, S.-C., Yang, J.-S., YANG, M.-D., Chiu, T.-H. and Han, S.-M., 2008b, Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma ca ski cells, *Anticancer research*, 28, 2A, 833-842.
- Jang, M.-H., Shin, M.-C., Lim, S., Han, S.-M., Park, H.-J., Shin, I., Lee, J.-S., Kim, K.-A., Kim, E.-H. and Kim, C.-J., 2003, Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mrna in human lung cancer cell line nci-h1299, *Journal of pharmacological sciences*, 91, 2, 95-104.
- Jeong, Y.-J., Cho, H.-J., Whang, K., Lee, I.-S., Park, K.-K., Choe, J.-Y., Han, S.-M., Kim, C.-H., Chang, H.-W. and Moon, S.-K., 2012, Melittin has an inhibitory effect on tnf- $\alpha$ -induced migration of human aortic smooth muscle cells by blocking the mmp-9 expression, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 11, 3996-4002.
- Jeong, Y.-J., Choi, Y., Shin, J.-M., Cho, H.-J., Kang, J.-H., Park, K.-K., Choe, J.-Y., Bae, Y.-S., Han, S.-M. and Kim, C.-H., 2014, Melittin suppresses egf-induced cell motility and invasion by inhibiting pi3k/akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells, *Food and Chemical Toxicology*, 68, 218-225.
- Jin-Jian, L. and Yi-Tao, W., 2020, Identification of anti-cancer compounds from natural products, *Journal*, Issue,
- Jo, M., Park, M. H., Kollipara, P. S., An, B. J., Song, H. S., Han, S. B., Kim, J. H., Song, M. J. and Hong, J. T., 2012, Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of jak2/stat3 pathway, *Toxicology and applied pharmacology*, 258, 1, 72-81.
- Joshi, H. and Press, M. F., 2018, Molecular oncology of breast cancer, *Journal*, Issue, 282-307. e285.
- Kandemir, I., Kence, M. and Kence, A., 2000, Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of turkey, *Apidologie*, 31, 3, 343-356.
- Kence, A., 2006, Genetic diversity of honey bees in turkey and the importance of its conservation, *u, Bee J*, 6, 25-32.
- Kim, D.-H., Lee, H.-W., Park, H.-W., Lee, H.-W. and Chun, K.-H., 2020, Bee venom inhibits the proliferation and migration of cervical-cancer cells in an hpv e6/e7-dependent manner, *BMB reports*, 53, 8, 419.
- King, G. F., 2011, Venoms as a platform for human drugs: Translating toxins into therapeutics, *Expert opinion on biological therapy*, 11, 11, 1469-1484.
- King, S., Short, M. and Harmon, C., 2016, Glycoprotein iib/iiia inhibitors: The resurgence of tirofiban, *Vascular pharmacology*, 78, 10-16.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Klein, A.-M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C. and Tscharntke, T., 2007, Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274, 1608, 303-313.
- Koca, A. Ö. and Kandemir, I., 2013, Comparison of two morphometric methods for discriminating honey bee (*apis mellifera* l.) populations in turkey, *Turkish Journal of Zoology*, 37, 2, 205-210.
- Kohno, M., Horibe, T., Ohara, K., Ito, S. and Kawakami, K., 2014, The membrane-lytic peptides k819 and melittin enter cancer cells via receptor endocytosis following subcytotoxic exposure, *Chemistry & biology*, 21, 11, 1522-1532.
- Kokkinos, M. I., Wafai, R., Wong, M. K., Newgreen, D. F., Thompson, E. W. and Waltham, M., 2007, Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer—observations in vitro and in vivo, *Cells Tissues Organs*, 185, 1-3, 191-203.
- Kokot, Z. J. and Matysiak, J., 2009, Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by lc-dad, *Chromatographia*, 69, 11, 1401-1405.
- Kollipara, P. S., Kim, J. H., Won, D., Lee, S. M., Sung, H. C., Chang, H. S., Lee, K. T., Lee, K. S., Park, M. H. and Song, M. J., 2014, Co-culture with nk-92mi cells enhanced the anti-cancer effect of bee venom on nsccl cells by inactivation of nf- $\kappa$ b, *Archives of pharmacal research*, 37, 3, 379-389.
- Kong, G.-M., Tao, W.-H., Diao, Y.-L., Fang, P.-H., Wang, J.-J., Bo, P. and Qian, F., 2016, Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway, *World journal of gastroenterology*, 22, 11, 3186.
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M. and Dolznig, H., 2013, In vitro cell migration and invasion assays, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 752, 1, 10-24.
- Kwan, Y. P., Saito, T., Ibrahim, D., Al-Hassan, F. M. S., Ein Oon, C., Chen, Y., Jothy, S. L., Kanwar, J. R. and Sasidharan, S., 2016, Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by *euphorbia hirta* in mcf-7 breast cancer cells, *Pharmaceutical biology*, 54, 7, 1223-1236.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. and Weinberg, R. A., 2017, Emerging biological principles of metastasis, *cell*, 168, 4, 670-691.
- Lazebnik, Y., 2010, What are the hallmarks of cancer?, *Nature Reviews Cancer*, 10, 4, 232-233.
- Lee, K. S., Kim, B. Y., Yoon, H. J., Choi, Y. S. and Jin, B. R., 2016, Secapin, a bee venom peptide, exhibits anti-fibrinolytic, anti-elastolytic, and anti-microbial activities, *Developmental & Comparative Immunology*, 63, 27-35.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, R., Zhang, L., Fang, Y., Han, B., Lu, X., Zhou, T., Feng, M. and Li, J., 2013, Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (*apis mellifera*) venom collected from electrical stimulation and manual extraction of the venom gland, *BMC genomics*, 14, 1, 1-13.
- Lim, H. N., Baek, S. B. and Jung, H. J., 2019, Bee venom and its peptide component melittin suppress growth and migration of melanoma cells via inhibition of pi3k/akt/mtor and mapk pathways, *Molecules*, 24, 5, 929.
- Lim, S. and Kaldis, P., 2013, Cdks, cyclins and ckis: Roles beyond cell cycle regulation, *Development*, 140, 15, 3079-3093.
- Linz, W., Wiemer, G., Gohlke, P., Unger, T. and Schölkens, B., 1995, Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors, *Pharmacological reviews*, 47, 1, 25-49.
- Liu, C.-c., Hao, D.-j., Zhang, Q., An, J., Zhao, J.-j., Chen, B., Zhang, L.-l. and Yang, H., 2016, Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 78, 6, 1113-1130.
- Liu, S., Yu, M., He, Y., Xiao, L., Wang, F., Song, C., Sun, S., Ling, C. and Xu, Z., 2008, Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the rac1-dependent pathway, *Hepatology*, 47, 6, 1964-1973.
- Liu, X., Chen, D., Xie, L. and Zhang, R., 2002, Effect of honey bee venom on proliferation of k1735m2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine b16 melanomas in-vivo, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 54, 8, 1083-1089.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the  $2^{-\delta\delta ct}$  method, *methods*, 25, 4, 402-408.
- Mahmoodzadeh, A., Zarrinnahad, H., Bagheri, K. P., Moradia, A. and Shahbazzadeh, D., 2015, First report on the isolation of melittin from iranian honey bee venom and evaluation of its toxicity on gastric cancer ags cells, *Journal of the Chinese Medical Association*, 78, 10, 574-583.
- Marino-Enriquez, A. and Fletcher, C. D., 2014, Shouldn't we care about the biology of benign tumours?, *Nature Reviews Cancer*, 14, 11, 701-702.
- Markovic, O. and Mollnar, L., 1954, Isolation of and determination of bee venom, *Chemicke Zvesti*, 8, 80-90.
- Marković-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P. J., Müller, U. and Schirmer, T., 2000, Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom, *Structure*, 8, 10, 1025-1035.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Markwardt, F., 1955, Untersuchungen über hirudin, *Naturwissenschaften*, 42, 19, 537-538.
- Matsui, T., Kamata, S., Ishii, K., Maruno, T., Ghanem, N., Uchiyama, S., Kato, K., Suzuki, A., Oda-Ueda, N. and Ogawa, T., 2019, Sds-induced oligomerization of lys49-phospholipase a 2 from snake venom, *Scientific reports*, 9, 1, 1-8.
- Matsuoka, S., Huang, M. and Elledge, S. J., 1998, Linkage of atm to cell cycle regulation by the chk2 protein kinase, *Science*, 282, 5395, 1893-1897.
- McGivern, J. G., 2007, Ziconotide: A review of its pharmacology and use in the treatment of pain, *Neuropsychiatric disease and treatment*, 3, 1, 69.
- Meirson, T., Gil-Henn, H. and Samson, A. O., 2020, Invasion and metastasis: The elusive hallmark of cancer, *Oncogene*, 39, 9, 2024-2026.
- Michener, C., 2007, *The bees of the world*. Baltimore-london: J. Hopkins univ. Press. 953 p,
- Miguel, I., Baylac, M., Iriando, M., Manzano, C., Garnery, L. and Estonba, A., 2011, Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *apis mellifera* m evolutionary branch, *Apidologie*, 42, 2, 150-161.
- Mishra, A. and Verma, M., 2010, Cancer biomarkers: Are we ready for the prime time?, *Cancers*, 2, 1, 190-208.
- Moon, D.-O., Park, S.-Y., Heo, M.-S., Kim, K.-C., Park, C., Ko, W. S., Choi, Y. H. and Kim, G.-Y., 2006, Key regulators in bee venom-induced apoptosis are bcl-2 and caspase-3 in human leukemic u937 cells through downregulation of erk and akt, *International immunopharmacology*, 6, 12, 1796-1807.
- Moon, D.-O., Park, S.-Y., Choi, Y. H., Kim, N. D., Lee, C. and Kim, G.-Y., 2008, Melittin induces bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of akt phosphorylation in human leukemic u937 cells, *Toxicon*, 51, 1, 112-120.
- Moreno, M. and Giralt, E., 2015, Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan, *Toxins*, 7, 4, 1126-1150.
- Morgenstern, D. and King, G. F., 2013, The venom optimization hypothesis revisited, *Toxicon*, 63, 120-128.
- Morse, D. L., Carroll, D., Weberg, L., Borgstrom, M. C., Ranger-Moore, J. and Gillies, R. J., 2005, Determining suitable internal standards for mrna quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, *Analytical biochemistry*, 342, 1, 69-77.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M. and Sabatier, J.-M., 2004, Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels, *Biochemical Journal*, 378, 3, 717-726.
- Mourre, C., Fournier, C. and Soumireu-Mourat, B., 1997, Apamin, a blocker of the calcium-activated potassium channel, induces neurodegeneration of purkinje cells exclusively, *Brain research*, 778, 2, 405-408.
- Munos, B., 2009, Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation, *Nat Rev Drug Discov*, 8, 12, 959-968.
- Nakhjavani, M. and Shirazi, F. H., 2017, Reporting the effect of cell seeding density on growth pattern of cancer cell lines, *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 2, 87-94.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M., 2016, Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014, *Journal of natural products*, 79, 3, 629-661.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M., 2020, Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019, *Journal of natural products*, 83, 3, 770-803.
- NIH, 2020, <https://www.nih.gov/>, 01.02.2021
- Nouvian, M., Reinhard, J. and Giurfa, M., 2016, The defensive response of the honeybee *apis mellifera*, *J Exp Biol*, 219, Pt 22, 3505-3517.
- Nyegaard, S., Christensen, B. and Rasmussen, J. T., 2016, An optimized method for accurate quantification of cell migration using human small intestine cells, *Metabolic Engineering Communications*, 3, 76-83.
- Ondetti, M. A., Rubin, B. and Cushman, D. W., 1977, Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents, *Science*, 196, 4288, 441-444.
- Orlowski, R. Z. and Baldwin Jr, A. S., 2002, Nf- $\kappa$ b as a therapeutic target in cancer, *Trends in molecular medicine*, 8, 8, 385-389.
- Oršolić, N., Šver, L., Verstovšek, S., Terzić, S. and Bašić, I., 2003, Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom, *Toxicon*, 41, 7, 861-870.
- Oršolić, N., 2012, Bee venom in cancer therapy, *Cancer and metastasis reviews*, 31, 1, 173-194.
- Owen, M. D., 1978, Venom replenishment, as indicated by histamine, in honey bee (*apis mellifera*) venom, *Journal of Insect Physiology*, 24, 5, 433-437.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özkırım, A., 2018, Beekeeping in turkey: Bridging asia and europe, Journal, Issue, 41-69.
- Park, J. H., Jeong, Y.-J., Park, K.-K., Cho, H.-J., Chung, I.-K., Min, K.-S., Kim, M., Lee, K.-G., Yeo, J.-H. and Park, K.-K., 2010, Melittin suppresses pma-induced tumor cell invasion by inhibiting nf- $\kappa$ b and ap-1-dependent mmp-9 expression, *Molecules and cells*, 29, 2, 209-215.
- Park, M. H., Choi, M. S., Kwak, D. H., Oh, K. W., Yoon, D. Y., Han, S. B., Song, H. S., Song, M. J. and Hong, J. T., 2011, Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of nf- $\kappa$ b, *The Prostate*, 71, 8, 801-812.
- Peeler, D. J., Thai, S. N., Cheng, Y., Horner, P. J., Sellers, D. L. and Pun, S. H., 2019, Ph-sensitive polymer micelles provide selective and potentiated lytic capacity to venom peptides for effective intracellular delivery, *Biomaterials*, 192, 235-244.
- Pennington, M. W., Czerwinski, A. and Norton, R. S., 2018, Peptide therapeutics from venom: Current status and potential, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26, 10, 2738-2758.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H. and Akslen, L. A., 2000, Molecular portraits of human breast tumours, *nature*, 406, 6797, 747-752.
- Petros, S., 2008, Lepirudin in the management of patients with heparin-induced thrombocytopenia, *Biologics: targets & therapy*, 2, 3, 481.
- Pezzella, F., Tavassoli, M. and Kerr, D. J., 2019, *Oxford textbook of cancer biology*, City: Oxford University Press.
- Piccart-Gebhart, M., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R. and Jackisch, C., 2005, The herceptin adjuvant trial study t, 2005. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in her2-positive breast cancer, *N. Engl. J. Med*, 353,
- Prashanth, J. R., Hasaballah, N. and Vetter, I., 2017, Pharmacological screening technologies for venom peptide discovery, *Neuropharmacology*, 127, 4-19.
- Prat, A. and Perou, C. M., 2011, Deconstructing the molecular portraits of breast cancer, *Molecular oncology*, 5, 1, 5-23.
- Pucca, M. B., Cerni, F. A., Oliveira, I. S., Jenkins, T. P., Argemí, L., Sørensen, C. V., Ahmadi, S., Barbosa, J. E. and Laustsen, A. H., 2019, Bee updated: Current knowledge on bee venom and bee envenoming therapy, *Frontiers in immunology*, 10, 2090.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Rady, I., Siddiqui, I. A., Rady, M. and Mukhtar, H., 2017, Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy, *Cancer letters*, 402, 16-31.
- Raffiudin, R. and Crozier, R. H., 2007, Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution, *Molecular phylogenetics and evolution*, 43, 2, 543-552.
- Raghuraman, H. and Chattopadhyay, A., 2007, Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions, *Bioscience reports*, 27, 4-5, 189-223.
- Ramnath, N., Khushalani, N., Toth, K., Litwin, A., Intengan, M., Slocum, H., Pendyala, L., Smith, P., Stewart, C. and Hoffman, J., 2005, S-phase modulation by irinotecan: Pilot studies in advanced solid tumors, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 56, 5, 447-454.
- Repetto, G., Del Peso, A. and Zurita, J. L., 2008, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nature protocols*, 3, 7, 1125.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D. and Barreda, D. R., 2011, Modified annexin v/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death, *Journal of visualized experiments: JoVE*, 50,
- Romano, J. D. and Tatonetti, N. P., 2019, Informatics and computational methods in natural product drug discovery: A review and perspectives, *Frontiers in genetics*, 10, 368.
- Ruttner, F., Tassencourt, L. and Louveaux, J., 1978, Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *apis mellifera* l.
- Ruttner, F., 1988, *Biogeography and taxonomy of honeybees* springer, Berlin, Germany.
- Ruttner, F., 1992, *Naturgeschichte der honigbienen*, ehrenwirth, munich.
- Sanad, R. E. and Mohanny, K. M., 2013, The efficacy of a new modified apparatus for collecting bee venom in relation to some biological aspects of honey bee colonies, *J. Am. Sci*, 9, 10, 177-182.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K. and Linn, S., 2004, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annual review of biochemistry*, 73, 1, 39-85.
- Sangboonruang, S., Kitidee, K., Chantawannakul, P., Tragoolpua, K. and Tragoolpua, Y., 2020, Melittin from *apis florea* venom as a promising anticancer agent, *Antibiotics*, 9, 8, 517.
- Satelli, A. and Li, S., 2011, Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Cellular and molecular life sciences*, 68, 18, 3033-3046.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Scarborough, R. M., Naughton, M. A., Teng, W., Rose, J., Phillips, D., Nannizzi, L., Arfsten, A., Campbell, A. and Charo, I., 1993, Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein iib-iiia, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 2, 1066-1073.
- Schägger, H., 2006, Tricine-sds-page, *Nature protocols*, 1, 1, 16.
- Schendel, V., Rash, L. D., Jenner, R. A. and Undheim, E. A., 2019, The diversity of venom: The importance of behavior and venom system morphology in understanding its ecology and evolution, *Toxins*, 11, 11, 666.
- Schönthal, A. H., 2004, *Checkpoint controls and cancer*, City: Springer.
- Schweizer, F., 2009, Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity, *European journal of pharmacology*, 625, 1-3, 190-194.
- Selli, C., Erac, Y. and Tosun, M., 2016, Effects of cell seeding density on real-time monitoring of anti-proliferative effects of transient gene silencing, *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 23, 1, 1-8.
- Shan, B. and Lee, W.-H., 1994, Deregulated expression of e2f-1 induces s-phase entry and leads to apoptosis, *Molecular and cellular biology*, 14, 12, 8166-8173.
- Shats, I., Deng, M., Davidovich, A., Zhang, C., Kwon, J. S., Manandhar, D., Gordân, R., Yao, G. and You, L., 2017, Expression level is a key determinant of e2f1-mediated cell fate, *Cell Death & Differentiation*, 24, 4, 626-637.
- Sheppard, W. S. and Meixner, M. D., 2003, *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from central asia, *Apidologie*, 34, 4, 367-375.
- Shin, J.-M., Jeong, Y.-J., Cho, H.-J., Park, K.-K., Chung, I.-K., Lee, I.-K., Kwak, J.-Y., Chang, H.-W., Kim, C.-H. and Moon, S.-K., 2013, Melittin suppresses hif-1 $\alpha$ /vegf expression through inhibition of erk and mtor/p70s6k pathway in human cervical carcinoma cells, *PloS one*, 8, 7, e69380.
- Shkenderov, S. and Koburova, K., 1982, Adolapin-a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom, *Toxicon*, 20, 1, 317-321.
- Shoemaker, R. H., 2006, The nci60 human tumour cell line anticancer drug screen, *Nature Reviews Cancer*, 6, 10, 813-823.
- Shu, Y., Yang, Y., Zhao, Y., Ma, L., Fu, P., Wei, T. and Zhang, L., 2019, Melittin inducing the apoptosis of renal tubule epithelial cells through upregulation of bax/bcl-2 expression and activation of tnf- $\alpha$  signaling pathway, *BioMed research international*, 2019.
- Sıralı, R., 2017, Anadolu arısı (*apis mellifera anatoliaca*)'nın bazı önemli özellikleri, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 17, 2, 82-92.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R., 1990, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82, 13, 1107-1112.
- Skern, R., Frost, P. and Nilsen, F., 2005, Relative transcript quantification by quantitative PCR: Roughly right or precisely wrong?, *BMC molecular biology*, 6, 1, 1-3.
- Smith, D., Slaymaker, A., Palmer, M. and Kaftanoğlu, O., 1997, Turkish honey bees belong to the east mediterranean mitochondrial lineage, *Apidologie*, 28, 5, 269-274.
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. and Gillespie, D. A., 2010, The atm–chk2 and atr–chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer, *Advances in cancer research*, 108, 73-112.
- Sobral, F., Sampaio, A., Falcão, S., Queiroz, M. J. R., Calhelha, R. C., Vilas-Boas, M. and Ferreira, I. C., 2016, Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in northeast Portugal, *Food and Chemical Toxicology*, 94, 172-177.
- Soliman, C., Eastwood, S., Truong, V. K., Ramsland, P. A. and Elbourne, A., 2019, The membrane effects of melittin on gastric and colorectal cancer, *PloS one*, 14, 10, e0224028.
- Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. K. and Hong, J. T., 2007, Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds, *Pharmacology & therapeutics*, 115, 2, 246-270.
- Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R. and Geisler, S., 2003, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *Proceedings of the national academy of sciences*, 100, 14, 8418-8423.
- Strouhalova, K., Přečková, M., Gandalovičová, A., Brábek, J., Gregor, M. and Rosel, D., 2020, Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment, *Cancers*, 12, 1, 184.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F., 2021, Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries., *CA Cancer J Clin.*, DF-1.6.
- Talmadge, J. E. and Fidler, I. J., 2010, Aacr centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective, *Cancer research*, 70, 14, 5649-5669.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Teoh, A. C. L., Ryu, K.-H. and Lee, E. G., 2017, One-step purification of melittin derived from *apis mellifera* bee venom, *Journal of microbiology and biotechnology*, 27, 1, 84-91.
- Tipgomut, C., Wongprommoon, A., Takeo, E., Ittiudomrak, T., Puthong, S. and Chanchao, C., 2018, Melittin induced g1 cell cycle arrest and apoptosis in chago-k1 human bronchogenic carcinoma cells and inhibited the differentiation of thp-1 cells into tumour-associated macrophages, *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 19, 12, 3427.
- Toledo, L. F. M. d., Moore, D. C. B. C., Caixeta, D. M. d. L., Salú, M. d. S., Farias, C. V. B. and Azevedo, Z. M. A. d., 2018, Multiple bee stings, multiple organs involved: A case report, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51, 4, 560-562.
- Tong, Y. and Deng, Z., 2020, An aurora of natural products-based drug discovery is coming, *Synth Syst Biotechnol*, 5, 2, 92-96.
- Tozkar, C. Ö., Kence, M., Kence, A., Huang, Q. and Evans, J. D., 2015, Metatranscriptomic analyses of honey bee colonies, *Frontiers in genetics*, 6, 100.
- Tu, W.-C., Wu, C.-C., Hsieh, H.-L., Chen, C.-Y. and Hsu, S.-L., 2008, Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma a2058 cells, *Toxicon*, 52, 2, 318-329.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. and Rozen, S. G., 2012, Primer3—new capabilities and interfaces, *Nucleic acids research*, 40, 15, e115-e115.
- Van Den Heuvel, S. and Dyson, N. J., 2008, Conserved functions of the prb and e2f families, *Nature reviews Molecular cell biology*, 9, 9, 713-724.
- van Horssen, R., Ten Hagen, T. L. and Eggermont, A. M., 2006, *Tnf- $\alpha$*  in cancer treatment: Molecular insights, antitumor effects, and clinical utility, *The oncologist*, 11, 4, 397-408.
- Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B. and de Graaf, D. C., 2014, Exploring the hidden honeybee (*apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with ftms, *Journal of proteomics*, 99, 169-178.
- Vermes, I., Haanen, C. and Reutelingsperger, C., 2000, Flow cytometry of apoptotic cell death, *Journal of immunological methods*, 243, 1-2, 167-190.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N., 2003, The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell proliferation*, 36, 3, 131-149.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Vetter, I., Davis, J. L., Rash, L. D., Anangi, R., Mobli, M., Alewood, P. F., Lewis, R. J. and King, G. F., 2011, Venomics: A new paradigm for natural products-based drug discovery, *Amino acids*, 40, 1, 15-28.
- Vichai, V. and Kirtikara, K., 2006, Sulforhodamine b colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nature protocols*, 1, 3, 1112.
- Waks, A. G. and Winer, E. P., 2019, Breast cancer treatment: A review, *Jama*, 321, 3, 288-300.
- Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., Dahle, B., Kawata, M., Haddad, N., Simões, Z. L. P., Allsopp, M. H., Kandemir, I. and De la Rúa, P., 2014, A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *apis mellifera*, *Nature genetics*, 46, 10, 1081-1088.
- Wang, C., Chen, T., Zhang, N., Yang, M., Li, B., Lü, X., Cao, X. and Ling, C., 2009, Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (trail)-induced apoptosis by activating camkii-tak1-jnk/p38 and inhibiting  $\text{ikb}\alpha$  kinase-nfkb, *Journal of Biological Chemistry*, 284, 6, 3804-3813.
- Wang, J., Wiltshire, T., Wang, Y., Mikell, C., Burks, J., Cunningham, C., Van Laar, E. S., Waters, S. J., Reed, E. and Wang, W., 2004, Atm-dependent chk2 activation induced by anticancer agent, irifolven, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 38, 39584-39592.
- Wang, J., Li, F., Tan, J., Peng, X., Sun, L., Wang, P., Jia, S., Yu, Q., Huo, H. and Zhao, H., 2017, Melittin inhibits the invasion of mcf-7 cells by downregulating cd147 and mmp-9 expression, *Oncology letters*, 13, 2, 599-604.
- Warkentin, T. E., Greinacher, A. and Koster, A., 2008, Bivalirudin, *Thrombosis and haemostasis*, 99, 11, 830-839.
- Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., El Obeid, D., Sabatier, J.-M. and Fajloun, Z., 2019, Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests, *Molecules*, 24, 16, 2997.
- Weinberg, R. A., 2013, *The biology of cancer*, City: Garland science.
- Wlodkowic, D., Skommer, J. and Darzynkiewicz, Z., 2009, Flow cytometry-based apoptosis detection, *Journal*, Issue, 19-32.
- Wolff, A., Hammond, M., Hicks, D., Dowsett, M., McShane, L., Allison, K., Allred, D., Bartlett, J., Bilous, M. and Fitzgibbons, P., 2013, College of american pathologists recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline update, *J Clin Oncol*, 31, 31, 3997-4013.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- World Health Organization, W., 2019, The ninth edition of the international pharmacopoeia.
- World Health Organization, W., 2020, [who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death](http://who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death) 01.04.2021
- Wu, J., Cai, Y., Li, M., Zhang, Y., Li, H. and Tan, Z., 2017, Oxymatrine promotes s-phase arrest and inhibits cell proliferation of human breast cancer cells in vitro through mitochondria-mediated apoptosis, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40, 8, 1232-1239.
- Wu, X., Zhao, B., Cheng, Y., Yang, Y., Huang, C., Meng, X., Wu, B., Zhang, L., Lv, X. and Li, J., 2015, Melittin induces ptc1 expression by down-regulating mec2 in human hepatocellular carcinoma smmc-7721 cells, *Toxicology and applied pharmacology*, 288, 1, 74-83.
- Xu, Z., Zhang, F., Bai, C., Yao, C., Zhong, H., Zou, C. and Chen, X., 2017, Sophoridine induces apoptosis and s phase arrest via ros-dependent jnk and erk activation in human pancreatic cancer cells, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36, 1, 1-10.
- Yuan, Z., Guo, W., Yang, J., Li, L., Wang, M., Lei, Y., Wan, Y., Zhao, X., Luo, N. and Cheng, P., 2015, Pnas-4, an early DNA damage response gene, induces s phase arrest and apoptosis by activating checkpoint kinases in lung cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*, 290, 24, 14927-14944.
- Zalat, S., Abouzeid, A., Ibrahim, A. and Abd El-Aal, A., 2002, Protein pattern of the honeybee venoms of egypt, *Egyptian Journal of Biology*, 4, 1.
- Zarrinnahad, H., Mahmoodzadeh, A., Hamidi, M. P., Mahdavi, M., Moradi, A., Bagheri, K. P. and Shahbazzadeh, D., 2018, Apoptotic effect of melittin purified from iranian honey bee venom on human cervical cancer hela cell line, *International journal of peptide research and therapeutics*, 24, 4, 563-570.
- Zhang, H., Zhao, B., Huang, C., Meng, X.-M., Bian, E.-B. and Li, J., 2014, Melittin restores pten expression by down-regulating hdac2 in human hepatocellular carcinoma hepg2 cells, *PloS one*, 9, 5, e95520.
- Zhang, S., Liu, Y., Ye, Y., Wang, X.-R., Lin, L.-T., Xiao, L.-Y., Zhou, P., Shi, G.-X. and Liu, C.-Z., 2018, Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications, *Toxicon*, 148, 64-73.
- Zhang, Z., Zhang, H., Peng, T., Li, D. and Xu, J., 2016, Melittin suppresses cathepsin s-induced invasion and angiogenesis via blocking of the vegf-a/vegfr-2/mek1/erk1/2 pathway in human hepatocellular carcinoma, *Oncology letters*, 11, 1, 610-618.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Zhao, T., Sun, Q., del Rincon, S. V., Lovato, A., Marques, M. and Witcher, M., 2014, Gallotannin imposes s phase arrest in breast cancer cells and suppresses the growth of triple-negative tumors in vivo, *PloS one*, 9, 3, e92853.
- Zheng, J., Lee, H. L., Ham, Y. W., Song, H. S., Song, M. J. and Hong, J. T., 2015, Anti-cancer effect of bee venom on colon cancer cell growth by activation of death receptors and inhibition of nuclear factor kappa b, *Oncotarget*, 6, 42, 44437.
- Zhu, H., Zhang, L., Wu, S., Teraishi, F., Davis, J. J., Jacob, D. and Fang, B., 2004, Induction of s-phase arrest and p21 overexpression by a small molecule 2 [[3-(2, 3-dichlorophenoxy) propyl] amino] ethanol in correlation with activation of erk, *Oncogene*, 23, 29, 4984-4992.
- Zhu, Q., Hu, J., Meng, H., Shen, Y., Zhou, J. and Zhu, Z., 2014, S-phase cell cycle arrest, apoptosis, and molecular mechanisms of aplasia ras homolog member i-induced human ovarian cancer skov3 cell lines, *International Journal of Gynecologic Cancer*, 24, 4.
- Zidan, H. A. E.-G., Mostafa, Z. K., Ibrahim, M. A., Haggag, S., Darwish, D. A. and Elfiky, A. A., 2018, Venom composition of egyptian and carniolan honeybee, *apis mellifera* l. Affected by collection methods, *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology*, 11, 4, 59-71.
- Zolfagharian, H., Mohajeri, M. and Babaie, M., 2015, Honey bee venom (*apis mellifera*) contains anticoagulation factors and increases the blood-clotting time, *Journal of pharmacopuncture*, 18, 4, 7.