



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ARI ZEHRİNİN KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Esra BİRİNCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

TRABZON-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ARI ZEHRİNİN KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Esra BİRİNCİ
ORCID: 0000-0002-0998-0661

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
ORCID: 0000-0003-0437-6139

TRABZON-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlayıp yazdığımı, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

02/11/2020
Esra BİRİNCİ

İthaf

Yüksek lisans tezimi, kanserle mücadele eden tüm savaşçılara ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı (Proje No: 117Z747) dâhilinde desteklenmiştir.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgisiyle ve verdiği güvenle desteğini hiç eksik etmeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya; bu alandaki tüm bilgi ve birikimini, aynı zamanda laboratuvarını paylaşan manevi desteğini eksik etmeyen hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Selcen ÇELİK UZUNER'e; bu alandaki ilk adımlarımı atmamı sağlayan Dr. Albandri ALFRAIDI'ye teşekkür ederim.

Tüm lisans ve yüksek lisans hayatımda daima yanımda olan değerli arkadaşım Ceren BİRİNCİ'ye ve ailesine, çalışmalarım esnasında manevi desteklerini hep hissettiğim aynı zamanda tüm tecrübelerini aktaran Emine KOÇ, Hilal Ebru ÇAKIR, Dr. Öğr. Üyesi Merve KESKİN, Yakup KARA ve Doç. Dr. Zehra CAN hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çalışmalarımı gerçekleştirdiğim esnada yardımlarını aldığım KTÜ Kimya, Eczacılık, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Tıbbi Biyoloji ve Biyoloji'deki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma; Apiterapy and Nature grubundaki hocalarıma, KTÜ Kimya/Biyokimya ve Moleküler Biyoloji ve Genetik/Memeli Hücre Kültürü laboratuvarındaki hocalarıma ve arkadaşlarıma tüm destekleri için teşekkür ederim.

Hayatımda attığım her adımda ve tüm tercihlerimde beni cesaretlendiren destekleriyle her zaman onurlandıran, hayata karşı duruşumda kendim olmamı sağlayan babam Mustafa BİRİNCİ'ye, annem Seher BİRİNCİ'ye ve kardeşim Koray BİRİNCİ'ye sonsuz teşekkürler.

Esra BİRİNCİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

RESİMLER DİZİNİ

x

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xi

ÖZET

xiii

ABSTRACT

xiv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

2

2.1. Apiterapi ve Arı Zehri

2

2.2. Arı Zehrinin Fiziksel ve Kimyasal Yapısı

3

2.3. Kanser

5

2.4. Hücre Döngüsü

7

2.5. Hücre Ölümü

8

2.6. Apoptoz

9

2.7. Nekroz

11

2.8. Sitotoksisite Testleri

12

3. GEREÇ ve YÖNTEM

14

3.1. Analizlerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

14

3.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

15

3.3. Analizi Yapılacak Maddenin Temini ve Saklama Koşulları

16

3.4. Arı Zehrinin Elektroforez ile Analizi

16

3.4.1. SDS-PAGE için Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

17

3.4.2. SDS-PAGE Elektroforez Protokolü

18

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

19

3.5.1. Kanser Hücreleri

19

3.5.1.1. Metastatik Meme Kanser Hücre Serisi	19
3.5.1.2. Karaciğer Kanser Hücre Serisi	19
3.5.2. Sağlıklı Hücre	19
3.5.3. Hücrelerin Çoğaltılması, Pasajlanması ve Dondurulması	19
3.6. Arı Zehrinin Hazırlanması	21
3.7. Sitotoksikite Analizi: MTT Testi	21
3.8. Hücre Ölümünün Analizi (Apoptoz/ Nekroz)	22
3.9. Mitokondri Membran Potansiyelinin Tespiti	24
3.10. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	27
4.1. Arı Zehri SDS-PAGE Elektroforezi	27
4.2. MTT Analizi	28
4.3. Hücre Profillerinin Değerlendirilmesi	32
4.4. Anneksin V-PI Deneyi	38
4.5. Arı Zehrinin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
6. KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Arı zehri bileşenleri ve kuru ağırlıkları (%)	4
Tablo 2.	Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler marka/modelleri	14
Tablo 3.	Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler, firmaları ve kodları	15
Tablo 4.	SDS PAGE elektroforezinde kullanılan jeller	18

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	IARC'ye göre yaygın kanser türleri ve en çok ölümün gözlemlendiği kanser türleri	6
Şekil 2.	Hücre döngüsü	8
Şekil 3.	Arı zehrinin MDA-MB-231 üzerindeki hücre canlılık oranı (%)	29
Şekil 4.	Arı zehrinin HepG2 üzerindeki hücre canlılık oranı (%)	30
Şekil 5.	Arı zehrinin NIH/3T3 üzerindeki hücre canlılık oranı (%)	30
Şekil 6.	Arı zehrinden sonra hücre morfolojilerinin flow sitometri FSC-SSC grafikleri yoluyla analizi	34
Şekil 7.	Arı zehrinden sonra MDA-MB-231 hücresinin FSC-SSC istatistiksel analizi	35
Şekil 8.	Arı zehrinden sonra HepG2 hücresinin FSC-SSC istatistiksel analizi	36
Şekil 9.	Arı zehrinden sonra NIH/3T3 hücresinin FSC-SSC istatistiksel analizi	37
Şekil 10.	Apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının akım sitometrisi ile analizi	39
Şekil 11.	Mitokondri membran potansiyeli akım sitometrisi analizi	40

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Arı zehrinin SDS-PAGE elektroforezi jel görüntüsü	28
Resim 2.	Arı zehrinin hücreler üzerinde 24 saat etkisinin morfolojik görüntüleri	31
Resim 3.	Mitokondri membran potansiyelinin floresan mikroskobu yoluyla gösterilmesi	41



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

APS	Amonyum persülfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat
BCS	Bovine calf serum
BCL-2	B-cell lymphoma 2 protein
CDKs	Siklin bağımlı kinazlar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ETS	Elektron taşıma sistemi
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Floresans izosiyanat
FL1/ 2/ 3	Floresans dedektörler
FSC	İleri saçılma
G	Gravite
G1/ G2	İlk aralık/ İkinci aralık
HepG2	Karaciğer kanser hücre serisi
IARC	The International Agency for Research on Cancer
IC₅₀	The half maximal inhibitory concentration
M	Mitoz
MDA-MB-231	Metastatik Meme Kanseri Hücre Serisi
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)]-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NCDD	Nomenclature Committee on Cell Death
NHGRI	National Human Genome Research Institute
NIH/3T3	Sağlıklı fare fibroblast hücre serisi
PBS	Phosphate buffered saline
Pen-Strep	Penisilin- streptomisin
PFA	Paraformaldehit

PI	Propidyum iyodür
PS	Fosfatidilserin
p53	Tumor protein 53
RCF	Göreceli santrifüj kuvveti
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium
S	Sentez Fazı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SSC	Yana saçılma
TEMED	Tetrametil etilendiamin
WHO	World Health Organization

Simgeler

Da	Dalton
mA	Miliamper
nm	Nanometre
µL	Mikrolitre

Formüller

ddH₂O	Ultra saf su
CO₂	Karbondioksit
HCl	Hidroklorik asit
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit

ÖZET

Arı Zehrinin Kansere Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Araştırılması

Apiterapi arı ürünleri ile çok çeşitli tedavi yöntemlerini ifade eden bir terim olup, geleneksel ve tamamlayıcı tıp içinde yer almaktadır. Arı zehri (apitoksin), bal arılarının önemli bir savunma silahı olup, biyolojik aktivite potansiyeli yüksek olduğu için kanser ve pek çok tedavi içinde umut vaat edici doğal bir ajandır. Bileşimini düşük molekül ağırlıklı protein ve peptitlerden oluşturmaktadır. Arı zehri içeriği arı türlerine göre, arı türleri de coğrafyaya göre farklılık gösterebilmektedir.

Yapılan bu araştırmada, Anadolu bal arısı ırkına ait ham arı zehrinin bazı kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi ilk kez araştırıldı. Bu amaçla metastatik meme kanser (MDA-MB-231) ve karaciğer kanser (HepG2) hücreleri ile sağlıklı fibroblast (NIH/3T3) hücre hatları çalışmada kullanıldı. Her üç hücre hattında sitotoksikite testleri için ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)]-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT), mitokondriyal membran potansiyeli için MitoTracker ve apoptoz/nekroz için annexin V/PI kullanıldı. Elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde çalışmada kullanılan ham arı zehrinin normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerini daha seçici bir şekilde tahrip ettiği, mitokondrinin aktivitesini ortaya koyan önemli parametrelerden biri olan mitokondri membran potansiyelinde (MMP) değişime neden olduğu ve hücre morfolojisini hücre büyüklüğü ve içeriğini azaltacak şekilde etkilediği tespit edildi.

Pozitif bulguların elde edilmesiyle arı zehrinin metastatik meme ve karaciğer kanserini üzerindeki sitotoksik potansiyeli belirlendi. Bulgular alternatif ve tamamlayıcı tıp açısından önemli veriler sağlayacak ve böylece bölgeye ait bu doğal ürünün daha etkin şekilde değerlendirilmesinin yolu açılacaktır.

Anahtar Sözcükler: Apiterapi, apoptoz, arı zehri, karaciğer kanseri, meme kanseri, sitotoksikite

ABSTRACT

Investigation of Cytotoxic Effects of Bee Venom on Cancer Cells

Apitherapy is a term that refers to a wide range of treatment methods by bee products and is included in traditional and complementary medicine. Bee venom (apitoxin) is an important mixture providing self-defense of honey bees. This is also a promising natural mixture for treatment of range diseases such cancer, as it has a high biological activity potential. The compound is composed of low molecular weight proteins and peptides. The contents of bee venom may vary according to geography and bee species.

In this study, the effects of bee venom of Anatolian honey bee on cytotoxicity and epigenetic properties in cancer cells including metastatic breast cancer (MDA-MB-231) and liver cancer (HepG2) cell lines were investigated compared to healthy fibroblast (NIH/3T3) cells. The cytotoxic effect of bee venom was analyzed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Mitochondrial membrane potential (MMP) was analyzed by MitoTracker staining and the profiles of apoptotic and necrotic cells were investigated by annexin V/PI using flow cytometer. The findings showed that the bee venom used in the study destroyed cancer cells more selectively than normal cells, mitochondrial membrane potential that is one of the important parameters for the activity of mitochondria varied in cells after bee venom and cell sizes and cell granularity decreased, namely cellular morphology differed

By obtaining positive findings, the cytotoxic potential of bee venom on metastatic breast and liver cancer was determined. The findings will provide important data in terms of alternative and complementary medicine and thus will lead to a more effective evaluation of this natural product belonging to the region.

Key Words: Apitherapy, apoptosis, bee venom, breast cancer, cytotoxicity, liver cancer

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Apiterapi, arı ürünleri kullanılarak uygulanan çeşitli tedavi yöntemlerini ifade eder. Biyolojik aktivite potansiyeli yüksek bir arı ürünü olan arı zehri veya apitoksin antitümoral etkisi nedeniyle birçok araştırmaya konu olmuştur (1-10). Günümüzün yaygın hastalıklarından biri olan kanser, normal hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla anormal hücrelerin oluşumu ve apoptozdan kaçınmaları gibi durumlarla meydana gelen patolojik bir oluşumdur (11-14). Dünya sağlık örgütü verilerine göre en yaygın kanser türlerinden olan meme ve karaciğer kanserleri aynı zamanda da yüksek ölüm oranına sahiptir (15). Bu verilerin ışığında çalışmada kullanılmak üzere metastatik meme kanser hücresi (MDA-MB-231) ve karaciğer kanser hücresi (HepG2) seçildi. Aynı zamanda bu hücreler üzerinde ülkemiz arı ırkına ait arı zehrinin etkisi ilk kez araştırıldı. Araştırmada arı zehrinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için MTT testi gerçekleştirildi. Bu test sonucunda diğer deneyler için çeşitli dozlar belirlendi. Daha sonra arı zehri uygulamasıyla hücrelerin morfolojik görüntüleri dikkate alınarak mitokondri boyama işlemiyle hücre büyüklük ve içyapı değerlendirilmesi ve mitokondri membran potansiyeli çalışması yapıldı. Son olarak floresans boyama yapılarak hücrelerin apoptoz ve nekroza yönelme durumları incelendi. Çalışmalar sonucundaki veriler değerlendirildiğinde arı zehrinin kanser hücrelerini sağlıklı hücrelere zarar vermeden mitokondri membran potansiyelini düşürmesi, hücre morfolojisini hücre büyüklüğü ve içeriğini azaltacak şekilde etkilemesi ve hücreyi apoptoza/nekroza indüklemesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Apiterapi ve Arı Zehri

Dünya Sağlık Örgütü tarafından tanımlanan “*Tamamlayıcı/alternatif tıp*” ve “*geleneksel tıp*” terimleri farklı kültürlerle ve inançlara özgü ortaya çıkan bilgi, birikim ve beceri gerektiren uygulamalar bütünüdür. Çok eski zamanlardan beri var olan fiziksel ve zihinsel sağlığın korunmasında, tanı ve tedavisinde kullanılan bu uygulamalar: Akupunktur, apiterapi, fitoterapi, hipnoz, homeopati, sülük tedavisi, kupa tedavisi, osteopati, kayropratik, refleksoloji, müzik terapisi, proloterapi, kurtçuk tedavisi, ozon tedavisi.

Apiterapi kökeni antik Mısır’a dayanan, hastalığı önlemek ve tedavi etmek amacıyla bal, arı zehri, propolis, polen, arı ekmeği, arı sütü, balmumu ve apilarnil gibi arı ürünlerinin kullanımınıdır. Bu arı ürünlerinin kullanımı uygarlıkların en eski tarihlerine kadar uzanırken hem beslenmedeki hem de iyileştirici yönleri dini kaynaklarda da yer almaktadır (1, 2).

Balın yaraları iyileştirmesi yönünde çokça destekleyici çalışmalar yapılmış olup ayrıca antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, probiyotik, antiinflamatuvar ve antikanser gibi özellikleri bulunmaktadır (2, 16-18). Arı kolonisinde ana kraliçenin oluşumunda larvaların büyümesini ve artmasını sağlayan diğer bir arı ürünü olan arı sütünün hiperkolesterolemi, kısırlık, diyabet, antikanser tedavilerinde etkili olabileceği çalışılmıştır (3, 19–22). Arıların kovanlarını korumak amacıyla bitkilerden ağaçlardan topladıkları reçinemsî bir madde olan propolis çok sayıda çalışmada yer almış ve birçok biyolojik ve farmakolojik özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Propolis yara ve yanıkların tedavisinde, ağız ve diş sağlığında kullanımı belirtilmiş, antioksidan ve antikanser alanında birçok çalışma yapılmıştır.

Arı ürünleri içinde en güçlü farmakolojik etkiye sahip olan arı zehri, romatoid artrit tedavisinde akupunktur ile birleştirilerek “apipunktur” olarak doğrudan sokma veya enjeksiyon yöntemleriyle kullanılmaktadır. Arı zehrinin etki mekanizması olarak pro-inflamatuvar maddelerin oluşumunu engellediği ve aynı zamanda romatoid sinovyal hücrelerin çoğalmasını engellediği belirtilmiştir. Kanser çalışmalarında da kullanılan arı zehrinin kanser tedavisinde olumlu yönde etkileri gösterilmiştir. Örneğin, arıcıların diğerlerine kıyasla daha düşük kanser insidansına sahip olduğu özellikle akciğer kanseri insidansının önemli ölçüde düşük olduğu belirtilmiştir (3–10).

2.2. Arı Zehrinin Fiziksel ve Kimyasal Yapısı

Arı zehri veya apitoksin, arı kolonisinin savunulmasında önemli bir role sahiptir. Arıların karın boşluğundaki zehir bezlerinde üretilen bir karışım olan arı zehri berrak kokusuz sulu bir sıvı olup kuruyunca sarımsı beyaz kristal bir toza dönüşür (1).

Arı zehri bileşimi, arının ırkına, toplanma biçimine, beslenme şartlarına, toplandığı bölgedeki bitki florasına ve toplanma zamanına bağlı değişim göstermektedir. Oldukça karmaşık bir yapıya sahip olan arı zehrinin yaklaşık %88'i su olduğu belirtilse de bileşimi tam olarak aydınlatılamamış, kuru ağırlığı ise çeşitli peptitler, proteinler, amino asitler, şekerler, uçucu yağlar ve moleküller ile minerallerden oluşmaktadır (23, 24). Arı zehrinin etken maddeleri olarak düşünülen moleküllerin büyük çoğunluğu peptit ve proteinler olup, aşağıdaki tabloda özetlenmişlerdir (1, 23, 25- 27).

Arı zehrindeki temel bileşen olan melittin 26 amino asit içeren monomerik veya tetramerik şekilde bulunan küçük bir proteindir. Fosfolipaz A2 aktivitesini arttırıp çift katmanlı fosfolipid tabakalarına kolayca bağlanır, gözenekler oluşturur ve yapıyı bozar (27). Bu şekilde hücrenin lizisini gerçekleştirebilir. Örneğin bu durum kanser hücrelerinin üzerinde istenen sitotoksik etkiyi yaratmadaki etken olabilir. Çok küçük dozlarda çeşitli etkilere sahip olan bileşen anti-inflamatuar etkiye sahiptir. Melittin, fosfolipaz A2 aktivitesinin arttırabilir. Arı zehrinin en güçlü alerjenik maddesi olan ve 128 aminoasitten meydana gelen fosfolipaz A2, serbest yağ asitlerini ve fosfolipidlerin hidrolizini katalizler. Melittin gibi fosfolipaz A2'de anti-kanser etkiyi gösterebilirken kanserli hücrenin çoğalmasını düzenleyebilir (28). Melittin, fosfolipaz A2 gibi anti-kanser bileşenlere sahip arı zehri göğüs, karaciğer, lösemi, akciğer, melanom ve prostat kanser hücreleri gibi farklı kanser hücresi tiplerine karşı antitümör aktiviteleri göstermiştir.

Tablo 1. Arı zehri bileşenleri ve kuru ağırlıkları (%) (Denk'ten, 25; Bogdanov'dan, 1)

Madde Sınıfı	Bileşen	Kuru Ağırlık %
Enzimler	Fosfolipaz A2	10-12
	Fosfolipaz B	1
	Hyaluronidaz	1-2
	Fosfataz	1
Peptidler	Melittin	40-55
	Apamin	2-3
	MCD Peptit	2-3
	Sekapine	0.5-2
	Pamin	1-3
	Minimin	2
	Adolapin	0.5-1
	Procamin A-B	1-2
	Proteaz inhibitörü	0.1-0.8
	Tertiapin	
	Kardiyopep	1
	Melittin F	
Biyojenik Aminler	Histamin	0.5-2
	Serotonin	1
	Dopamin	0.2-1
	Noradrenalin	0.1-0.5
Amino Asitler	Aminobütirik asit	1
	α -Amino Asitler	
Karbohidratlar	Glukoz	2-4
	Fruktoz	
Uçucular (Feromonlar)	Kompleks Eterler	4-8
Mineraller	P, Ca, Mg	2

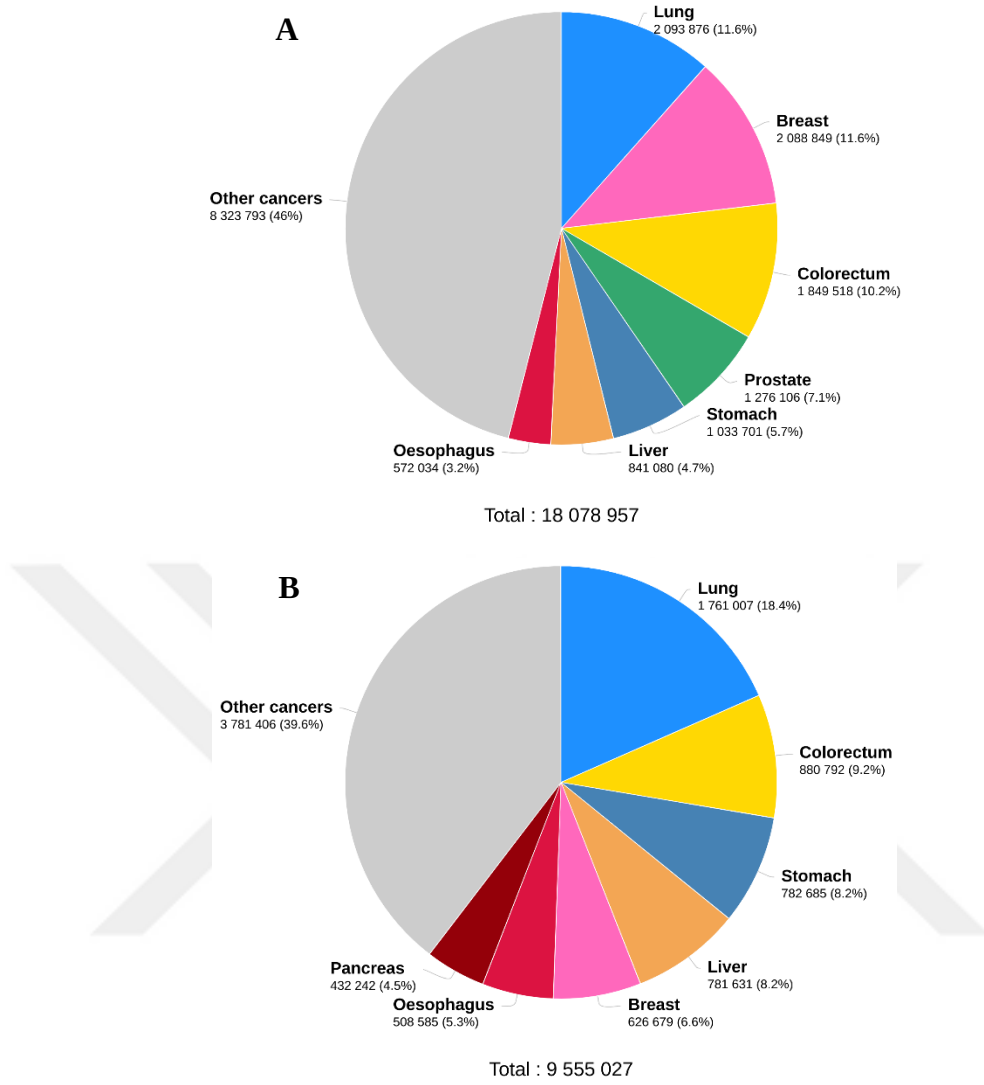
2.3. Kanser

Organizmamızdaki hücreler, bölünme, çoğalma ve ölme yeteneğine sahiptirler. Bu düzen, görevini tamamlamış yaşlanan hücrelerin apoptoz ile ölmesini ve yerine yeni hücrelerin oluşmasını, aynı zamanda meydana gelen hasarların ortadan kalkmasını sağlar. Bu hücreler çeşitli sebeplerden ötürü mutasyon geçirip, var olan düzenli süreci bozarlar. Yaşlı hücreler apoptoza uğramaz ve sürekli çoğalan yeni hücreler meydana gelir (11).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC)'na göre kanserin meydana gelme sebepleri olarak genetik faktörler, ultraviyole ışınları radyasyon, çeşitli kimyasal maddeler, çeşitli virüsler, bakteriler veya parazitlerden kaynaklanan enfeksiyonlar, sağlıksız beslenme, aşırı alkol kullanımı, fiziksel aktivite eksikliği, hava-su kirliliği ve en çok risk faktörü içeren tütün kullanımı gösterilir (12).

Kanser, normal hücrenin kontrolsüz çoğalmasıyla anormal hücrelerin oluşması olarak tanımlanmaktadır. Kontrolsüz çoğalan hücreler daha sonra vücudun diğer kısımlarını istila ederek metastaz yapmış olur. Bu da kanserden ölümün en önemli sebeplerinden biridir. Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine yol açan değişiklikler arasında “büyümeyi inhibe eden sinyallere karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçınma, sınırsız ve kontrolsüz çoğalma yeteneği, anjiyogenezin uyarılması, istila ve metastaz” gibi durumlar gösterilmiştir (11, 13, 24).

Günümüzün yaygın hastalıklarından olan kanser, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre yaklaşık 9.6 milyon insanın ölümüne neden olan dünya çapında ikinci sırada gelen ölüm nedenidir. En yaygın kanser türleri akciğer, meme, kolon, prostat, mide ve karaciğer; ölümün en çok yaşandığı kanser türleri ise akciğer, kolon, mide, karaciğer ve meme kanseri olarak Şekil 1'de de gösterilmiştir (15).



Şekil 1. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na göre yaygın kanser türleri (A) ve en çok ölümün gözlendiği kanser türleri (B), 2018 (IARC'den, 29)

Yapılan çalışmalarda, arı zehri ve bileşenlerinin (melittin, apamin gibi) karaciğer, meme, akciğer, prostat, lösemi gibi çeşitli kanser türlerinde etkili olduğu gösterilmiş olup bu bileşenlerin proliferasyon, apoptoz, metastaz gibi durumların düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (30). Bir çalışmada arı zehrinin karaciğer kanserinde in vitro deneylerinde apoptozu indüklediğini in vivo deneylerinde ise tümörün büyümesini önleyebildiği gösterilmiştir (31).

2.4. Hücre Döngüsü

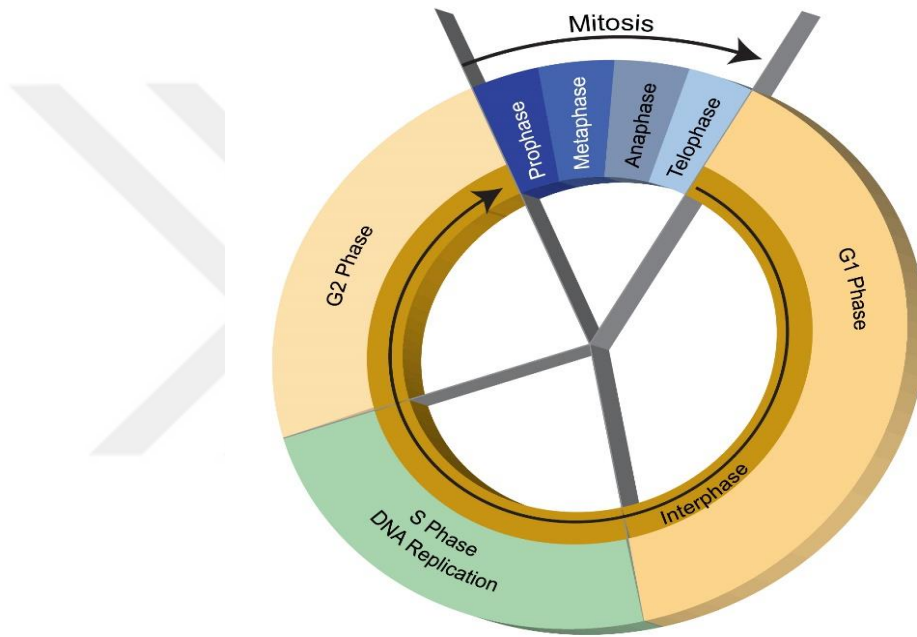
Hücre Döngüsü, Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü (NHGRI)'ne göre hücrenin büyüüp bölünmesi sırasında meydana gelen olaylar dizisi olarak tanımlanır (32). Hücre döngüsü interfaz ve mitoz olmak üzere iki aşamada gerçekleşir ve sonucunda iki yeni hücre oluşur. Hücre döngüsünde en uzun süreyi birbirini takip eden iki mitoz arasında gerçekleşen interfaz evresi alır.

İnterfazda G1 (ilk aralık), S (sentez evresi) ve G2 (ikinci aralık) diye adlandırılan farklı fazlar yer alır. G1 fazı hazırlık evresidir. DNA sentezlenmez. Kırmızı kan hücreleri, nöronlar gibi hücreler G0 denilen fazda tamamen kalırken karaciğer hücreleri gibi hücreler herhangi bir hasar olmadığı sürece G0'da kalabilir, hasar olduğunda G1'e girip hücre döngüsünü başlatır. G1 fazından sonra S fazı başlar. Bu evrede DNA replikasyonu gerçekleşir. Herbir kromozom kopyalanır ve sentromerlerde birarada tutunan kardeş kromatitler oluşur. Bu fazın sonunda tüm genetik materyal iki katına çıkmış olur ve G2 fazı başlar. G2 fazında hücre büyür, yoğunlaşıp bölünmeye hazır hale gelerek mitoz (M) aşamasına girer. M evresinde oluşan kardeş kromatitler ayrılıp yeni iki hücre oluşumu gerçekleşir. M evresi de beş aşamadan oluşur. İlk aşama olan profazda kromozonlar yoğunlaşır. İğ iplikleri ve bir çift sentrozom oluşur ve hücrenin kutuplarında yerini alarak prometafaz evresine geçilir. Bu aşamada nükleer membran erir. İğ iplikleri uzar. Metafaz evresinde kromozomlar yoğunlaşıp hücrenin ekvator düzleminde sıralanırlar. Anafaz evresinde kromozomlar sentromerlerden ayrılıp zıt kutuplara hareket eder. Son evre telofazda kromozomlar çözülmeye ve iki nükleer membran oluşmaya başlar. Bölünme sürecinin tamamlanması için sitoplazma, sitokinez olarak adlandırılan bölünme sürecine girer ve iki yeni hücre oluşur. Bölünmenin sona ermesinin ardından yeni bir hücre döngüsü tekrar başlar (33, 34).

Hücre döngüsü çeşitli kontrol noktaları tarafından kontrol edilir. Bu kontrolün amacı döngü işlemi sırasında meydana gelen özellikle DNA sentezindeki hataların düzeltilmesi için gerçekleştirilir. Döngüde üç adet kontrol noktası bulunur: G1 kontrol noktasında hücre boyutu, besin miktarı, büyüme faktörleri gibi faktörlerin yeterli olup olmadığı, DNA hasarının olup olmadığı kontrol edilir. G2 kontrol noktasında hücrenin yeterli büyüklükte olup olmadığı, DNA replikasyonunun doğru yapılıp yapılmadığı, herhangi bir DNA hasarının olup olmadığı kontrol edilir. Son olarak M kontrol noktasında ise kromozomların iğ ipliklerine bağlantısı kontrol edilir. Döngünün kontrol edilmesinde yardımcı düzenleyici

proteinler olan siklinler görev yapar. Siklinler fosfor bağımlı siklin kinazları (CDKs) aktive eder ve kompleks oluştururlar. Bu kompleks döngünün gerçekleşmesini sağlayan bir hedef proteine bağlanıp bir olayı gerçekleştirirler. Olay gerçekleştikten sonra siklin yıkılır ve siklin kinaz pasif hale geçer (35–37).

Genomda meydana gelen hasarlar eğer hücre döngüsü kontrol noktalarında düzeltileniyorsa veya aşırı hasar varsa hücre için programlanmış hücre ölümü (apoptoz) gerçekleşir.



Şekil 2. Hücre döngüsü (NHGRI'den, 32)

2.5. Hücre Ölümü

Hücre ölümü, bir hücrenin biyolojik olarak işlevini kaybetmesi olarak tanımlanabilen oldukça karmaşık organize temel bir faaliyettir. Hücre embriyonik gelişimi ve doku yenilenmesi gibi fizyolojik durumlarda, yaralanmalarda ve patojenik durumlarda hücre ölümünü gerçekleştirebilir (38). Hücrede kaspaz aktivasyonu, mitokondriyal membran potansiyelindeki kayıp, mitokondriyal dış zarın geçirgenliği, komşu hücreler için 'beni yiyin' sinyalleri gönderen fosfatidilserin (PS)'in açığa çıkması gibi durumlarda hücre ölü sayılabilir. Hücre ölümü morfolojik görünümüne, enzimolojik kriterlere, fonksiyonel veya immünolojik özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (39–41).

Hücre ölümü son 150 yılda birçok kez saptanmış ve çeşitli şekillerde tanımlanmıştır. Virchow 1871'de nekroz ve nekrobiyoz olarak tanımlarken daha sonra hücre ölümünün omurgasızlarda metamorfoz sırasında, hormona bağlı dokularda, memelilerin gelişimi sırasında, kimyasallara ve radyasyona maruz kalındığında ve yaralanma gibi durumlarda olduğu rapor edilmiştir. Toksikoloji ve patolojide hücre ölümü dokuların hasar görmesinin ardından gerçekleşen bir olgu olduğu kabul edilmiştir. Farber, antikanser ilaçlarıyla tedaviden sonra intihar tipi bir hücre ölüm tipini tanımlamıştır. 1972'de ise Kerr, Wyllie ve Currie tarafından hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere iki kategoriye ayrılmış ve yeniden tanımlanmıştır (42).

Hücre ölümleri çeşitli şekillerde tanımlanmaya ve mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda oluşturulan NCDD (Nomenclature Committee on Cell Death), hücre ölüm tiplerinin terminolojisi oluşturmaya çalışmış önerilerde bulunmuştur. Araştırmaların devam etmesi yeni mekanizmaların ortaya çıkmasına ve bu sayede yeni tanımlamalara neden olmuştur. NCDD son olarak 2018'de önerilerini yayımladı. Hücre ölümü, kazara oluşan hücre ölümü ve düzenlenmiş hücre ölümü olarak ayrılmıştır. Kazara hücre ölümü, yüksek basınç ve sıcaklık, pH değişimleri gibi fiziksel, kimyasal ve mekanik durumlarda oluşan ani ölümlerdir. Düzenlenmiş hücre ölümü, sinyal iletimleriyle aktive edilen ve farmokolojik ya da genetik olarak düzenlenebilen ölüm şekli olarak tanımlanmıştır. Düzenlenmiş hücre ölümü fizyolojik durumlarda da oluşabilir. Bu tipine programlanmış hücre ölümü adı verilmiştir. Strese dayalı düzenlenmiş hücre ölümünde biyolojik denge organizma seviyesinde sağlanır. Hücre ölümü genellikle büyük morfolojik değişimler altında üç şekilde sınıflandırılmaya devam etmektedir. Tip I hücre ölümü apoptoz, Tip II hücre ölümü otofaji ve Tip III hücre ölümü nekroz şeklinde sınıflandırılır. NCDD tarafından 2018 yılında hücre ölüm tipleri için güncellenmiş bir terminoloji sunulmuştur (39). Bunlar: (1) İntrinsik apoptoz, (2) ekstrinsik apoptoz, (3) mitokondriyal geçirgenlik geçişine dayalı nekroz, (4) nekroptoz, (5) ferroptoz, (6) piroptoz, (7) partanatoz, (8) entotik hücre ölümü, (9) NETotik hücre ölümü, (10) lizozom bağımlı hücre ölümü, (11) otofaji bağımlı hücre ölümü, (12) immunojenik hücre ölümü, (13) anoikis (14) otoz, (15) kornifikasyon. Ölümcül olmayan süreçler olarak (16) hücreysel yaşlanma, (17) mitotik felaket gösterilmiştir.

2.6. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda hücreler bölünerek yeni hücreleri meydana getirir. Oluşan bu hücreler belirli bir görevi yerine getirir giderek farklılaşır ve sonunda ölür. Bu

süreç hücre döngüsüyle birlikte sürekli devam ederek bir denge oluşturulur. Bu dengenin sağlanmasında önemli bir kısmı “apoptoz” oluşturur. Apoptoz kelimesi Grek dilinde ağaçtan düşen yaprak olarak tanımlanır. Bu kelime hücre ölümünün özel morfolojik yönünü tanımlamak için ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır (43). Programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz hücrede meydana geldiğinde hücrenin bölünmesi ve büyümesi durur; bir dizi olaylar aktif aynı zamanda bazıları inaktif olup hücrenin kontrollü ölümü gerçekleşir (44).

Bir hücrede ölüm, apoptozun tetiklenmesiyle başlar. Proapoptotik proteinler ve kaspaz kaskadı aktive edilip bir seri reaksiyon başlar. Hücre içi organeller değişir veya bozulur. Hücre apoptotik cisimciklere ayrılır ve bu parçacıklar komşu hücreler veya makrofajlarca fagositoza uğrar (45). Bu esnada mitokondriyal membran potansiyelinde kayıp ve dış zar geçirgenliği meydana gelir. Apoptoz başlayan hücrenin iç membranındaki fosfatidilserin dış membrana geçer ve diğer hücrelere fagositoz için ölüm sinyalleri verir. Bu gibi olaylar hücrenin ölümünün gerçekleştiğini gösterir ve dönüşü olmayan süreçler olduğundan hücre ölü kabul edilir. Apoptozdan kaçan hücreler dengenin bozulmasına yol açıp kötü huylu hücreleri oluşturur ve bu hücreler kansere neden olur (46).

Apoptozun merkezinde kaspazlar bulunur. Kaspazlar hücrede proenzim formunda olan aspartata özgü sistein protezlerdir. İnsan genomunda farklı kaspazlar bulunur. Bu kaspazların eflamasyon ve hücre ölümü görevlerinde yer aldıkları belirtilse de birçok açıdan birbiriyle ilişkili olup farklı süreçlerde de etkileri olduğu bilinmektedir (47). Hücre ölümünde kaspazlar; başlatıcı kaspazlar 2-8-9-10, efektör kaspazlar 3-6-7 olmak üzere ikiye ayrılabilir. Başlatıcı kaspaz aktivasyonu enflamasyon, piddozom, DISC (ölümü indükleyen sinyal kompleksi) ve apoptozom gibi bir dizi poliprotein kompleksi ile gerçekleştirilebilir. Kaspaz aracılı apoptoz üç farklı mekanizmayla aktive edilir: İntrinsik/içsel (mitokondriyal), ekstrinsik/dışsal (ölüm reseptörü) ve intrinsik/içsel endoplazmik retikulum yoludur (46, 48).

Mitokondriyal apoptoz, DNA hasarı, hipoksi, yüksek konsantrasyonlardaki sitozolik Ca^{2+} ve oksidatif stres gibi etkenlerle hücrenin içinde başlatılır. Mitokondri membran geçirgenliğinin artmasıyla sitokrom-c, Smac, DIABLO ve omi/htrA2 salınır. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımıyla Apaf-1 ile prokaspaz-9 aktive edilip apoptozom oluşturulur. Daha sonra apoptozom prokaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz-3'ü meydana getirir. Kaspaz-3 ile art arda meydana gelen aktivasyonlar sonucu kromozomal DNA'nın parçalanması ve hücrenin fagositozuna kadar giden bir dizi proteolitik kaskada neden olur. Bu süreçte sitokrom c'nin

sitozole salınmasında rol alan Bcl-2 protein ailesi mitokondri membran geçirgenliğini düzenler (49, 50).

Ekstrinsik/dışsal apoptoz, ölüm reseptörlerinin aktive edilmesi, büyüme etkenlerinin üreme faktörlerinin yetersiz kalması ve toksinler, ultraviyole ışınları, kemoterapi ilaçları gibi çevresel etmenler ile başlar. Ekstrinsik/dışsal apoptoz, Hücrenin dışında ölüm ligandlarının (FasL, TNF-alfa) membrandaki ölüm reseptörüne (Fas, TNFR) bağlanmasıyla aktive edilir. Daha sonra hücre içindeki FADD adaptörüne bağlanıp kaspaz aktive edici kompleks olan DISC (ölümü indükleyen sinyal kompleksi) oluşur. Kompleks prokaspaz-8'i aktive edip başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz-8'i meydana getirir. Kaspaz-8 ise efektör kaspaz-3 aktifleştirerek kromozomal DNA parçalanmasıyla devam eden hücre ölümünü devam ettirir.

Ökaryotik hücrelerde hücrenin güç kaynağı olan mitokondride, hücresel enerjinin (ATP) çoğu oksidatif fosforilasyonla üretilir. Elektronlar, elektron alıcısı oksijenlere aktarılır. Elektron taşıma sistemi (ETS) devreye girer ve bir seri indirgenme-yükseltme reaksiyonları gerçekleşir. Bu esnada mitokondriyal membran potansiyeli oluşur. Bu potansiyel çeşitli ajanlarla azaltılabilir. Bu durum hücreyi apoptoza yönlendirebilir (51–53).

Yapılan çalışmalarda hücre ölümünden kaynaklı dengenin bozulmasıyla kanser gibi çeşitli hastalıklar meydana gelmektedir. Normal hücrenin kanserleşme yolunda uğradığı genetik değişiklikler apoptozdan kaçmasına neden olur. Apoptozdan kaçınmasında; Bcl-2 ailesinden iki zıt grup olan pro-apoptotik (düşük ekspresyon: Bid, Bim, Bad, Bax vs) ve antioapoptotik (yüksek ekspresyon: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W vs.) proteinlerin arasındaki dengenin bozulması, azaltılmış kaspaz aktivasyonu, bozulmuş ölüm reseptörü sinyali, tümör baskılayıcı gen olan p53'te mutasyon gibi durumlar meydana gelmektedir. Apoptozdan kaçan hücrelerde kanser oluşumuna yönelik onkogenler aktive olurken tümör baskılayıcı genler inaktive edilir. p53 genindeki bozukluklar insan kanserinin %50'sinden fazlasına bağlanmıştır (50, 54, 55). Kanser tedavisinde de kullanılan antikanser ajanları kanser oluşumuna neden olan bu yolları hedef alarak tedaviyi amaçlar.

2.7. Nekroz

Nekroz, hücrenin görevini yerine getiremediği ani şok, hipoksi, aşırı ısı, kimyasallar, enflamasyon gibi yaralanmalarla indüklenen ölüm şeklidir (56, 57). Apoptozdan farklı olarak gelişen nekrozda membran bütünlüğü bozulup hücre içeriği dışarıya dökülerek

enflamasyon ve doku hasarı oluşur (44). Apoptozda rol oynayan spesifik proteinlerin inhibe olması süreci nekroza döndürebilir.

2.8. Sitotoksikite Testleri

Sitotoksikite kavramı hücrelere uygulanan herhangi bir ajanın hücre üzerindeki toksik etkisini belirtir. Günümüzde, hücrelerin canlılığını, poliferasyonunu gösteren çok çeşitli testler uygulanmaktadır. Bu testler ilaç keşifleri, kanser araştırmaları gibi konuların aydınlatılmasında önemli bir yer tutar. Testler, hücrenin enzim aktivitesi, membran geçirgenliği, ATP üretimi, adezyonu, DNA sentezi, metabolik aktivite gibi fonksiyonlarına dayanmaktadır. Bu testler, tetrazolyum tuzları olan MTT, MTS, XTT ve WSTs, nötral kırmızısı, alamar mavisi, tripan mavisi, LDH, mitokondriyal membran potansiyeli, kaspaz aktivasyonu, anneksin, PI, sitokrom c salınımı, TUNEL, BrdU, DNA bölünmesi, ATP ölçümü, Kalsein-AM, SRB, PARP, hücre morfolojisi, koloni oluşumu gibi birçok test bulunmaktadır (44, 58–61).

MTT Testi, 1983 yılında Tim Mosmann tarafından ilk kez tanımlanan, araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılan hücre canlılığının ölçüldüğü yüksek verimli bir yöntemdir (62, 63). Bu test bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin canlı hücreler tarafından çözünmeyen formu olan formazon kristallerine dönüşmesine dayanır. Burada NAD(P)H'a bağlı mitokondriyal oksidoredüktaz enzimleri bu indirgeme reaksiyonunu gerçekleştirir. Başlangıçta sarımsı bir renk gösteren deney ortamı bu reaksiyon sonucunda mavi-mor renge dönüşür. Burada oluşan rengin şiddeti meydana gelen formazon kristallerinin miktarıyla doğru orantılıdır. Hücre eğer canlı ve çoğalmaya devam eden bir süreçte ise bu dönüşümü sağlayabilirken aksine ölü olan yani metabolik aktivite göstermeyen hücrelerde bu reaksiyon gerçekleşmez. Yüksekten düşük metabolik aktiviteye doğru renk şiddeti azalır. Bu durum spektrofotometrik cihazlarla tespit edilir. Oluşan formazon kristallerinin konsantrasyonu 540-720 nm dalga boyunda absorbanı ölçülerek belirlenir (63–65).

Embriyonik gelişim sürecinde ve doku homeostazının sağlanmasında önemli bir süreç olan apoptoz, anneksin-V proteini ile saptanmaktadır. Anneksin-V, Ca^{+2} varlığında bir fosfolipid bağlayıcı 35-36 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Bu protein hücre zarında yer alan fosfatidilserinlere (PS) karşı yüksek afiniteye sahiptir (63, 66–69). Hücre zarının sitozolik tarafında yer alan fosfatidilserinler, apoptozun erken aşamalarında membranın dış yüzeyine yer değiştirir. Ortama eklenen anneksin-V fosfatidilserinlere bağlanır. Bu protein, floresans izosiyanat (FITC) gibi florokromlar ile konjuge edildiğinde apoptoz sürecindeki

hücrelerin oranı mikroskop, otomatik hücre sayacı, flow sitometresi gibi cihazlarla tespit edilebilir floresans yeşil bir ışıma yapar. Bu ışıma sayesinde apoptoza giren hücreler tespit edilir. Bu analiz sırasında veya hücreye uygulanan toksik madde nedeniyle hücre zarının bütünlüğü bozulabilir. Bu durum anneksin-V FITC analizinin sonucunu etkileyeceğinden propidyum iyodür (PI) boyaması aynı zamanda yapılabilir (70, 71). PI boyaması nekrozun tespitinde kullanılan floresans bir boyadır. Bu boya ancak membran bütünlüğü bozulmuş hücrelere girip çekirdekteki DNA'ya bağlanabilir. Bu sayede hücreler apoptotik ve nekrotik olarak ayrılabilir ve analiz edilebilir. Nekrotik hücreler bozulmuş membran yapılarından dolayı anneksin-V FITC ile de boyanabilir. Sonuç olarak bu analizde, canlı kabul edilen hücreler anneksin-V ve PI ile boyanmaz; erken apoptozda olan hücreler anneksin-V ile boyanırken PI ile boyanmaz; geç apoptozda veya ölü kabul edilen hücreler hem anneksin-V'ye hem de PI'a boyanır (72).

Anneksin-V, PI ve mitokondri membran potansiyeli analizleri ticari kitler aracılığıyla boyanıp flow sitometri cihazıyla tespit edilebilir. Flow sitometrisinde az sayıda tek bir hücre popülasyonunun apoptoz veya nekroz analizi aynı anda yapılabilmektedir (71). Flow sitometride bir akışkan haldeki bir sıvı içerisindeki hücreler gibi partiküllerin çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri saptanabilen hızlı bir yöntemdir. Hücrenin büyüklüğünün, şeklinin, tanecikli yapısının ve genetik materyal içeriğinin saptanması için hücre floresans boyalarla işaretlenir (73, 74). Cihazda akış sistemi, ışık kaynağı, filtre ve dedektörler, kaydedici program ve hücre ayırma sistemi bulunur. Sıvı içerisindeki hücreler ışık kaynağının önünden tek sıra halinde geçer ve sadece o hücre analiz edilir. Hücrenin boyutunu ileri saçılma/FSC, hücrenin iç yapısını yani tanecikli durumunu yana saçılma/SSC ölçümü gösterir. Aynı zamanda sistemde FL-1, FL-2, FL-3 gibi floresans dedektörler de bulunur. Bu dedektörler sayesinde de hücrenin yaptığı ışıma tespit edilir (75, 76).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Analizlerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler marka/modelleri

Cihaz Adı	Marka/Model
Elektroforez Sistem	Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell
Ultra Saf Su Cihazı	Merck Direct-Q 3UV
Magnetik Karıştırıcı	Heidolph Promax 2020
Vorteks	DLAB MX-S
Su Banyosu	Nüve NB20
pH Metre	Hanna
Hassas Terazî	Presica LX 320 A
Ayarlanabilir Hacimli Otomatik Pipetler	Eppendorf
Elektronik Pipet	DLAB Levo Plus
Otomatik Hücre Sayacı	Life Technologies Countess II FL
Steril Kabin	Esco Clas II BSC Ait Stream
Karbondioksit Destekli İnkübatör	Nüve CO ₂ Incubator EC160
Hücre Tankı	Thermo Scientific Locator JR
Azot Tankı	International Cryogenics IC-35D LN2 Storage Dewar
Inverted Floresans Mikroskobu	Zeiss Vert.A1
Santrifüj	Nüve NF1200
Spektrofotometre	Molecular Devices SpectraMax M2
Flow Sitometri Cihazı	BD Accuri C6 Cytometer
Membran Filtre	Merck
Falkon Tüp	Falcon
Flask	Corning
Steril Pipet Ucu	Eppendorf
Steril Serolojik Pipet	Lp Italiana Spa
96 kuyucuklu Plaka	Nest
Cam Malzemeler	Isolab

3.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve firma/kod bilgileri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler, firmaları ve kodları

Kimyasal Madde	Firma/Kod
Metastatik Meme Kanseri Hücre Serisi (MDA-MB-231)	American Type Cell Collection (ATCC), HTB-26
Karaciğer Kanseri Hücre Serisi (HepG2)	American Type Cell Collection (ATCC), HB8065
Sağlıklı Fare Fibroblast Hücre Serisi (NIH/3T3)	American Type Cell Collection (ATCC), CRL-1658
RPMI-1640 Medyası	Sigma, R8758
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Medyası	Capricorn Scientific, DMEM-HPA
Eagle's minimal essential medium (EMEM) Medyası	Wisent, 320-026-CL
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma, 12103C
Bovine Calf Serum (BCS)	Sigma, 12133C
Ca-Mg'suz Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (w/o)	Wisent, 311-010-CL
Ca-Mg'lu Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (w)	Capricorn Scientific, PBS-2A
Trypsin-EDTA	Wisent, 325-043-EL
Trypan Mavi	Sigma, RNB7486
MTT	Bio-Basic, T0793
Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)	Capricorn Scientific, PS-B
FITC AnneksinV-PI Kit	BD Pharmingen, 556547
MitoTracker	Thermo, M7512
Trisin	Alfa Aesar, A14695.14
Tris	Sigma, T1503
Akrilamid	Merck, K31503209324
N,N'-Metilen Bisakrilamid	Merck, K32544046409
Amonyum Persülfat (APS)	Merck KGaA, 94 2300-OP

Tablo 3. (Devam)

Bromofenol Mavisi	Merck, 1081220005
Glisin	Sigma, G8898
Gliserol	Sigma, G9012
İnsülin	Sigma, I4011
Protein Markır	Promega Corporation,V8491
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED)	Merck, 1107320100
B-Merkaptoetanol	Merck, S4067940407
Commasie Brilant Mavisi R-250	Sigma, 112553
Glasial Asetik Asit	Merck, 137000
Metanol	Merck, 106009
%37'lik Hidroklorik Asit	Merck, 100319
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck, K44 399304-313
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Merck, 8220500100
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, RNBF6887
Etanol	Merck

3.3. Analizi Yapılacak Maddenin Temini ve Saklama Koşulları

Analizde kullanılan numune Karadeniz yerli *Apis mellifera* arı ırkına ait arı zehridir. Bu arı zehri arılara zarar verilmeden uygulanan elektroşok yöntemiyle 2018 yılında elde edilmiş olup Zonguldak Arıcılar Birliği tarafından tarafımıza sağlandı. Yaklaşık 5 g olan zehir -20°C'de alikotlar halinde muhafaza edildi. Gerçekleştirilen tüm analizler bu arı zehri ile gerçekleştirildi.

3.4. Arı Zehrinin Elektroferez ile Analizi

Kullanılan arı zehrinin arı zehri olup olmadığını ve içeriğindeki proteinlerin oranlarını belirlemek amacıyla SDS-PAGE elektroforezi gerçekleştirildi. Bunun için SDS-PAGE protokolüne sadece Tris-Trisin tamponu ilave edilerek daha küçük molekül ağırlığına sahip bantların görülmesi sağlandı (77–79).

3.4.1. SDS-PAGE için Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Arı Zehri (5 mg/mL): 25 mg arı zehri tartılıp üzerinde 5 mL %0.9'luk sodyum klorür eklendi ve çözünmesi sağlandı. Oluşan çözelti -20 °C'de saklandı.

Tris-Trisin Tamponu: Bir beherde 15.13 g Tris ve 22.4 g Trisin tartılıp 80 ml saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 8.3'e ayarlanıp son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl (1 M) Yığma Jeli Tamponu: 60.56 g Tris tartılıp 450 mL ddH₂O'da çözüldü. Çözeltinin pH'sı 6.8'e ayarlanıp son hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): Bir beherde 10 g SDS tartılıp bir miktar ddH₂O'da çözüldü ve son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

%10'luk Amonyum Persülfat (APS): Bir beherde 10 g APS tartıldı ve bir miktar ddH₂O'da çözülüp oluşan çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED): Herhangi bir seyreltme yapılmadan direk kullanıldı.

%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi: Bir beherde 14.6 g akrilamid ve 0.4 g N,N'-metilen bisakrilamid tartılıp bir miktar ddH₂O'da çözüldü ve çözeltinin son hacmi 50 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 4 °C'de saklandı.

%0.1'lik Bromofenol Mavisi: 25 mg bromofenol mavisi tartıldı ve bir miktar ddH₂O'da çözülüp son hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

Yükleme Çözeltisi: 300 µL 1 M'lık Tris-HCl (pH 6.8), 800 µL %10'luk SDS, 200 µL %0.1'lik bromofenol mavisi, 500 µL %80'lik gliserol ve 120 µL β-merkaptoetanol karıştırıldı ve -20 °C'de saklandı.

Yürütme Tamponu: 14.4 g Tris ve 3 g glisin yaklaşık 960 mL ddH₂O'da çözündükten sonra üzerine 20 mL %10'luk SDS çözeltisi ilave edildi ve pH 8.3'e ayarlandı çözeltinin son hacmi ile 1 000 mL'ye tamamlandı.

Jel Boyama Çözeltisi: 2 g Coomassie-Brillant Blue R250 boyasına 125 mL glasiyal asetik asit ve 187 mL metanol eklenip çözünmesi sağlandı.

Boyayı Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.4.2. SDS-PAGE Elektroforez Protokolü

BIO-RAD Mini PROTEAN© Tetra Cell 4-gel hand casting system ile elektroforez işlemi yapıldı. Elektroforez camları etanol ile silindi ve cihaza yerleştirildi. Daha sonra camların sızdırıp sızdırmadığı kontrolü ddH₂O pipetlenerek kontrol edildi. Kullanılan jeller Tablo 4'te gösterildiği gibi hazırlandı.

Tablo 4. SDS PAGE elektroforezinde kullanılan jeller

Bileşenler	%5'lik Yığma Jeli (mL)	%12'lik Ayırma Jeli (mL)
Saf Su	1.4	1.6
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0.33	2.0
Tris-Trisin Tamponu (pH 8.3)	0.25	1.3
%10'luk Amonyum persülfat	0.02	0.05
%10'luk SDS	0.02	0.05
TEMED	0.002	0.002

%12'lik ayırma jeli karışımı camlar arasına pipetlendi ve yüzeyinin düz olması için jelin üst kısmında kalan boşluğa ddH₂O doldurulup donması için 30 dakika beklenildi. Jel donduktan sonra ddH₂O döküldü. Tablo 4'teki gibi hazırlanan %5'lik Yığma Jeli karışımı ayırma jelinin üzerine döküldü. Örneklerin koyulacağı kuyucukların oluşması için tarak takıldı ve jelin donması için 30 dakika beklendi. Ardından tarak çıkarıldı. Örnekler ile örnek yükleme çözeltisi sırasıyla 15 µL ve 35 µL oranlarında ependorflarda karıştırıldı. Daha sonra örnekler, 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edildi. Örnekler ve standartlar kuyucuklara yüklendi. Ardından jeller elektroforez tankına takıldı. Tank, yürütme tamponu ile dolduruldu ve elektrotlar takılarak güç kaynağına bağlandı. 40-50 mA'de 4 saat yürütme gerçekleştirildi. Yürütme sonunda camlar alınıp birbirinden ayrılması sağlandı. Jel, yapışık olduğu cam yüzeyinden spatula ile dikkatlice ayrıldı. Ayrılan jel, bantların görünmesi için boyama yapmak üzere bir kaba alındı. Kaba, jel boyama çözeltisi koyulup jelin 20 dk çalkalayıcıda çalkalanması sağlandı. Boyama gerçekleştikten sonra boyama çözeltisi döküldü. Ardından kaba, boya uzaklaştırma çözeltisi eklenip 30 dk çalkalayıcıda jel çalkalandı. Bu yıkama işlemi boya tamamen uzaklaşmaya kadar devam ettirildi.

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmalarda kullanılan hücreler KTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Hücre Kültür Laboratuvarı hücre stoğundan temin edildi. Tüm hücre kültürü çalışmaları bu laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.5.1. Kanser Hücreleri

Çalışmalarda kullanılan kanser hücre serileri hücre kültür laboratuvarının stoğunda bulunan metastatik meme kanser hücre serisi olan MDA-MB-231 ve karaciğer kanser hücresi HepG2'dir. Bu hücreler daha önce üzerinde arı zehri denenmemiş hücreler olması sebebiyle seçilmiştir.

3.5.1.1. Metastatik Meme Kanser Hücre Serisi

MDA-MB-231 için büyüme medyasında %10 FBS ve %1 Pen-Strep içeren RPMI 1640 medyası kullanıldı. Hücreler steril ortamda 37°C'de %5 CO₂ bulunan etüv ortamında kültür edilip çoğaltıldı. Hücrenin stoklanması için kullanılacak dondurma medyası %20 FBS, %10 DMSO ve %1 Pen-Strep içeren RPMI 1640'tan oluşmaktadır.

3.5.1.2. Karaciğer Kanser Hücre Serisi

HepG2 için büyüme medyasında %10 FBS ve %1 Pen-Strep içeren EMEM medyası kullanıldı. Hücreler steril ortamda 37°C'de %5 CO₂ bulunan etüv ortamında kültür edilip çoğaltıldı. Hücrenin stoklanması için kullanılacak dondurma medyası %20 FBS, %10 DMSO ve %1 Pen-Strep içeren EMEM'den oluşmaktadır.

3.5.2. Sağlıklı Hücreler

Fare embriyonik fibroblast hücresi olan NIH/3T3 bu çalışmada negatif kontrol olarak kullanıldı. Hücrenin büyüme medyasında %10 BCS ve %1 Pen-Strep içeren DEMEM medyası kullanıldı. Hücreler steril ortamda 37°C'de %5 CO₂ bulunan etüv ortamında kültür edilip çoğaltıldı. Hücrenin stoklanması için kullanılacak dondurma medyası %20 BCS, %10 DMSO ve %1 Pen-Strep içeren DEMEM'den oluşmaktadır.

3.5.3. Hücrelerin Çoğaltılması, Pasajlanması ve Dondurulması

Steril kabin UV ışık altında 10 dk tutuldu. Daha sonra kabin ve kullanılacak tüm malzemeler %70'lik etanolle silindi. Steril ortamda yapılması gereken tüm işlemler kabinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin büyüme medyaları ve Ca/Mg içermeyen PBS 37°C'lik su banyosunda 15 dk ısıtıldıktan sonra etanolle silinip kabine alındı. Hücre stoğundan her hücre

için birer vial alınıp 37°C'lik su banyosunda çözünmesi sağlandı ve etanolle silinip kabine alındı. Ardından 15 mL'lik falkona vial içeriği pipetle aktarıldı ve 127xg'de 6 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj işlemi canlı hücrelerin dibe çöküp pellet oluşturmalarını sağlarken ölü hücrelerin üst sıvı kısmında süspanse olmasını sağlar. Santrifüj tamamlanınca falkon kabine alınıp üst sıvı kısım dekante işlemiyle atıldı. Falkonda kalan pellet kısım üzerine 1 mL büyüme medyası pipetlenip hücreler süspanse hale pipetajlanarak getirildi. Bu süspanse hücre karışımından 10 µL alınıp bir ependorfa koyuldu. Üzerine 10 µL tripan mavisi eklendi ve pipetle iyice karıştırıldı. Bu karışımdan otomatik hücre sayacının hemositometre lam-lamelili arasına 10 µL pipetlendi ve sayım yapıldı. Çıkan sonuca göre her hücre serisi için bir flaskta (T75; 75 cm²'lik) 2milyon hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Bir flaskta büyüme medyası toplam hacmi 15mL'ye tamamlandı. Flask 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Hücreler flaskın %80'ini doldurana kadar bekletildi ve gün aşırı medyaları değiştirildi. Bu işlemler sırasında hücreler her gün invert mikroskop ile kontrol edildi.

Yeterince çoğalan hücreler kabine alındı. Flask içindeki büyüme medyası atıldı ve hücrelerin olduğu yüzey Ca/Mg içermeyen PBS ile yıkandı ve PBS atıldı. Önceden 37°C'lik su banyosunda ısıtılan tripsinden 3 mL bir flaskta eklendi ve tüm yüzeye yayılması sağlandı. Ardından flask 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona 6 dk bırakıldı. Bu işlem sırasında eklenen tripsin hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmasını sağlayacak. Süre sonunda flask invert mikroskop altında kontrol edildi yüzeyden kopmayan hücre varsa flask hafifçe vurularak kopması sağlandı. Ardından tripsini inhibe etmesi amacıyla 6 mL büyüme medyası flaskı yıkayarak eklendi ve tüm hücreli medya pipetle toplanıp santrifüj tüpüne koyuldu. Ölü hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için 127xg'de 6 dk santrifüj yapıldı (tripsinizasyon işlemi). Üst kısımda kalan sıvı dekante edilip pellet medyada süspanse edildi ve sayım yapıldı. Çıkan sayıya göre hücreler flasklara bölündü ve inkübasyona bırakıldı. Böylece pasaj işlemi tamamlanmış oldu.

Pasajlarla birlikte çalışmalarda kullanılacak yeterince sayıda hücreye ulaşınca hücre dondurma işlemi gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle her hücre için dondurma medyası hazırlandı. Flasklardaki hücrelere tripsinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj işleminin ardından pellet dondurma medyası ile süspanse hale getirilip tripan mavisi ile sayım yapıldı. Hücre sayısına göre bir kriyoviale bir milyon hücre gelecek şekilde hücreler alikotlandı. Bu işlem sırasında kriyoviallerle buz içinde muamele edilerek hücrelerin aşamalı şekilde

dondurma işlemi gerçekleştirilmeye başlandı. Daha sonra kriyoviallerdeki hücreler -80°C’de bir gece bekletildi ve ardından -196°C’deki azot hücre stok tankına yerleştirildiler. Böylece hücrelerin kademeli dondurma işlemleri tamamlanmış oldu.

3.6. Arı Zehrinin Hazırlanması

Liyofilize arı zehrinden 25 mg bir falkona alındı. Üzerine 5 mL %0.9’luk NaCl çözeltisi eklenip çözünene kadar vorteks ile karıştırıldı. Ardından steril ortamda 0.22 µm’lik filtreden geçirildi. Hazırlanan 5 mg/mL’lik arı zehri ana stok çözeltisi -20°C’de saklandı. Ana stok çözeltisi yapılan çalışmalarda seyreltilerek kullanıldı.

%0.9’luk NaCl Çözeltisi: Bir beherde 0.9 g NaCl tartılır üzerine bir miktar ddH₂O eklenip son hacim balon jode 100 mL’ye tamamlandı.

3.7. Sitotoksisite Analizi: MTT Testi

Arı zehrinin metastatik meme, karaciğer kanser hücreleri ve sağlıklı fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla ilk olarak MTT testi gerçekleştirildi. Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT kristali aktif canlı hücrelerce mavi-mor renkli formazon kristaline dönüştürülür. Bu da uygulanacak maddenin hücreler üzerindeki canlılık oranının belirlenmesine yardımcı olur. Bu amaçla MTT kristalinden 5 mg/mL konsantrasyonunda çözelti hazırlandı ve kullanıldı.

MTT deneyinin ilk aşamasına başlamadan önce steril kabin etanolle silinip kullanılacak tüm malzemeler steril hale getirildi. Önceden çoğaltılıp dondurulan hücrelerden bir kriyovial stoktan alındı ve 37°C’lik su banyosunda çözünmesi sağlandı. Steril kabinde tüm kriyovial içeriği falkona alınıp 127xg’de 6 dk santrifüjlenip ölü hücreler ortamdan uzaklaştırıldı. Otomatik hücre sayacında sayım yapıldı. Daha sonra 96 kuyucuklu plakada kuyucuk başına 5 000 hücre olacak şekilde hücre ekim çözeltisi hazırlandı ve kuyucuk son hacmi 100 µL olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin plaka tabanına yapışması için 24 saat beklenildi. Ana stok arı zehri literatür taramaları sonucu belirlenen doz aralığı 1.56-400 µg/mL olacak şekilde her hücrenin kendi büyüme medyası ile seyreltildi (80–82). 96 kuyucuklu plakadaki büyüme medyası uzaklaştırılıp hazırlanan arı zehirli medyalar 100’er µL eklendi ve 37°C’de %5 CO₂’li ortamda 24 saat muamele edildi. Süre sonunda karanlık bir ortamda her kuyucuğa 5 µL MTT çözeltisinden steril ortamda eklendi ve 4 saat 37°C’de %5 CO₂’de inkübe edildi. Daha sonra her kuyucuğa 100’er µL reaksiyon durdurucu çözelti

eklendi. Folyoya sarılı plaka 24 saat boyunca çalkalayıcıda 40 rpm’de çalkalandı. Oluşan rengin yoğunluğu 570 nm’de spektrofotometrede ölçüldü.

Yapılan ön denemelerde arı zehri doz aralıkları hücrelere göre daraltıldı. Bu dozlar MDA-MB-231 için 0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 µg/mL ve 25; HepG2 için 0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µg/mL; NIH/3T3 için 0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 µg/mL’dir. Deneyler, üçer deney içi tekrar üçer de bağımsız deney tekrarı olmak üzere gerçekleştirildi. Elde edilen absorbanslarla % hücre canlılığı hesaplandı ve logaritmik konsantrasyonlara karşı grafik çizildi. Grafikten elde edilen denklemden IC₅₀ değeri hesaplandı (83–85). IC₅₀ değeri hücre büyümesinin %50 inhibisyonunu temsil etmektedir. Kanser hücrelerinde çoğalmanın arı zehrinin düşük konsantrasyonlarında durması ve hücre yaşamının sonlanması beklenirken sağlıklı hücrelerde ise bu konsantrasyonlarda etkisinin olmadığı belirlenmek istenmektedir.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

5 mg/mL’lik MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)]-2,5-difenil tetrazolyum bromür) Çözeltisi (pH 7.4): Folyo sarılmış bir falkona 25 mg MTT kristalinden tartıldı üzerine 5 mL Ca/Mg içermeyen PBS steril ortamda eklendi. Ardından vorteks yardımıyla kristalin çözünmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti steril ortamda 0.22 µm’lik filtreden geçirildi ve alikotlanıp -20°C’ye kaldırıldı. Tüm işlemler MTT’nin ışığa duyarlı olması sebebiyle karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Reaksiyon Durdurucu Çözeltisi: Bir balon jojeye 50 mL %20 SDS çözeltisinden koyuldu. Üzerine 100 µL %37’lik HCl eklenip karıştırıldı. Son hacim ddH₂O ile 100 mL’ye tamamlandı

%20’lik SDS Çözeltisi: Bir behere 20 g SDS tartıldı ve magnetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Gerekirse 68°C’ye kadar ısıtılabilir. Çözelti bir balon jojeye alınıp son hacim 100 mL’ye ddH₂O ile tamamlandı.

%37’lik HCl Çözeltisi: Orijinal şişesinden kullanıldı.

3.8. Hücre Ölümünün Analizi (Apoptoz/Nekroz)

Arı zehrinin sağlıklı ve kanser hücrelerinde hücre ölümüne (apoptoz ve/veya nekroz) olan etkisini incelemek için ticari bir kit (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit)

kullanılmıştır. Apoptoz, hücrenin doğal hücre ölümü iken nekroz ise dış etkenlerle tetiklenen hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Kite floresans bir madde olan FITC ile işaretlenmiş anneksin-V ile propidyum iyodür (PI) olmak üzere iki boya yer almaktadır.

Propidyum iyodür hücre membranından geçemeyen bir boyadır. Bu yüzden hücre membran bütünlüğü bozulmamış canlı hücrelerden geçemez. Floresans özellik gösteren PI molekülü membran bütünlüğü bozulmuş veya ölü hücrelerde nükleik asitlerle interkalasyona girer. Bu da ölü hücreleri tespit etmeye yardımcı olur. Bu boyama sayesinde nekroz gerçekleşen hücreler tespit edilir. Apoptotik hücreleri bozulmamış membrana sahiptir. Apoptoz başladıktan sonra membranın iç yüzünde yer alan fosfatidilserin yer değiştirerek membranın dış yüzeyine geçer. Fosfatidilserin için yüksek ilgiye sahip bir protein olan ve floresans bir maddeyle işaretlenmiş anneksin-V'ye bağlanır. Bu iki boyama işlemi tespitinde floresans mikroskobu veya flow sitometri cihazı kullanılır (49).

MTT testi sonuçları ve yapılan istatistiksel değerlendirmeler yardımıyla kullanılacak dozlar 0, 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL olarak belirlendi. Stok hücre tankından her hücre için altı kriyovial (altı milyon hücre) T75 flaskına hücre açma işlemi adımlarını izleyerek açıldı ve bir gün 37°C'de %5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı. Tripsinizasyon işleminin ardından her doz için ayrı ayrı T25 (25 cm²'lik) flasklarına birer milyon hücre ekildi ve bir gün 37°C'de %5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı. Ana stok arı zehri 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarına göre büyüme medyası ile seyreltildi ve flasklara eklendi. Aynı zamanda negatif kontrol için arı zehri içermeyen büyüme medyası 0 µg/mL olarak etiketlenmiş flaska eklendi. Flasklar 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'de inkübe edildi. Daha sonra arı zehirli medyalar ortamdan uzaklaştırılıp flask içeriği Ca/Mg'suz PBS tamponuyla yıkandı ve ortamdan uzaklaştırıldı. Tripsinizasyon işlemi aşamaları izlenerek canlı hücreler 15 mL'lik falkonlara toplandı. Falkonlara soğuk Ca/Mg'suz PBS tamponu eklendi ve pipetaj yaparak hücreler yıkanıp santrifüj yapıldı. Sıvı kısım uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi 2 kez yapıldı. Ardından kit içerisinde yer alan 10X bağlayıcı tampon 1X'e seyreltilip 1'er mL falkonlara eklenip pellet hücre süspanse hale getirildi. Falkonlardan 100 bin hücre için 100'er µL kapaklı 1.5 mL'lik tüplere alındı. Karanlık ortamda anneksin-V FITC ve PI solüsyonlarından 5'er µL tüplere eklendi ve tüpler hafifçe karıştırıldı. Daha sonra 45 dk oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplere 400'er µL 1X bağlayıcı tampon ilave edilip 1 saat içinde flow sitometri cihazında analiz gerçekleştirildi. Analiz sonucunda apoptotik hücre (anneksin V pozitif - PI negatif), nekrotik hücre (anneksin V

pozitif - PI pozitif) ve canlı hücre (anneksin V negatif - PI negatif) popülasyonları karşılaştırılıp arı zehrinin hücrelerdeki apoptoz ve nekrozu indüklemesi üzerine olan etkisi saptandı.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1X Bağlayıcı Tampon: Kite yer alan 10X bağlayıcı tampondan 1 mL alınıp üzerine 9 mL ddH₂O eklendi.

3.9. Mitokondri Membran Potansiyelinin Tespiti

Mitokondri, hücrelerin yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli olan enerjiyi sağlayan organellerdir. Mitokondrinin enerji üretimi için gerekli olan fizyolojik aktivitesini mitokondri membran potansiyeli ile belirlenir. Mitokondriyal membran geçirgenliğindeki kayıp, ATP üretiminin inhibisyonuna neden olmakta, böylece apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin ölümüne davetiye çıkarmaktadır (52). Dolayısıyla potansiyel ilaç olarak uygulanan ilaç ve/veya ilaç benzeri moleküllerin mitokondri membran potansiyelini düşürmeyi hedefleyebilir.

Her doz için 1'er milyon hücre T25 flasklarına ekildi ve 1 gün inkübasyona bırakıldı. Ardından arı zehri 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarına seyreltilip hücrelere uygulandı. Etüvde 37°C'de %5 CO₂'de 24 saat inkübasyon sağlandı. Daha sonra arı zehirli medyalar ortamdan uzaklaştırılıp hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulandı. İşlemin ardından falkonlara alınan hücreler Ca/Mg'suz PBS ile 2 kez yıkandı. Mitokondri membran potansiyelinin belirteci olan 400 nM olarak hazırlanan MitoTracker Red boyası birer mL falkonlara eklenip hücreler 37°C'de 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra santrifüj yapıp boyalı medyalar ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi Ca/Mg'suz PBS ile yapıldı, medya uzaklaştırılıp pellet 500 µL Ca/Mg'suz PBS ile süspanse edildi. Daha sonra hücreler flow sitometrisi cihazında kırmızı kanalda analiz edildi. Floresans ışımının miktarı, mitokondri membran potansiyeli ile doğru orantılıdır.

Mitokondri boyama işlemi floresans mikroskobu ile de değerlendirildi. Bunun için hücreler 5 000 hücre/kuyu konsantrasyonunda 96 kuyucuklu plaka üzerine ekilip hücreler 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonundaki arı zehri ile muamele edildi. Tampon ile yıkama işleminin ardından 400 nM olarak hazırlanan MitoTracker Red boyasından 100'er µL kuyucuklara karanlık ortamda eklendi ve 37°C'de 45 dakika inkübe edildi. Süre sonunda

boyalı medya uzaklaştırıldı ve tampon ile kuyucuklar yıkandı. Hücrelerin mikroskop altındaki gözlem süresini uzatmak amacıyla hücreler %4 paraformaldehid (PFA) ile sabitlendi. Bunun için hazırlanan paraformaldehid çözeltisinden kuyucuklara 100'er µL eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında plaka bekletildi. Ardından ortamdan uzaklaştırılıp tampon ile yıkandı ve tampon eklenip +4°C'de saklandı. Daha sonra mikroskop altında ışıma gözlemlendi ve kaydedildi.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1 mM'lık MitoTracker Red Boyası: Ana stok boyayı hazırlamak için kit içerisinde yer alan boya viallerinden bir tane alındı. İçerisine 94.07 µL DMSO eklendi ve çözünmesi karanlık ortamda sağlandı. Daha sonra kullanılmak üzere alikotlanıp -20°C'ye kaldırıldı.

400 nM'lık MitoTracker Red Boyası: 1 mM'lık MitoTracker ana stok boyasından 4 µL alınıp son hacim medya ile 10 mL'ye tamamlandı. Her hücrenin boya seyreltme işlemi kendi medyası ile yapıldı.

%4'lük Paraformaldehid (PFA) Çözeltisi: Bir behere 4 g PFA tartılır. Üzerine 100 mL ddH₂O ve 150 µL 1M NaOH eklendi ve magnetik karıştırıcıda 37°C'de çözünmesi sağlandı. Çözünme gerçekleştirildikten sonra 0.98 g PBS eklendi ve çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı. Filtrelenip alikotlandı ve -20°C'ye kaldırıldı.

0.98 g'lık PBS Karışımı: 0.8 g NaCl, 0.02 g KCl, 0.144 g Na₂HPO₄ ve 0.024 g KH₂PO₄'ten oluşmaktadır.

1 M'lık NaOH Çözeltisi: 0.4 g NaOH alınıp bir miktar ddH₂O ile çözünmesi sağlandı. Son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

3.10. İstatistiksel Analiz

Yapılan tüm çalışmalarda arı zehrinin hücreler üzerindeki etkisinin anlamlı bir değişikliğe neden olup olmadığı gerçekleştirilen istatistiksel analizler sayesinde belirlendi. Bu amaçla sonuçlara SPSS programında UNIANOVA (univariate analysis of variance) testi yapıldı. Karşılaştırmalar anlamlılık derecesi p değerinin 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***) ve 0.0001 (****)'den küçük olmasına göre yapıldı. Anlamlılık derecesinin kademeli şekilde değerlendirilmesinin amacı en etkili dozun tespit etmek için gerçekleştirildi. Her deney en az üç bağımsız deney tekrarının ortak sonucunu yansıtmakta olup, grafiklerde verilen hata

barları $\pm$ s.e.m ($\pm$ standard error of the mean) değerlerine göre SPSS programı tarafından otomatik hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler sadece MTT deneyi için yapılmamıştır.

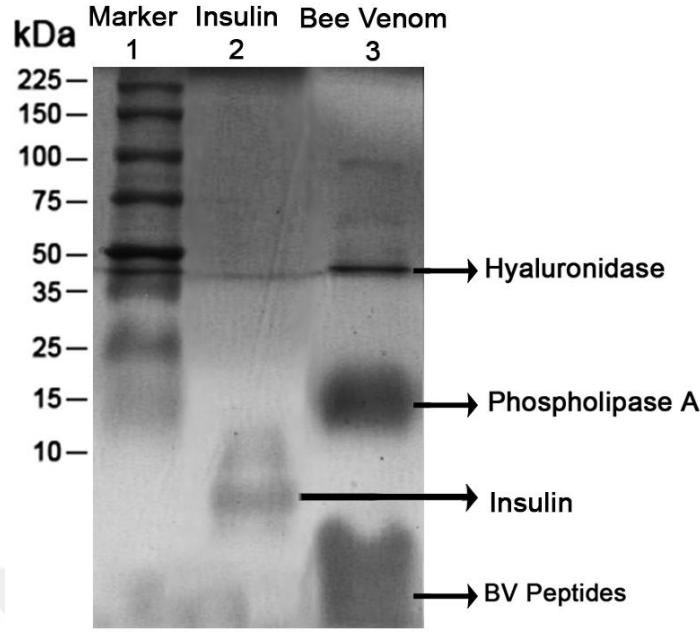


4. BULGULAR

4.1. Arı Zehri SDS-PAGE Elektroforezi

Çalışmada 5 mg/mL olarak hazırlanan arı zehri ve biri insülin olmak üzere iki markır kullanıldı. Arı zehri olup olmadığını anlamak amacıyla tris-trisin tamponu ile SDS-PAGE elektroforezi yapıldı. Ardından yapılan Coomassie-Brilliant Blue R250 boyamasıyla elde edilen jel Resim 1’de gösterilmiştir. Jel görüntüsünde 1 numara protein markırı, 2 numara insülin, 3 numara ise çalışmada kullanılan arı zehri elektroforez görüntüsüdür. Oluşan jel kromatogramında üç büyük bant net olarak, iki bandın da eser miktarda 75 kDa ve 75 kDa’dan daha büyük bir değerde olduğu gözlemlendi. Arı zehrinde molekül ağırlıkları büyük olan proteinler olarak yaklaşık 15 kDa’da fosfolipaz A; yaklaşık 53 kDa’da ise hiyaluronidaz jelde fazla ilerlememiş üst kısımda kalmıştır. Daha küçük molekül ağırlığına sahip peptidler ise jelde daha fazla ilerlemiş dip kısımda birikim göstermiştir (86). Örneğin arı zehrinin yaklaşık %20’lik kısmını oluşturan 10-15 kDa arasında meydana gelen bu bandın fosfolipaz A2 (14 500 Dal) enzimine ait olabileceği düşünülmektedir. Molekül ağırlığı yaklaşık 53 800 Dal olan hiyaluronidaz enzimine ait bant çok net olarak elektroforezde gözlemlenirken, kullanılan markırlara göre 50 kDa arasında bölgede tespit edildi. Örneğin yaklaşık %70’lik kısmının molekül ağırlığı 5 kDa’dan daha düşük bölgede toplandığı tespit edildi. Melittin (2 845 Dal), apamin (2 027 Dal), sekapin (2 866 Dal), MCD-peptit (2 587 Dal) gibi küçük peptit ve proteinlerin molekül ağırlığı 5 kDa’dan daha düşük bölgede toplandığı tespit edildi.

Melittin arı zehrinin major peptidi olup 3 kDa’dan daha düşük molekül ağırlığına sahip ve arı zehrinin %60-70’lik kısmını oluşturmaktadır (86). Sonuç olarak çalışmada kullanılan örneğin arı zehri bileşenleri ile uyumlu olduğu ve ancak tam analizin her bir standardında kullanılması ile hem elektroforetik olarak ve hem de LC/MS-MS ile tespit edilmesi faydalı olacaktır.



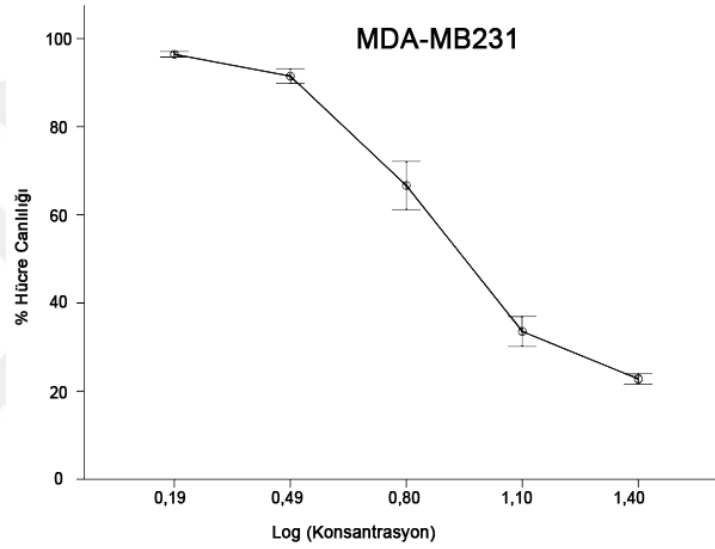
Resim 1. Arı zehrinin SDS-PAGE elektroforezi jel görüntüsü

4.2. MTT Analizi

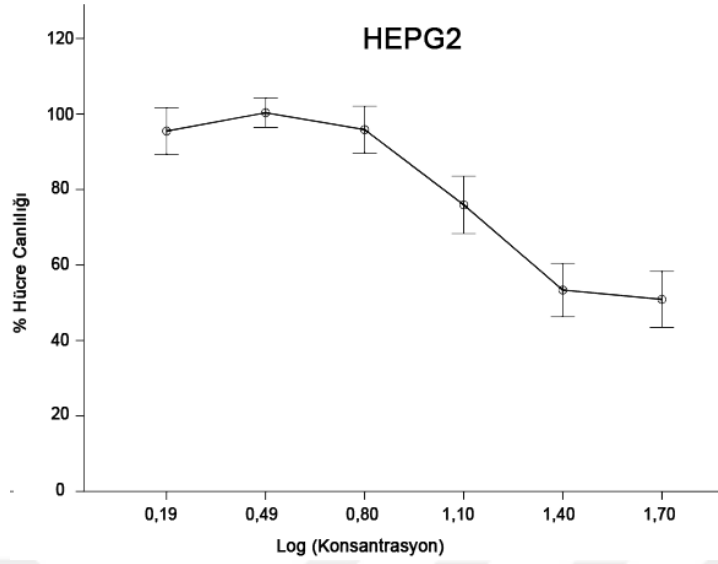
Serum fizyolojik olan %0.9'luk NaCl ile 5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan arı zehrinin metastatik meme kanseri (MDA-MB-231), karaciğer kanseri (HepG2) ve sağlıklı fibroblast (NIH/3T3) hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkisi ve aynı zamanda IC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla MTT deneyi yapıldı. MTT deneyinin esası; aktif hücrelerin mitokondri dehidrogenaz enzimlerinin NADH'a bağlı olarak sarı renkli tetrazolyum tuzunu (3-(4,5-dimetilhidrazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) indirgeyerek mor-mavi renkli formazon kristallerine dönüştürmesidir. Oluşan kristallerin yoğunlukları hücre canlılığıyla doğru orantılıdır. Canlı olmayan veya mitokondrileri aktif olmayan hücreler bu dönüşümü gerçekleştiremez. MTT analizinin ilk aşamada uygulanmasının amacı arı zehrinin diğer analizlerdeki doz aralığının daraltılmasıdır. Bu dozların belirlenebilmesi için arı zehri 1.56-400 µg/mL'ye seyreltilerek hücrelere uygulandı. Yapılan denemeler sonucunda konsantrasyon aralığı daraltılıp grafikler oluşturuldu.

Arı zehri, MDA-MB-231 hücresi üzerinde (Şekil 3) HepG2 hücresine göre (Şekil 4) daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu görülürken sağlıklı fibroblast hücresinin (Şekil 5) ise kanser hücrelerine göre arı zehrine karşı daha dirençli olduğu saptandı. Daha sonra bu hücreler için arı zehrinin etki ettiği IC₅₀ (%50 inhibitory concentration) dozları hesaplandı. Bunun için arı zehri uygulanmayan yani negatif kontrol grubu olarak kullanılan hücrelerin

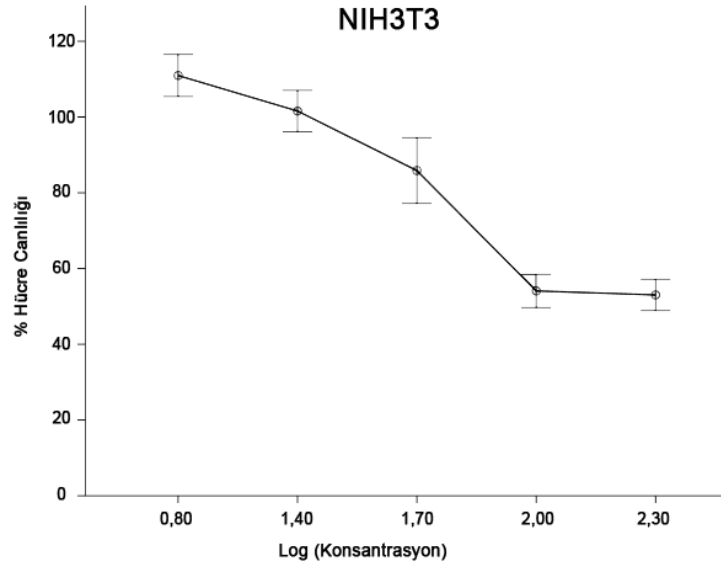
absorbansı ve arı zehri uygulanan hücrelerin absorbansı ile % hücre canlılığı hesaplandı. Ardından uygulanan konsantrasyonların logaritması alındı. Bu iki parametreyle oluşturulan grafikten elde edilen denklem üzerinden IC_{50} değeri hesaplandı. Bu hesaba göre MDA-MB-231, HepG2 ve NIH/3T3 hücreleri için IC_{50} değerleri sırasıyla; 8, 12 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Aynı zamanda istatistiksel analizle 25 $\mu\text{g/mL}$ değeri ve NIH/3T3 hücresi için öldürücü bir doz olarak 100 $\mu\text{g/mL}$ değeri seçilmiştir. Böylece yapılacak diğer deneylerde kullanılacak arı zehri dozları tüm hücreler için 8, 12, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.



Şekil 3. Arı zehrinin MDA-MB-231 üzerindeki hücre canlılık oranı (%)

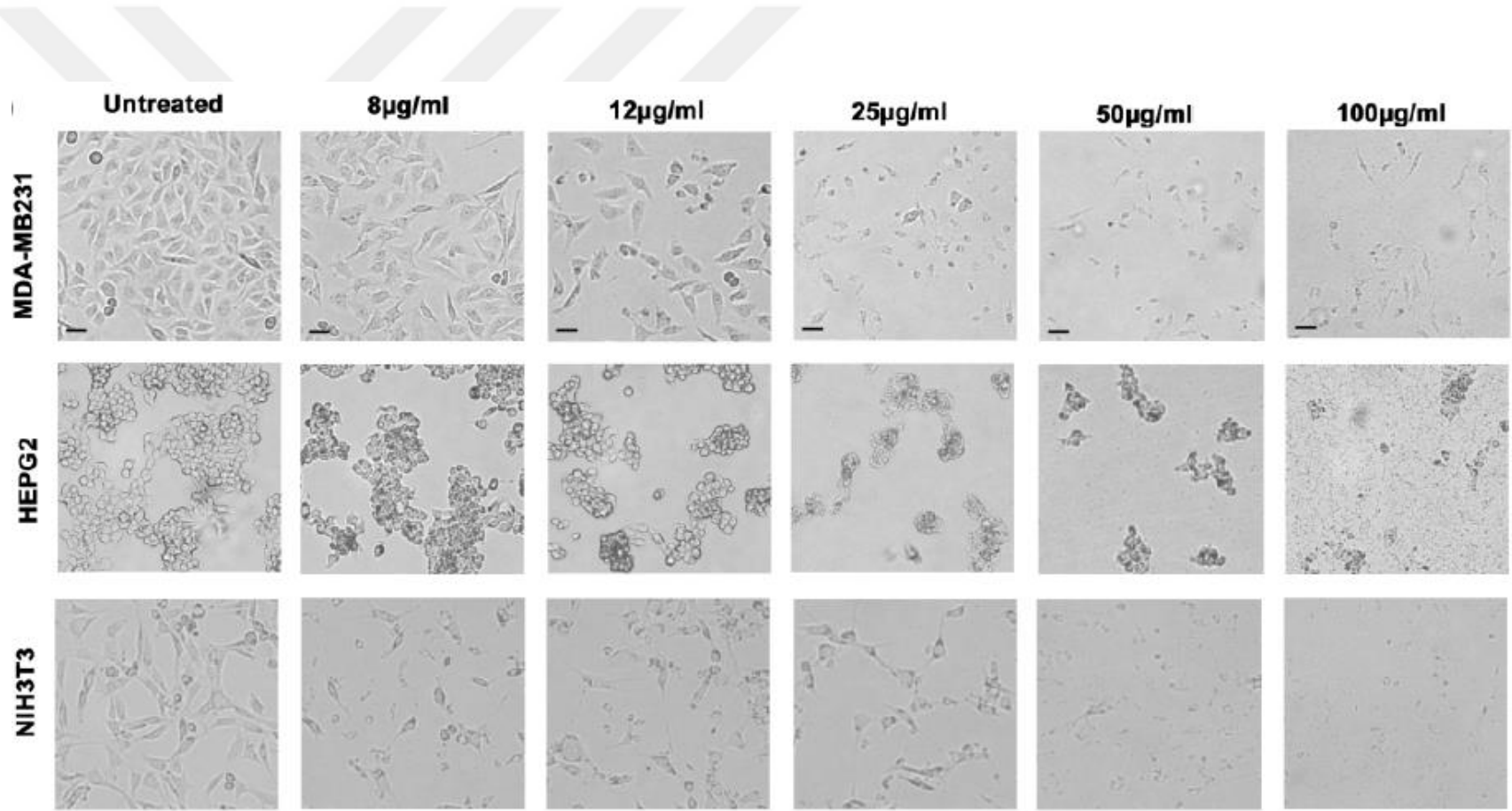


Şekil 4. Arı zehrinin HepG2 üzerindeki hücre canlılık oranı (%)



Şekil 5. Arı zehrinin NIH/3T3 üzerindeki hücre canlılık oranı (%)

MTT analizi esnasında hücrelere 24 saat uygulanan arı zehri dozlarının hücreler üzerindeki etkisinin morfolojik görüntüsü invert mikroskop ile gözlemlenip kaydedildi. Resim 2’de verilen görüntülerden de anlaşılacağı üzere arı zehrinin hücreler üzerindeki etkisi doğrulanmıştır.



Resim 2. Arı zehrinin hücreler üzerinde 24 saat etkisinin morfolojik görüntüleri

4.3. Hücre Profillerinin Değerlendirilmesi

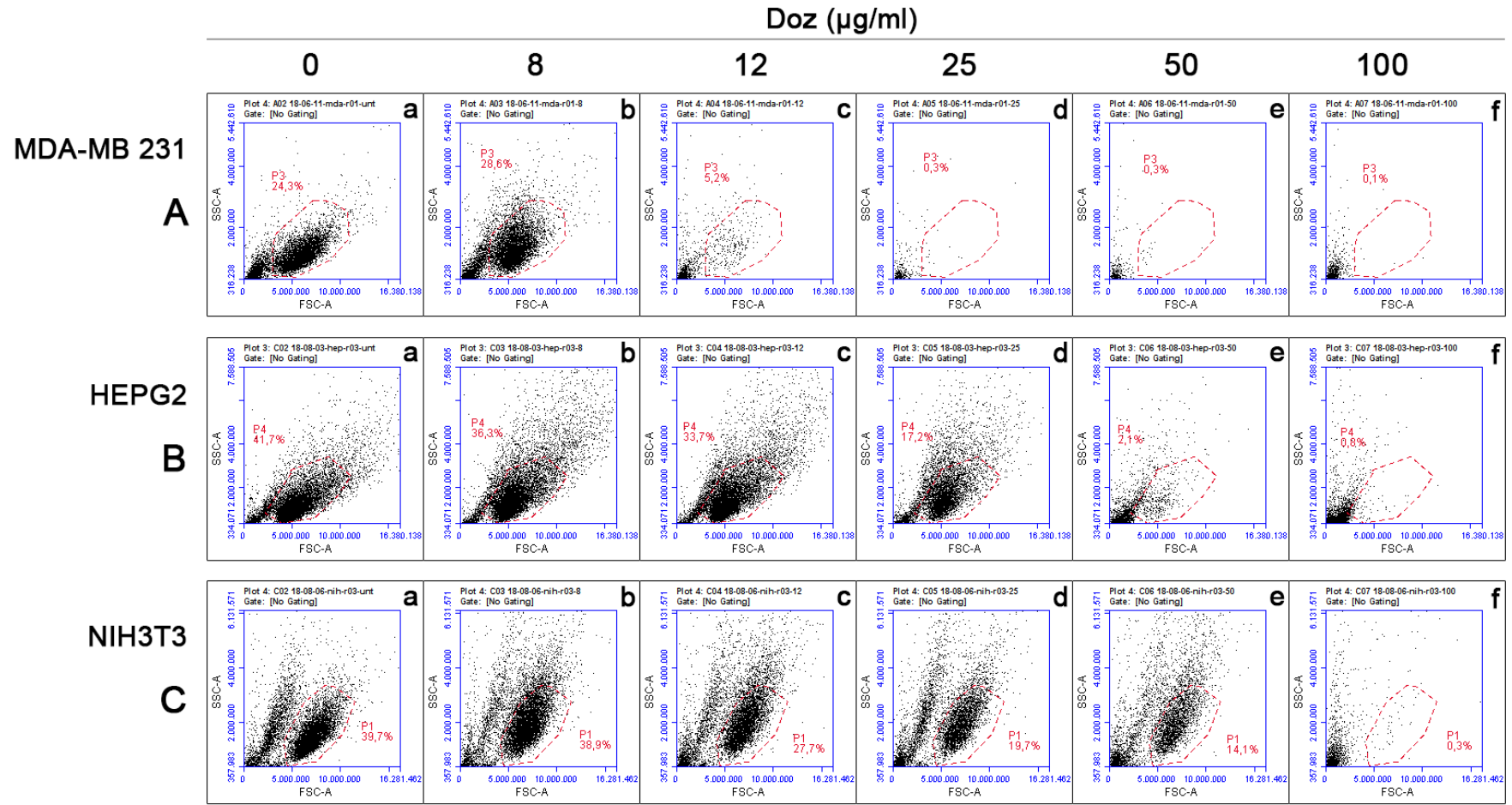
Flow sitometrisi ile yapılan anneksin/PI ve mitokondri deneylerinde MTT ile belirlenen 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL arı zehri dozları hücreler üzerinde 24 saat uygulanmadan önce MDA-MB-231, HepG2 ve NIH/3T3 hücrelerinin flow sitometrisindeki karakteristikleri FSC-SSC (Forward Scatter-Side Scatter) grafikleri yoluyla değerlendirildi (Şekil 6A, MDA-MB-231; Şekil 6B, HepG2; Şekil 6C, NIH/3T3). Burada FSC değeri hücrenin büyüklüğünü, SSC ise hücrenin tanecikli iç yapısını (granülitesini) temsil etmektedir. Akım sitometrisi analizlerinde, parçalanmış hücrelerin ve hücre dışı elemanların analize dâhil edilmemesi için genellikle muamele edilmemiş hücrelerin belirgin yoğunlukta ve orta alanda bulunan popülasyonunun seçilmesi, yani kapılama yapılması, önerilmektedir. Bu genel geçer uygulamaya binaen arı zehri verilmeyen kontrol hücrelerinde yapılan kapılama (Şekil 6A-a, 6B-a, 6C-a) aynı şekilde arı zehri verilmiş tüm hücrelere uygulanarak her doz için belirli bir popülasyon seçildi. Bunlar artan dozlarda soldan sağa doğru belirtilmiştir (Şekil 6A/B/C-b >f). Seçilen bölgelerde doz arttıkça hücre içeriğinin azalması ya da neredeyse hiç hücre içermemesi (Şekil 6-A-B-C) dikkat çekicidir.

Yapılan istatistiksel analizler arı zehri dozuyla ilişkili olarak hücre büyüklük ve granülitenin negatif yönde değiştiğini de desteklemektedir. Örneğin, MDA-MB-231'in hücre büyüklük ve hücre granülite analizinde son üç dozda azalma yönünde anlamlı farklar ($p \leq 0.0001$) gözlemlenmiştir (Şekil 7). HepG2'de ise son iki dozda anlamlı farklar ($p \leq 0.05$) görülmüştür (Şekil 8). Sağlıklı fibroblast hücresinde hücre büyüklüğündeki en yüksek dozda anlamlı bir değişiklik ($p \leq 0.05$) olduğu granülite de ise anlamlı bir farkın olmadığı söylenebilir (Şekil 9) (Her hücre için tüm dozlar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar sonucunda sadece anlamlı olan sonuçlar grafiklerin (Şekil 7-8-9) sağındaki tablolarda gösterilmiştir). Bu bulgular arı zehrinin hücre morfolojisini ve içeriğini ciddi manada etkilediğini göstermektedir.

Kontrol hücrelerinde seçilen hücre popülasyonunun arı zehrinin özellikle yüksek dozlarına maruz kalan hücrelerin popülasyonları ile eşdeğer bölgelerde bulunmaması analizler açısından sorun teşkil etmektedir. Aksi halde yapılacak kapılamalar özellikle yüksek dozlarda doğru bir analize izin vermeyerek yanlış pozitif (false positive) veya yanlış negatif (false negative) sonuçların alınmasına neden olacaktır.

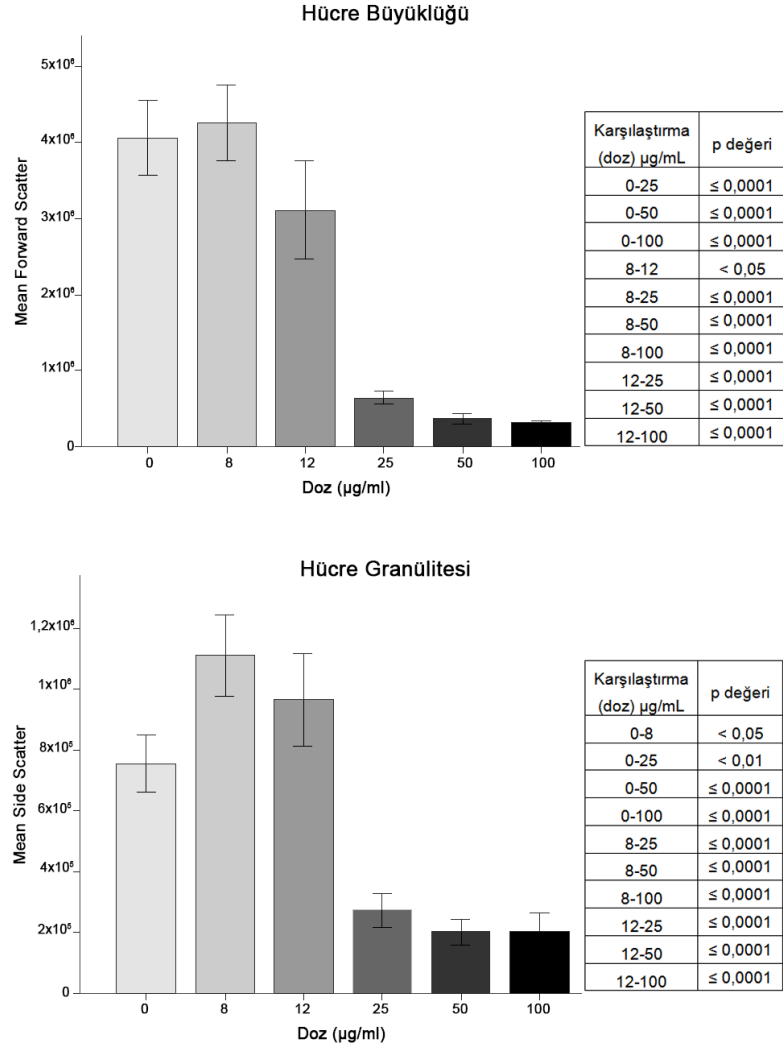
Bu nedenle bundan sonra yapılacak olan flow sitometrisi deneylerinde (anneksin-V ve mitokondri membran potansiyeli) kapılama yapılmadan tüm hücre popülasyonları üzerinden istatistiksel karşılaştırmalar yapıldı.





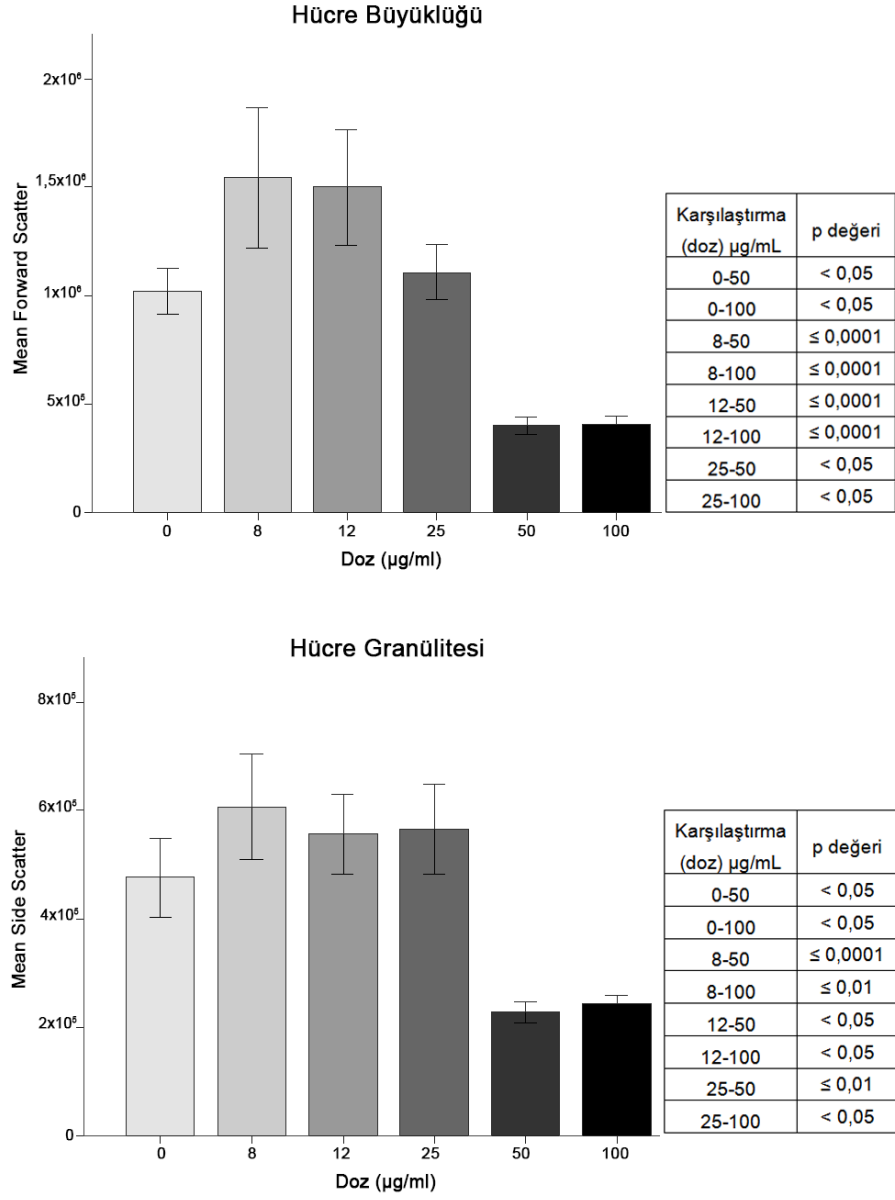
Şekil 6. Arı zehrinden sonra hücre morfolojilerinin flow sitometri FSC-SSC grafikleri yoluyla analizi. A) MDA-MB-231 hücresi, B) HepG2 hücresi, C) NIH/3T3 hücresi.

MDA-MB231 FSC/SSC FLOW SİTOMETRİ



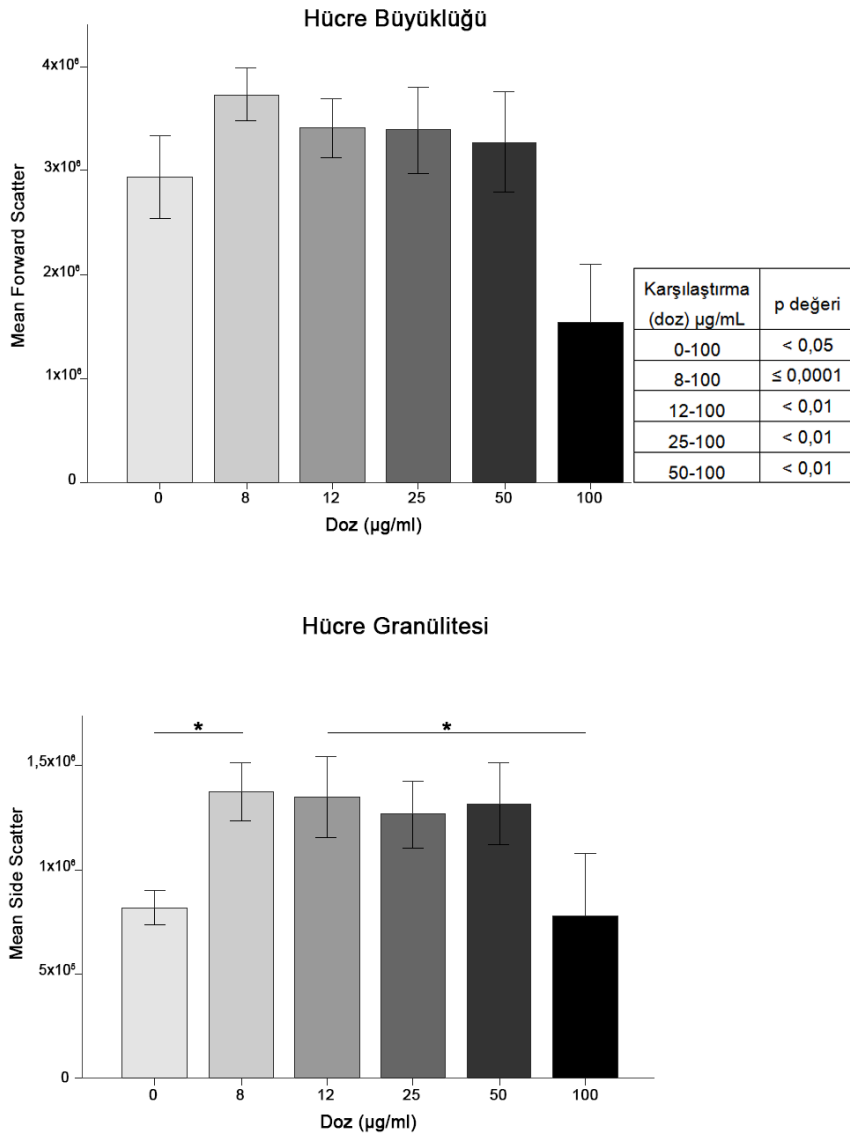
Şekil 7. Arı zehrinden sonra MDA-MB-231 hücresinin FSC-SSC istatistiksel analizi

HEPG2 FSC/SSC FLOW SITOMETRİ



Şekil 8. Arı zehrinden sonra HepG2 hücresinin FSC-SSC istatistiksel analizi

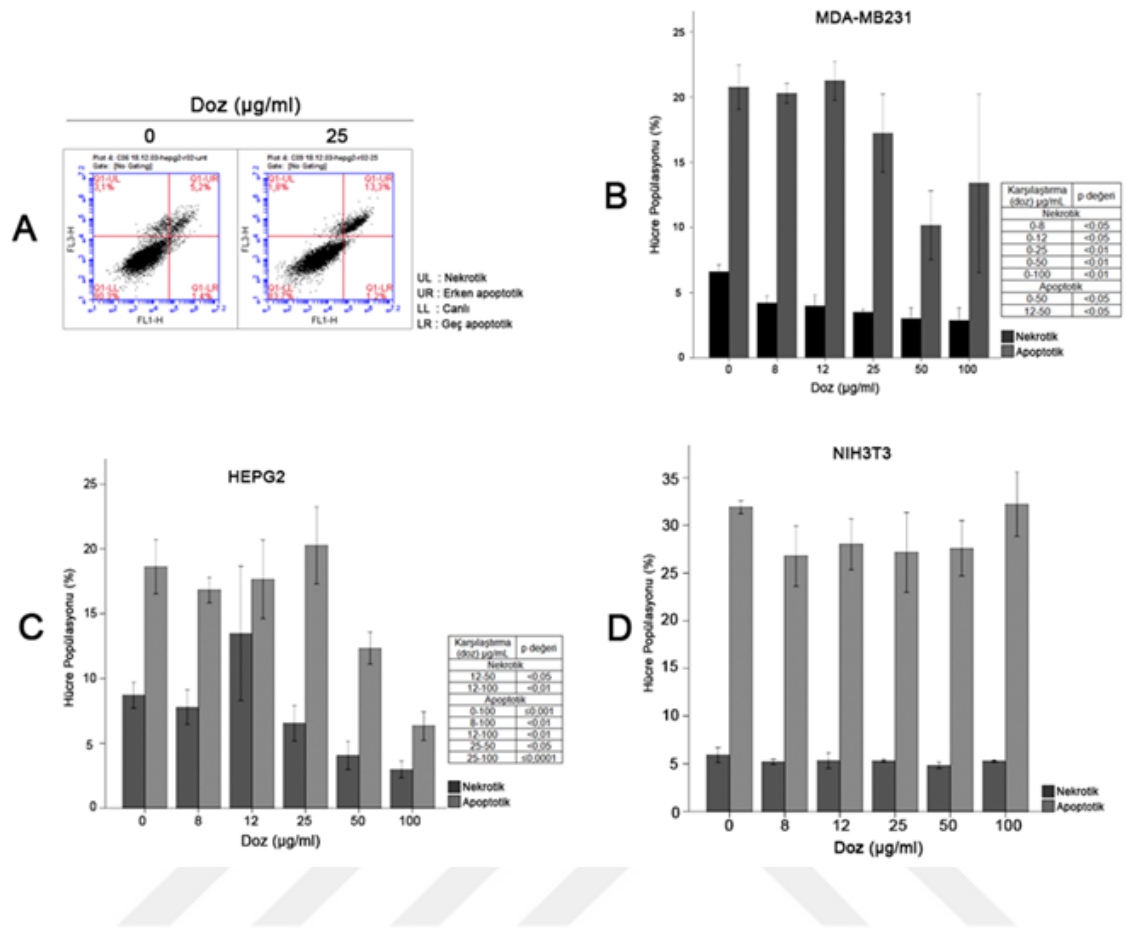
NIH3T3 FSC/SSC FLOW SİTOMETRİ



Şekil 9. Arı zehrinden sonra NIH/3T3 hücresinin FSC-SSC istatistiksel analizi

4.4. Anneksin V-PI Deneyi

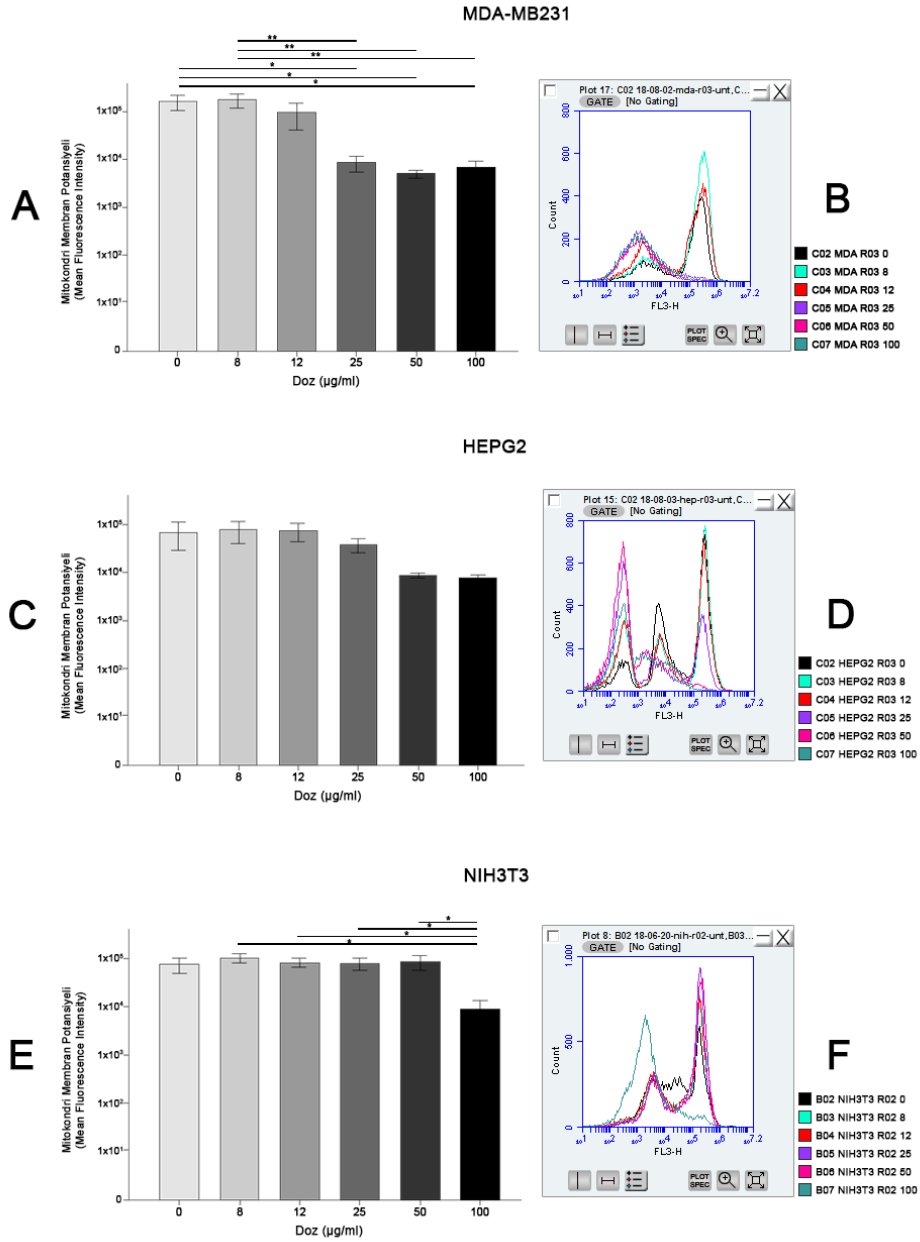
MTT analizi yapılarak belirlenen 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL arı zehirli media dozları Anneksin-V FITC ve PI analizinde kullanıldı. Bu analizde hücrelere aynı anda Anneksin-V FITC ve PI boyama protokolleri uygulandı. Çıkan sonuçlarda hücreler hem yeşil kanalla (FL1-H) tespit edilen Anneksin hem de kırmızı kanalla (FL3-H) tespit edilen PI ışımalarının çakışma profillerine göre değerlendirildi. Sonuçlarla oluşturulan grafiklerde hücre popülasyonu, yine kontrol hücreleri kullanılarak dört ana bölgeye ayrılır. Alt-sol bölge (LL), her iki ışımının da olmadığı canlı hücrelerin popülasyonunu, üst-sol bölge (UL) sadece PI ile boyanmış nekrotik hücre popülasyonunu, alt-sağ bölge (LR) sadece anneksin ışımalarının tespit edildiği henüz apoptozun erken safhasında olan hücrelerin popülasyonunu, üst-sağ bölge ise (UR) her iki ışımının da olduğu geç apoptotik safhada ölü olan hücre popülasyonunu temsil eder (Şekil 10-A). Analizin mantığı bu bölgelere düşen hücre popülasyonlarını (yüzdelelerini) karşılaştırmaktır (68). Bu deneyde geç ve erken apoptotik hücreler (UL ve UR) birlikte değerlendirilmiştir. NIH/3T3 hücrelerinde beklenebileceği üzere arı zehrinin apoptotik ve/veya nekrotik hücrelerin anlamlı olarak değişmesine istatistiksel bir katkısı olmamıştır (Şekil10-D). Ancak beklenenin aksine hem HepG2 hücrelerinde (Şekil 10-B), hem de MDA-MB-231 hücrelerinde (Şekil 10-C) bazı yüksek dozlarda apoptotik ve/veya nekrotik hücrelerin artmak yerine azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 10. Apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının akım sitometrisi ile analizi

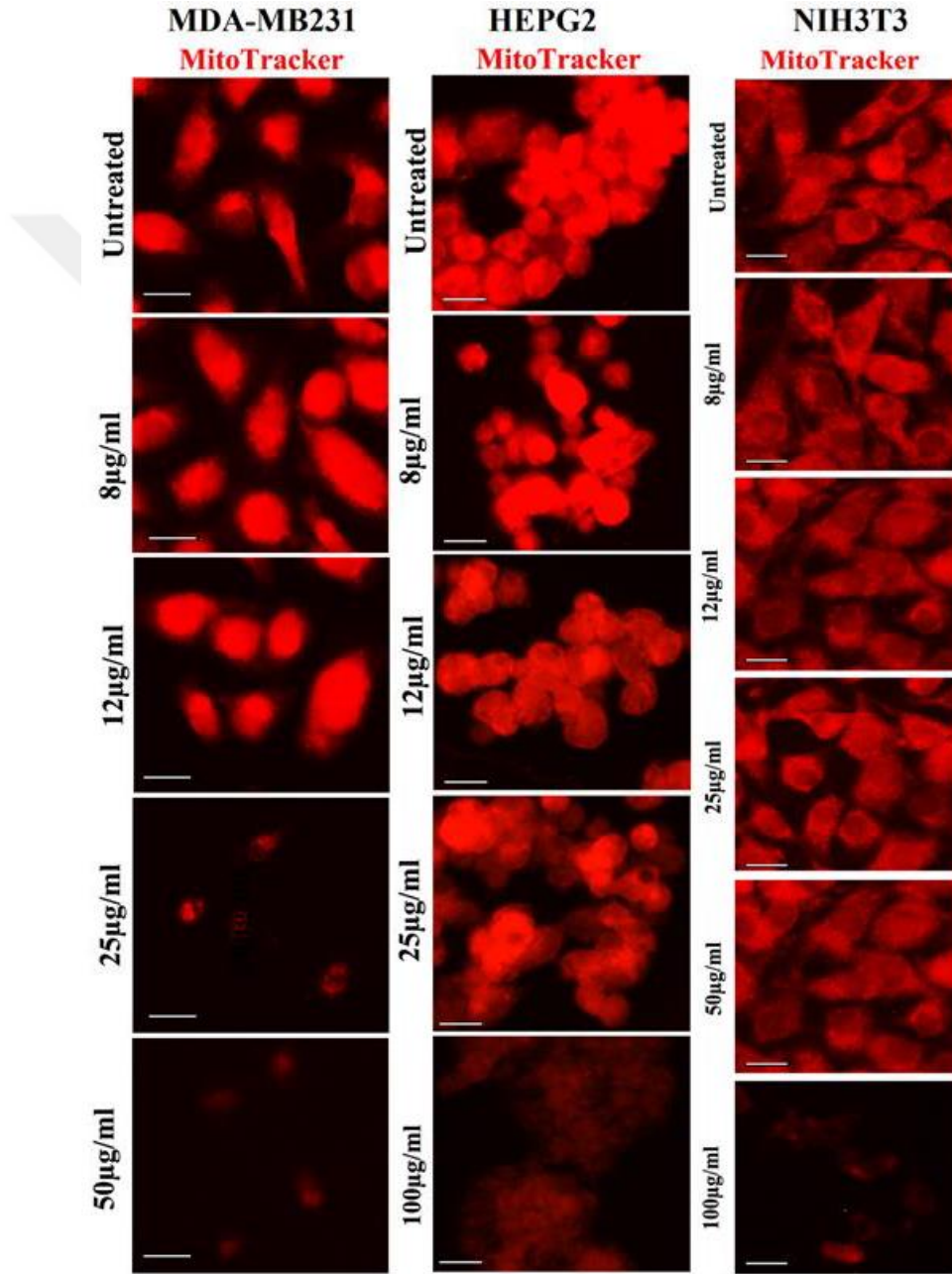
4.5. Arı Zehrinin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

Mitokondri membran potansiyeli (MMP) kırmızı kanalda (FL3-H) ölçülen floresan miktarına (MIF; mean fluorescence intensity) göre analiz edildi (Şekil 11). MDA-MB231 için arı zehri uygulanmamış negatif kontrol hücreleri ($p < 0.05$) ve 8 $\mu\text{g/mL}$ arı zehri uygulanan hücreleri ile son üç doz arasında anlamlı farklar gözlemlenmiştir ($p < 0.01$) (Şekil 11 A-B).



Şekil 11. Mitokondri membran potansiyeli akım sitometrisi analizi

HepG2’de membran potansiyeli düştüğü gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir ($p>0.05$) (Şekil 11C-D). Sağlıklı fibroblast hücresinde ise en düşük membran potansiyelinin sadece en yüksek doz (100 $\mu\text{g/mL}$) sonrasında olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 11E-F). Mitokondri boyaması (MitoTracker) aynı zamanda floresan mikroskobu ile de tespit edilmiş ve flow sitometrisine benzer bulgular elde edilmiştir (Resim 3).



Resim 3. Mitokondri membran potansiyelinin floresans mikroskobu yoluyla gösterilmesi (ölçek, 10 mikron)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Arı zehri, bal arılarının önemli bir savunma aracı olup, apiterapinin önemli bir ajanı olarak kullanılmaktadır. Yapı aydınlatma tekniklerinin gelişmesine paralel olarak son yıllarda arı zehrinin de bileşimi aydınlatılmaya çalışılmış olsa da yapısında bulunan her bir proteinin biyolojik aktif değeri tam olarak bilinmemektedir. Melittin arı zehrinin majör proteinin olup, yapılan çok sayıda çalışma melittinin antitümöral fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (87). Bu çalışmada ham arı zehrinin kanser hücrelerine karşı in vitro olarak sitotoksik aktivitesi araştırıldı. Çalışmada iki farklı kanser hücresi olarak metastatik meme kanser hücre serisi (MDA-MB-231) ve karaciğer kanser hücre serisi (HepG2) kullanıldı. Ayrıca çalışmada sonuçları karşılaştırmak için sağlıklı fare fibroblast hücre serisi (NIH/3T3) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan arı zehri Anadolu arı ırkına ait olup Zonguldak bölgesinden alanında deneyimi bulunan bir arıcıya özel sipariş verilerek ürettirildi. Numunenin arı zehri olduğunu ispatlamak amacıyla elektroforez tekniği kullanıldı. Tris-Trisin tamponu kullanılarak SDS-PAGE elektroforez çalışması ile yapılan arı zehri analizi ile kromatogramda 3 büyük bant ve 3 küçük çok belirgin olmayan bant olduğu gözlemlendi. Bu bantların molekül ağırlıkları marker protein ve ayrıca insülin kullanılarak kabaca test edildi. Proteinlerin molekül ağırlıklarının tayininde en ideal yöntem molekül büyüklüğüne göre ayırmada kullanılan jel kromatografisidir. SDP-PAGE, çok hassas bir teknik olmasa da örnek hakkında yaklaşık bilgiyi vermesi ve uygulaması kolay ve ucuz bir teknik olması açısından bu çalışmada kullanıldı. Elde edilen kromatogramda molekül ağırlığı 5 kDal'dan daha düşük bantın melittin olduğu düşünülmektedir. Bu bantta bulunması olası arı zehri proteinlerinden melittin 2 845 Dal, apamin 2 027 Dal, sekapin 2 866 Dal, MCD-peptit (2 587 Dal gibi küçük peptit ve proteinlerin olduğu ve molekül ağırlıklarının 5 kDal'dan daha düşük bölgede toplandığı tespit edildi (88, 89). Arı zehri protein ve peptit bileşiminin aydınlatılmasında elektroforez kaba bir yöntem olup, daha ileri aydınlatma teknikleri de mevcuttur. Arı zehri kompozisyonu belirlemek ve karakterize etmek için literatürde en ideal aydınlatma teknikleri HPLC, LC-MS/MS, Malti-TOFF gibi yöntemlerdir (88, 90).

Çalışmanın amacı arı zehrinin kanser hastalığının tedavisindeki rolünün belirlenmesi ve gelecekte arı zehrinin bu alanda kullanılması için yapılacak çalışmaların yolunun açılması olduğundan ham arı zehri kullanılarak iki farklı kanser hücresine karşı sitotoksik aktiviteler araştırıldı. Çalışmada iki farklı kanser hücre hattı ve bir sağlıklı fibroblast hücresine karşı

sitotoksik aktiviteler ilk olarak MTT yöntemi kullanılarak test edildi. Bu test sitotoksosite testlerinde en sık kullanılan tekniklerden biri olup, tekniğin esası NADH bağlı mitokondriyal dehidrogenazların sarı renge sahip tetrazolyum tuzunu indirgemesi esasına dayanır. İndirgenme sonucu oluşan mavi-mor renkli formazon kistallerinin yoğunluğu hücre canlılığı ile ilişkilidir. Apoptoza veya nekroza uğramış ve mitokondrileri aktif olmayan hücreler bu dönüşümü sağlayamaz (60, 91).

Yapılan çok sayıda ön denemelerden sonra belirlenen arı zehri konsantrasyon aralıkları ve inkübasyon sürelerinin her iki kanser hücresine karşı sitotoksik etkiye ve inhibisyonlara neden olduğu tespit edildi. 24 saat ve maksimum 100 µg/mL olacak şekilde tespit edilen arı zehri konsantrasyonları ile çalışıldı. Arı zehri örneklerinin her iki kanser hücre hattına karşı farklı konsantrasyonlarda inhibisyona neden olduğu tespit edildi. Kanser hücrelerinin % canlılık oranlarına karşı gelen arı zehri konsantrasyonları grafik çizilerek IC₅₀ değerleri bulundu. IC₅₀ değeri kısaca ortamdaki canlı hücrelerin %50'sini öldüren arı zehri miktarları olup her iki kanser hücre hatlarına karşı arı zehrinin IC₅₀ değerlerinde sitotoksosite gösterdiği tespit edildi. Düşük IC₅₀ değeri yüksek sitotoksik aktiviteyi göstermektedir. En düşük IC₅₀ değeri metastatik meme kanser (MDA-MB-231) hücrelerinde 8 µg/mL olduğu tespit edilirken karaciğer kanser hücrelerinde (HepG2) ise 12 µg/mL olarak hesaplandı. Sağlıklı fibroblast hücrelerinin (NIH/3T3) oldukça yüksek IC₅₀ değerinde 50 µg/mL sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi.

Sitotoksosite testleri ayrıca hücre morfolojilerinin invert mikroskop ile görüntüleri alınarak test edildi. Morfoloji incelendiğinde arı zehrinin MTT testine paralel olarak sitotoksik etki gösterdiği ve konsantrasyonla doğru orantılı olduğu tespit edildi.

Çalışmamıza benzer olarak MTT ve Raman spektroskopisi kullanılarak yapılan bir çalışmada arı zehrinin metastatik meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği ve Tunel testi ile onları apoptoza indüklediği gösterilmiştir. (92).

Liu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada arı zehrinin fare melanom hücreleri üzerindeki 24 saat inkübasyonu sonucunda büyümelerini ve çoğalmalarını inhibe ettiği MTT testi ile belirlendiği belirtilmiş olup IC₅₀ değerinin 10.0 µg/mL olduğu bildirilmiştir. Ayrıca PI boyama ile elde edilen verilerde hücre döngüsünü baskıladığı bildirilmiştir (80). IP ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada arı zehrinin insan meme kanser hücresindeki (MCF7) etkisi MTT testi ile zamana bağlı morfolojik değişiklikleri ve sitotoksik etkisi incelenmiştir. Bu hücreler üzerinde 10.0 µg/mL konsantrasyonunda

uygulanmış, proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptoza indüklediği belirtilmiştir (93). Badria ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada arı zehrinin karaciğer (HepG2), meme (MCF-7) ve kolon kanser (Caco-2) hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi MTT testi ile saptanmış ve hücreler üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu vurgulanmıştır (94).

Elde edilen sitotoksik etki mekanizmasının aydınlatılması amacıyla hücrelerin apoptoz ve nekroz oranları incelendi. Flow sitometri kullanılarak yapılan hücre morfolojisi tarama metodunda, anneksin V-PI ile yapılan boyama ile apoptoza ve nekroz oranları belirlenmeye çalışıldı. Arı zehri uygulanan ve uygulanmayan hücreler karşılaştırıldı ve sonuçlar FSC-SSC grafikleri yolu ile analiz edildi. İki kanser hücre hattında ve bir sağlıklı fibroblast hücresinde yapılan test sonuçları (Şekil 6) yorumlandığında arı zehrinin hücre morfolojisini konsantrasyona bağlı olarak anlamlı derecede etkilediği bulundu.

Oršolić ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada arı zehri in vitro olarak meme kanseri hücresi üzerine, in vivo olarak da fareler üzerindeki tümör büyümesini ve metastazı inhibe edici özelliği araştırılmıştır. Farelere intravenöz yöntemiyle uygulanan arı zehrinin akciğerdeki metastazı inhibe ettiği belirtilmiştir. Kanser hücresine 24 saat uygulanan arı zehrinin sitotoksik etkisi MTS testiyle belirlenmiş, doza bağlı olarak büyümeyi inhibe ettiği belirtilmiştir. Anneksin V-PI analizinde ise kanser hücrelerinin arı zehri muamelesinden üç saat sonra apoptoza indüklendiği gösterilmiştir (95).

Ayrıca sitotoksisite testi mekanizmasının aydınlatılması için mitokondri membran potansiyelleri araştırıldı. Floresan mikroskopu ile (MitoTracker) kırmızı mitokondri boyaması yapılarak ölçülen mitokondri yoğunluğunun yapılan çalışmada metastatik meme kanser hücresinde (MDA-MB-231) üç farklı zamanda yapılan test ile 8 µg/mL dozda arı zehrinin etkili olduğu tespit edildi. Benzer şekilde HepG2’de membran potansiyelin azaldığı tespit edildi ancak istatistiki olarak bu azalmanın anlamlı olmadığı tespit edildi. Sağlıklı fibroblast hücresinde ise membran potansiyelinin ancak yüksek dozlarda (100 µg/mL) değiştiği belirlendi.

Arı zehrinin metastatik meme ve karaciğer kanser hücrelerinde hangi mekanizmalar ile etki ettiğini açıklamak kolay değildir. Arı zehrinde en az 15-20 değişik protein ve peptit ile biyojen aminler bulunuyor ve hangi bileşen veya bileşenlerden antitümöral aktivitenin ileri geldiğini açıklanamamaktadır. Yapılan bir çalışmada arı zehri proteinlerinden ICD-85 peptitinin hem in vitro hücre kültüründe ve hem de deney hayvanlarında metastatik meme kanser hücresine karşı anti-kanser etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (96).

Arı zehrinin kanser hücrelerine sitotoksik aktivitesi ve buna bağlı apoptoza kanser hücrelerini zorlamasına ait çok sayıda in vitro çalışma mevcut bulunmaktadır (26, 97–99). Bu çalışmalarda daha çok melittin üzerinde yoğunlaşmış olup, arı zehrinin en etkin maddesinin melittin olduğu düşünülüyor. Melittin arı zehrinin yaklaşık %50 proteinini oluşturan 26 amino asitten oluşan bir peptittir. Yapılan bir in vitro ve in vivo çalışmada melittinin karaciğer kanserine karşı koruyucu etkisinin olduğu ve metastatik hepatosit hücrelerinin öldürdüğü rapor edildi (97).

Mide kanser hücreleri (SGC-7901) ile yapılan bir başka çalışmada melittinin bu hücreleri apoptoza zorladığı flow sitometri çalışmaları ile gösterilmiş olup IC₅₀ değerinin 4 µg/mL olduğu bildirilmektedir (100). Yaptığımız çalışmada kullanılan ham arı zehrinin yaklaşık yarısının melittin olduğu düşünüldüğünde metastatik meme kanserinde bulunan 8 µg/mL ve karaciğer kanserinde 12 µg/mL IC₅₀ değerlerinin bu çalışma ile uyumlu olduğu görülmektedir (100, 101).

Yapılan çalışmalar arı zehrinde bulunan melittin, fosfolipaz A ve hyaluronidaz gibi protein ve enzimlerin litik peptitler olduğu ve hücre bütünlüğünü bozarak hücreyi hem nekroz ve hem de apoptoza zorladığı ve antitümöral aktivitelerin bu mekanizmalar üzerinden yürüdüğü düşünülmektedir (101, 102).

Özetlemek gerekirse, ham arı zehrinin in vitro olarak çalışılan iki farklı kanser hücrelerine karşı antitümöral aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Her iki kanser hücrelerine göre inhibisyon etkisinin sağlıklı hücre ile karşılaştırıldığında çok daha seçici olduğu, sağlıklı hücreyi çok daha yüksek dozlarda apoptoza zorladığı önemli bir bulgudur.

Sonuç olarak, arı zehri önemli bir antitümöral doğal bir ürün olup, mekanizmanın hangi protein veya peptitten ileri geldiği belli değildir. Yapılacak daha ileri araştırmalar ile bunun aydınlatılması gerekir.

6. KAYNAKLAR

1. Bogdanov S (2012). Bee venom: Composition, health, medicine. *Bee Product Science* 1-20.
2. Münstedt K, Bogdanov S (2009). Bee products and their potential use in modern medicine. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(3): 57-63.
3. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Doi: 10.1155/2017/1259510.
4. Abbasi AJ, Mohammadi F, Bayat M, Gema SM, Ghadirian H, Seifi H, Bayat H, Bahrami N (2018). Applications of propolis in dentistry: A review. *Ethiopian Journal of Health Sciences* 28(4): 505-512.
5. Santos FA, Bastos EMAF, Maia ABRA, Uzeda M, Carvalho MAR, Farias LM, Moreira ESA (2003). Brazilian propolis: Physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Research* 17(3): 285-289.
6. Samet N, Laurent C, Susarla SM, Samet-Rubinstein N (2007). The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: A pilot study. *Clinical Oral Investigations* 11: 143–147.
7. Koo H, Cury JA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Ikegaki M, Park YK (2002). Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Research* 36: 445–448.
8. McDonald J, Li F, Mehta C (1980). Cancer mortality among beekeepers. *Journal of Occupational Medicine* 21(12): 811–813.
9. Silici S, Koç NA, Ayangil D, Çankaya S (2005). Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Journal of Pharmacological Sciences* 99(1): 39-44.
10. Gregory SR, Piccolo N, Piccolo MT, Piccolo MS, Heggors JP (2002). Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: A naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 8(1): 77-83.
11. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*

144(5): 646-674.

12. Institute NC (2015). What is Cancer?. National Cancer Institute [online]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. [Accessed 1 August 2020]
13. Yokuş B, Çakır UD (2012). Kanser biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (1): 7-18.
14. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M (2006). Angiogenesis in cancer. Vascular Health and Risk Management 2(3): 213-219.
15. WHO (2018). Cancer. World Health Organization [online]. Available from: <https://www.who.int>. [Accessed 1 August 2020]
16. Molan PC (1999). The role of honey in the management of wounds. Journal of Wound Care 8(8): 415-418.
17. Bardy J, Slevin NJ, Mais KL, Molassiotis A (2008). A systematic review of honey uses and its potential value within oncology care. Journal of Clinical Nursing 17(19): 2604-2623.
18. Jull AB, Cullum N, Dumville JC, Westby MJ, Deshpande S, Walker N (2015). Honey as a topical treatment for wounds. Cochrane Database of Systematic Reviews 3: 1465-1858.
19. Guo H, Saiga A, Sato M, Miyazawa I, Shibata M, Takahata Y, Morimatsu F (2007). Royal jelly supplementation improves lipoprotein metabolism in humans. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 53(4): 345-348.
20. Münstedt K, Bargello M, Hauenschild A (2009). Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects. Journal of Medicinal Food 12(5): 1170-1172.
21. Abdelhafiz AT, Muhamad JA (2008). Midcycle pericoital intravaginal bee honey and royal jelly for male factor infertility. International Journal of Gynecology and Obstetrics 101(2): 0020-7292.
22. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P (2008). Honey for nutrition and health: A review. Journal of the American College of Nutrition 27(6): 677-689.

23. Wehbe R, Frangieh J, Rima M, Obeid D El, Sabatier JM, Fajloun Z (2019). Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules* 24(16): 2997.
24. Hegazi A, Abdou AM, El-Moez SI, Allah FA (2014). Evaluation of the antibacterial activity of bee venom from different sources. *World Applied Sciences Journal* 30 (3): 266-270.
25. Denk B, Fidan AF. (2015). The effects of honey bee venom on diabetes mellitus and pancreas. *Kocatepe Veterinary Journal* 8: 51-63.
26. Jo M, Park MH, Kollipara PS, An BJ, Song HS, Han SB, Kim JH, Song MJ, Hong JT (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.
27. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology and Therapeutics* 115(2): 246-270.
28. Lee G, Bae H (2016). Bee venom phospholipase A2: Yesterday's enemy becomes today's friend. *Toxins* 8: 48.
29. IARC (2020). Cancer Today. International Agency for Research on Cancer [online]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>. [Accessed 1 August 2020]
30. Jo M, Park MH, Kollipara PS, An BJ, Song HS, Han SB, Kim JH, Song MJ, Hong JT (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.
31. Choi KE, Hwang CJ, Gu SM, Park MH, Kim JH, Park JH, Ahn YJ, Kim JY, Song MJ, Song HS, vd. (2014). Cancer cell growth inhibitory effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and inactivation of NF-kappa B in NSCLC cells. *Toxins* 6(8): 2210-2228.
32. Brody LC (y.y.). Cell Cycle. National Human Genome Research Institute [online]. Available from: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle>. [Accessed 1

August 2020]

33. Alberts B, Johnson A, Lewis J (2002). An Overview of the Cell Cycle. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>. [Accessed 1 August 2020]
34. Cooper GM (2000). The eukaryotic cell cycle. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition Sunderland (MA): Sinauer Associates [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>. [Accessed 1 August 2020]
35. Kastan MB, Bartek J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316–323.
36. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003). The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 36: 131-149.
37. Barnum KJ, O’Connell MJ (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology* 1170: 29-40.
38. Danial NN, Hockenbery DM (2018). Cell Death. Hoffman R, Benz E, Heslop H, Weitz J (Ed.), *Hematology: Basic Principles and Practice*. Seventh Edition. Elsevier, Pages 186-196.
39. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, et al (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* 25: 486–541.
40. Fink SL, Cookson BT, Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA, Frederique B, Al-Bassam W, Warrillow SJ, et al (2018). Apoptosis , Pyroptosis , and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. Doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.021.
41. Fink SL, Cookson BT (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 73(4): 1907-1916.
42. Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Fröhwein U, Schulte-Hermann R (2006). Programmed cell death (PCD): Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Annals of the New York*

Academy of Sciences 926: 1-12.

43. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4): 239-257.
44. D'Arcy MS (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* 43(6): 582-592.
45. Savitskaya MA, Onishchenko GE (2015). Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry* 80(11): 1393-1405.
46. Kroemer G, Martin SJ (2005). Caspase-independent cell death. *Nature Medicine* 11: 725–730.
47. Li J, Yuan J (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27: 6194–6206.
48. Papaliagkas V, Anogianaki A, Anogianakis G, Ilonidis G (2007). The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals. *Hippokratia* 11(3): 108-113.
49. Elmore S (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495-516.
50. Wong RSY (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 30: 87.
51. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, vd. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: A common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1336(1-2): 177-196.
52. Sakamuru S, Attene-Ramos MS, Xia M (2016). Mitochondrial membrane potential assay. *Methods in Molecular Biology* 1473: 17-22.
53. Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA (2002). Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxidants and Redox Signaling* 4(5): 769-781.
54. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.

55. Ozaki T, Nakagawara A (2011). Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers* 3(1): 994-1013.
56. Golstein P, Kroemer G (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences* 32(1): 37-43.
57. Adigun R, Basit H MJ (2019). Necrosis, Cell. StatPearls Publishing [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430935/>. [Accessed 1 August 2020]
58. Adan A, Kiraz Y, Baran Y (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17(14): 1213-1221.
59. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* 288(2): 369-376.
60. Alfraid A, Cendi FT (2018). Cell-based cytotoxicity methods. *Journal of Apitherapy and Nature* 1(1): 3-12.
61. Riss T, Niles A, Moravec R, Karassina N, Vidugiriene J (2004). Cytotoxicity assays: In vitro methods to measure dead cells. *Assay Guidance Manual* [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958>. [Accessed 1 August 2020].
62. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2): 55-63.
63. Reif GA, Wallace DP (2019). ADPKD cell proliferation and Cl⁻-dependent fluid secretion. *Methods in Cell Biology* 153: 69-92.
64. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay 731: 237-245.
65. Berridge M V., Herst PM, Tan AS (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual review* 11: 127-152.
66. Assays CB, Cycle C, Proliferation C, Death C, Assays CB, Cycle C, Proliferation C, Like CD, Cobb L, Angeles L, vd. (2016). Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System. BD Biosciences. Doi: 10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations.

67. Miller E (2004). Apoptosis measurement by annexin v staining. *Methods in Molecular Medicine* 88: 191-202.
68. Hingorani R, Deng J, Elia J, McIntyre C, Mittar D (2011). Detection of apoptosis using the BD annexin V FITC assay on the BD FACSVerserTM system. BD Biosciences, San Jose 1–12.
69. Schutte B, Nuydens R, Geerts H, Ramaekers F (1998). Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *Journal of Neuroscience Methods* 86(1): 63-69.
70. Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM (1998). Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9.
71. Cummings BS, Schnellmann RG (2004). Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. *Current Protocols in Pharmacology*. Doi: 10.1002/0471141755.ph1208s25.
72. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*. Doi: 10.1101/pdb.prot087288.
73. Riccardi C, Nicoletti I (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols* 1: 1458–1461.
74. Kanew MO, Gökalp Muranlı FD (2015). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 20(1): 33-38.
75. Diaz D, Prieto A, Reyes E, Barcenilla H, Monserrat J, Alvarez-Mon M (2015). Flow cytometry enumeration of apoptotic cancer cells by apoptotic rate. *Methods in Molecular Biology* 1219: 11-20.
76. McKinnon KM (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* 120: 5.1.1-5.1.11.
77. Schägger H (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1: 16–22.
78. Çalışkan F, Sivas H, Şahin Y (2009). A preliminary study for the detection of gelatinolytic proteases from the scorpion *Androctonus crassicauda* (Turkish black scorpion) venom. *Turkish Journal of Biochemistry* 34(3): 148-153.

79. Kolaylı S (2017). Bal arısı zehrinin karakterizasyonunda SDS-PAGE elektroforez kullanılabiliirliğinin araştırılması. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 16(2): 49-56.
80. Liu X, Chen D, Xie L, 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: 1083-1089.
81. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Yaman SO, Akbulut K, Kilinc K, Deger O (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutrition and Cancer* 68(1): 165-172.
82. Chen J, Lariviere WR (2010). The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Progress in Neurobiology* 92(2): 151-183.
83. Singla P, Dalal P, Kaur M, Arya G, Nimesh S, Singh R, Salunke DB (2018). Bile Acid Oligomers and Their Combination with Antibiotics to Combat Bacterial Infections. *Journal of Medicinal Chemistry* 61(22): 10265-10275.
84. van Asten SD, Raaben M, Nota B, Spaapen RM (2018). Secretome Screening Reveals Fibroblast Growth Factors as Novel Inhibitors of Viral Replication. *Journal of Virology* 92(16).
85. Garino N, Limongi T, Dumontel B, Canta M, Racca L, Laurenti M, Castellino M, Casu A, Falqui A, Cauda V (2019). A microwave-assisted synthesis of zinc oxide nanocrystals finely tuned for biological applications. *Nanomaterials* 9 (2): 212.
86. Banks BEC, Shipolini RA (1986). Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. Piek T (Ed.), *Venoms of the Hymenoptera*. Academic Press, Pages: 329-416.
87. Baracchi D, Turillazzi S (2010). Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS. *Journal of Insect Physiology* 56(4): 366-375.
88. Rady I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters* 402: 16-31.
89. Alvarez-Suarez JM (2017). Bee products - chemical and biological properties. *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. Doi: 10.1007/978-3-319-59689-1.
90. Abd El-Wahed AA, Khalifa SAM, Sheikh BY, Farag MA, Saeed A, Larik FA, Koca-

- Caliskan U, AlAjmi MF, Hassan M, Wahabi HA, vd. (2018). Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity. *Studies in Natural Products Chemistry*. Doi: 10.1016/B978-0-444-64181-6.00013-9.
91. Wan H, Williams R, Doherty P, Williams DF (1994). A study of the reproducibility of the MTT test. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5: 154–159.
 92. Jung GB, Huh J-E, Lee H-J, Kim D, Lee G-J, Park H-K, Lee J-D (2018). Anti-cancer effect of bee venom on human MDA-MB-231 breast cancer cells using Raman spectroscopy. *Biomedical Optics Express* 9(11): 5703-5718.
 93. Ip SW, Liao SS, Lin SY, Lin JP, Yang JS, Lin ML, Chen GW, Lu HF, Lin MW, Han SM, et al. (2008). The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In Vivo* 22(2): 237-245.
 94. Badria F, Fathy H, Fatehe A, Elimam D, Ghazy M (2017). Evaluate the cytotoxic activity of honey, propolis, and bee venom from different localities in Egypt against liver, breast, and colorectal cancer. *Journal of Apitherapy* 2(1): 1.
 95. Oršolić N, Šver L, Verstovšek S, Terzić S, Bašić I (2003). Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon* 41(7): 861-870.
 96. Mirakabadi A, Mahdavi S, Koohi M, Taghavian M (2007). Cytotoxic effect of ICD-85 (Venom-derived peptides) on MDA-MB-231 cell line. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 14: 619–627.
 97. Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, Sun S, Ling C, Xu Z (2008). Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. *Hepatology* 47: 1964-1973.
 98. Russell PJ, Hewish D, Carter T, Sterling-Levis K, Ow K, Hattarki M, Doughty L, Guthrie R, Shapira D, Molloy PL, vd. (2004). Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: In vitro and in vivo studies. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 53(5): 411-421.
 99. Oršolić N (2012). Bee venom in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* 31(1-2): 173-194.

100. Kong GM, Tao WH, Diao YL, Fang PH, Wang JJ, Bo P, Qian F (2016). Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway. *World Journal of Gastroenterology* 22(11): 3186-3195.
101. Liu C cui, Hao D jun, Zhang Q, An J, Zhao J jing, Chen B, Zhang L ling, Yang H (2016). Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78: 1113–1130.
102. Gajski G, Garaj-Vrhovac V (2013). Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36(2): 697-705.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : BİRİNCİ, Esra
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 25/06/1991, Trabzon
E-Posta : birinci.esra@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Biyokimya	Halen
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü	2016
Lise	Trabzon Yunus Emre Lisesi	2009

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

Çelik Uzuner S, Tetikoğlu S, Birinci E, Adilova A (2019). Investigation of long-term effect of Black Sea bee's venom on the cytotoxicity of pancreatic cancer cells. Journal of Apitherapy and Nature 2 (1): 1-6.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölüm Üçüncülüğü