

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**





**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ORCID :** - - -

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :** / /

**Tezin Savunma Tarihi :** / /

**Tez Danışmanı :**

**ORCID :** - - -

**Trabzon**

## ÖNSÖZ

“Arı Zehrinin Spesifik Anti-Kanser Etkisinin Hücresel Düzeyde İncelenmesi” adlı bu Yüksek lisans tezi; arı zehrinin kanser hücreleri üzerinde uzun vadedeki hafıza ve sitotoksik etkisi hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: FLY-2019-8116).

2018 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalına yüksek lisans öğrencisi olarak başlamala birlikte, üniversite ve akademik yaşamıma destekleri, engin bilgi, deneyimleriyle daima yanımda olan, bana ve eğitim öğretim hayatıma bıraktığı kıymetli izleri için danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üye. Selcen ÇELİK UZUNER’e teşekkürü borç bilirim.

Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde bulunduğum süre zarfında araştırmalarıma ve bana kattığı tüm değerli bilgi, tecrübe ve yardımları için; Sayın Dr. Öğr. Üye. Uğur UZUNER’e teşekkürü borç bilirim.

Yüksek Lisans savunmamda yer alan değerli tez jürisi hocalarıma; deneyimlerini benimle paylaşan kıymetli laboratuvar arkadaşlarıma yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Eğitimime başladığım ilk günden beri maddi ve manevi her koşulda yanımda olan başta abim Murat TETİKOĞLU ve sevgili aileme bana ve çalışmalarına olan tüm desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

2012 yılından beri, üniversite ve akademik hayatımın her sürecinde yanımda olan engin bilgileriyle daima bana yol gösterip yardımcı olan tek yol arkadaşım sevgili Funda BİLGİLİ’ye bana ve çalışmalarına olan tüm desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Sinan TETİKOĞLU

Trabzon 2020

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Arı Zehrinin Spesifik Anti-Kanser Etkisinin Hücresel Düzeyde İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Dr. Öğr. Üye. Selcen ÇELİK UZUNER’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 18/06/2020

Sinan TETİKOĞLU

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Apiterapi ve Arı Zehri.....	2
1.3. Kanser.....	3
1.3.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Genetik Değişiklikler.....	4
1.3.1.1. Proto-Onkogenler.....	6
1.3.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	6
1.3.2. Kanserın Moleküler Tedavisi.....	7
1.3.2.1. Cerrahi Tedavi.....	7
1.3.2.2. Radyoterapi.....	8
1.3.2.3. Kemoterapi.....	9
1.3.3. Kişisel Tıp ile Kanser Tedavisi.....	12
1.3.4. Alternatif Tıp: Doğal Bileşiklerle Kanser Tedavisi.....	13
1.4. Çalışmanın amacı.....	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1. Hücre Kültürü.....	19
2.1.1. Hücrelerin Dondurularak Stoklanması.....	19
2.1.2. Dondurulan Hücrelerin Çözülmesi.....	19
2.2. Arı Zehrinin Sağılması ve Arı Zehri Stoklarının Yapılması.....	20
2.3. Arı Zehri ve Sisplatin Muamelesinden Sonra MTT ile Sitotoksisite Tayini.....	20
2.4. Arı Zehri ve Sisplatinin Uzun Vadedeki Sitotoksik Etkisinin Tripan Mavisi Yöntemi Yoluyla Belirlenmesi.....	21

2.5.	Total DNA İzolasyonu .....	22
2.6.	QPCR Yöntemi ile Mitokondriyal DNA Kopya Sayısının Tespiti .....	22
2.7.	Agoroz Jel Elektforezi .....	23
2.8.	DNA Fragmentasyonu.....	24
2.9.	DNA Boyaması (Hoechst), DNA Hasarı (γ-H2AX) Ve Hücre İskelet Proteininin (B-Aktin) İmmünboyama ile Tespiti .....	24
2.10.	İstatistiksel Analizler .....	26
3.	BULGULAR .....	27
3.1.	Arı Zehrinin Uzun Vadadaki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	27
3.1.1.	Arı Zehrinin Sitotoksik Dozlarının MTT ile Belirlenmesi.....	27
3.2.1.	Arı Zehrinin Farklı Dozlarının Normal ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Uzun Vadeli Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi .....	29
3.2.	Sisplatinin Uzun Vadadaki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	33
3.2.1.	Sisplatin'in Sitotoksik Dozlarının MTT ile Belirlenmesi.....	33
3.2.2.	Sisplatin'in Farklı Dozlarının Normal ve Kanserli Hücreler Üzerindeki Morfolojik Etkisinin Belirlenmesi .....	35
3.2.3.	Sisplatin'in Farklı Dozlarının Normal ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Uzun Vadeli Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi .....	35
3.3.	Arı zehrinin genomik DNA Konsantrasyonlarına ve DNA Fragmentasyonuna Etkisi.....	40
3.4.	QPCR Yöntemi ile Mitokondriyal DNA Kopya Sayısının Tespiti .....	41
3.5.	DNA Fragmentasyonu.....	42
3.6.	DNA Hasarı ve Hücre İskelet Proteininin Tespiti için İmmünboyama .....	44
4.	TARTIŞMA .....	47
5.	SONUÇLAR.....	51
6.	ÖNERİLER .....	53
7.	KAYNAKLAR .....	54

## ÖZGEÇMİŞ

Yüksek lisans Tezi

## ÖZET

### ARI ZEHRİNİN KARACİĞER VE METASTATİK MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE UZUN VADEDE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Sinan TETİKOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Danışman: Dr. Öğr. Üye. Selcen ÇELİK UZUNER  
2020, 63 Sayfa

Arı zehri, arılar tarafından üretilen biyolojik olarak aktif moleküller (melittin, apamin, adolapin, enzimler gibi) içeren birçok hastalığın tedavisinde kullanılan alternatif tıp ürünüdür. Günümüzde kullanılan kanser terapi ilaçlarının problemi ilacın seçiciliğinin çok düşük olması yani sağlıklı hücrelere de zarar vererek kanserin yeniden nüksetmesine zemin hazırlamasıdır. İdeal kanser tedavisi, sadece kanser hücrelerini hedef alabilen yüksek seçicilikte olan ajanlarla sağlanabilir. Literatürde arı zehrinin muamele edildiği kanser hücre hatlarında sitotoksitenin arttığı, normal hücrelerde minimal sitotoksik etki gösterdiği yapılan çalışmalarla bulunmuştur.

Bu tez kapsamında, arı zehrinin kanser hücreleri üzerindeki uzun süreli etkisinin ve moleküler mekanizmasının araştırılarak; arı zehrinin kanser terapisindeki seçiciliğinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik MDA-MB-231 (metastatik meme kanseri), HEPG2 (karaciğer kanseri) ve NIH/3T3 (sağlıklı fibroblast) hücre hatları ile yapılan moleküler çalışmalarda, arı zehrinin kemoterapi ajanı sisplatine göre sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücreleri öldürdüğü ve arı zehri uzaklaştırıldıktan sonra da bu etkinin devam ettiği gösterilmiştir. Bu çalışma ile arı zehrinin MDA-MB-231 ve HEPG2 kanser hücreleri üzerinde mitokondriyal kopya sayısı, DNA hasarı ve hücre iskelet proteinin yerleşimi açısından da spesifik ve seçici bir etkisinin olduğu belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Arı zehri, Sisplatin, MDA-MB-231, HEPG2, NIH/3T3,  
Kanserde seçicilik

Master Thesis

**SUMMARY**

INVESTIGATION OF THE LONG-TERM CYTOTOXIC EFFECT OF BEE VENOM ON  
LIVER AND METASTATIC BREAST CANCER CELLS

Sinan TETİKOĞLU

Karadeniz Technical University  
The Institute of Science  
Molecular Biology and Genetics Graduate Program  
Supervisor: Asst. Prof. Selcen ÇELİK UZUNER  
2020, 63 Pages

Bee venom is an alternative medicine product that contain biologically active molecules (such as melittin, apamine, adolapine, enzymes) produced by bees used in the treatment of many diseases. The problem of currently used cancer therapeutics is that drugs are not selective for cancer cells as to they can damage healthy cells and cause recurrence of cancer. Ideal cancer treatment can be provided by the agents with high selectivity that should target only cancer cells. It has been found in the literature that cytotoxicity is induced by bee venom in cancer cell lines and bee venom has minimal toxic effect on normal cells.

In this thesis, it was aimed that to clarify of selectivity of bee venom in cancer therapy investigating in long-term and to reveal molecular mechanism of bee venom on breast (MDA-MB-231), liver (HEPG2) cancer cells and normal fibroblast NIH/3T3 cell lines. It was found that bee venom was able to induce cell death in cancer cells, but less effective in healthy cells, and also showed persistent cytotoxic effect even if after removal bee venom. In this study, it was found that bee venom has a specific and selective effect on mitochondrial copy number variation, DNA damage and the location of a cytoskeleton protein in MDA-MB-231 and HEPG2 cancer cells.

**Key Words:** Bee venom, Cisplatin, MDA-MB-231, HEPG2, NIH/3T3, Selectivity in cancer



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Sisplatin'in kimyasal ve dört ligandla çevrili iki kat yüklü platin iyonunun bir gelmesiyle oluşan moleküler yapısı.....	10
Şekil 2. Sisplatin'in kanser tedavisindeki moleküler mekanizması .....	11
Şekil 3. Kurkumin, Resvaratrol gibi bazı bitki bileşiklerinin kanser tedavisindeki moleküler mekanizması.....	15
Şekil 4. Arı zehrinin kanser hücreleri ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi.....	28
Şekil 5. Normal ve kanser hücrelerine arı zehrinin farklı dozları ile muamele edilip uzaklaştırıldıktan 24, 48 ve 72 saat sonra hücre yoğunluğu. ....	30
Şekil 6. Arı zehrinin hücrelerden uzaklaştırıldıktan belli zaman aralıkları sonrasında hücre ölümünün devam edip etmediğinin tripan mavisi yöntemi yoluyla belirlenmesi.....	31
Şekil 7. Sisplatin'in kanser hücreleri ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi.....	34
Şekil 8. Normal ve kanser hücrelerine sisplatinin farklı dozları ile muamele edilip uzaklaştırıldıktan 24, 48 ve 72 saat sonra hücre yoğunluğu .....	35
Şekil 9. Normal ve kanser hücrelerine sisplatinin farklı dozları ile muamele edilip uzaklaştırıldıktan 24, 48 ve 72 saat sonra hücre yoğunluğu .....	37
Şekil 10. Sisplatin'in hücrelerden uzaklaştırıldıktan belli zaman aralıkları sonrasında hücre ölümünün devam edip etmediğinin tripan mavisi yöntemi yoluyla belirlenmesi .....	37
Şekil 11. Arı zehrinden sonra hücrelerdeki mitokondriyal DNA kopya sayısının değişimi .....	42
Şekil 12. Arı zehri muamelesinden sonra NIH/3T3 (A), MDA-MB-231 (B) ve HEPG2 (C) hücrelerinin DNA fragmentasyon analizi.....	43
Şekil 13. Arı zehri muamelesinden sonra sağlıklı ve kanser hücrelerinin immünboyama görüntüleri. ....	44

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. QPCR Kit İÇeriği .....	23
Tablo 2. Mitokondriyal DNA Kopya sayısı iÇin QPCR’da kullanılan Primerler.....	23
Tablo 3. MDA-MB-231 hÜcrelerinde arı zehrinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi.	32
Tablo 4. HEPG2 hÜcrelerinde arı zehrinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi .....	32
Tablo 5. NIH/3T3 hÜcrelerinde arı zehrinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi.....	32
Tablo 6. MDA-MB-231 hÜcrelerinde sislptinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi...	39
Tablo 7. HEPG2 hÜcrelerinde sislptinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi .....	39
Tablo 8. NIH/3T3 hÜcrelerinde sislptinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi.....	40
Tablo 9. Arı zehri uygulaması sonrasında elde edilen DNA konsantrasyonları .....	41

## KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

°C: Santigrat

+/- SE: Standard Error (Standart Hata)

μ: mikro

μg: mikrogram

μL: mikrolitre

μm: mikromolar

APC: Adenomatöz Polipozis Koli

BCS: Bovin Calf Serumu

BRCA1: Breast Cancer Type 1

BRCA2: Breast Cancer Type 2

BSA: Bovine Serum Albumin

BV: Bee Venom (Arı Zehri)

CO<sub>2</sub>: Karbondioksit

COX-2: Siklooksijenaz-2

dk: dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksinükleotit trifosfat

EGCG: Epigallocatechin-3-gallate

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

FBS: Fetal Sığır Serumu

γ: Gamma

g (xg): Gravity (Yerçekimi gücü)

HCl: Hidroklorik asit

HER-2: Human Epidermal Growth Factor 2

KML: Kronik Miyeloid Lösemi

KSV(CNV): Kopya Sayısı Varyasyonu (Copy Number Variation)

mg: miligram

MgCl<sub>2</sub>: Magnezyum klorür

mL: mililitre

mtDNA: Mitokondriyal DNA

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromür

NaCl: Sodyum Klorür

NCI: Ulusal Kanser Enstitüsü (ABD)

NTC: Non-Template Control (DNA içermeyen kontrol)

PBS: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)

PFA: Paraformaldehit

QPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction (Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

RNA: Ribonükleik asit

RNaz: Ribonükleaz

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SI: Selektif İndeks

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TAE: Tris-Asetat

V: Volt

VEGF: Vascular Endothelial Growth Faktor

β: Beta

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Genel olarak tamamlayıcı tıp diye adlandırılan alternatif tıp, doğal bitki ve hayvan ürünlerinin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılması olarak tanımlanmaktadır. Alternatif tıp, birçok hastalığa doğal çözümler sunabildiği için bilim adamlarının ilgi odağındadır. Apiterapi, bal, polen, propolis ve arı zehri gibi arı ürünlerinin tedavi amacıyla alternatif tıpta kullanıldığı popüler bir alandır. Arı zehrinin kemoterapi ajanlarının yan etkilerine karşı koruyucu etkisinin yanında (Wehbe vd., 2019) sitotoksik etkisi üzerine yapılan birçok çalışma (Oršolic, 2012), arı zehri doğal bileşenlerinin kanser tedavisi için yükselen bir ilaç adayı olduğuna işaret etmektedir (Hong vd., 2005; Ip vd., 2008; Jang vd., 2003; Jeong, 2014; Jo vd., 2012). Geleneksel kemoterapötiklerin ana dezavantajı, kanser hücreleri için seçici olamaması ya da seçiciliğinin düşük olması dolayısıyla vücuttaki normal hücrelere de hasar vermesine neden olabilmesidir. Bu etkiler sağlıklı hücrelerin ölümünün yanı sıra hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesine sebep olabilecek mutasyonları indükleyebilir (Dasari ve Tchounwou, 2014). Bu nedenle kanser için ideal tedavi yöntemi, yalnızca kanser hücrelerini hedef almalıdır. Arı zehrinin kanser hücrelerini normal hücrelere göre daha fazla öldürdüğü yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Tu vd., 2008; Zheng vd., 2015). Bu bağlamda, arı zehrinin kanser tedavisinde bir alternatif olarak kullanılabileceği düşünülebilir. Arı zehri; fenolik bileşikler, enzimler (örneğin, *fosfolipaz A* ve *hyaluronidaz*) ve melittin, apamin gibi peptitleri içermektedir. Bunlar içinde en etkili sitotoksik molekülün, aynı zamanda arı zehrinin ana peptidi olan melittin olduğu bilinmektedir (Jeong, 2014; Jo vd., 2012; Wang, 2017). Melittin, kanser hücrelerinin en etkili komplikasyonlardan olan invazyonu hedefleyebilir ve ayrıca farklı yollarla apoptozu indükleyebilir (Jeong, 2014; Jo vd., 2012; Wang, 2017; Yang vd., 2007). Arı zehrinin lösemi, rahim ağzı, akciğer, kolon, yumurtalık ve prostat gibi birçok kanserde ve romatoid artrit gibi diğer hastalıklarda tedavi edici etkisi kapsamlı bir şekilde gösterilmiştir (Hong vd., 2005; Ip vd., 2008; Jang vd., 2003; Jo vd., 2012; Park vd., 2011; Son vd., 2007; Zheng vd., 2015). Arı zehrinin ideal kanser tedavisi için uygun olabilmesi için sadece kanser hücrelerini hedef alabilen yüksek seçicilikte olan bir ajan olabilmesi gerekmektedir. İlaç ve zehir arasındaki en önemli ayrımın doz olduğu da hesaba katıldığında arı zehrinin

kanser hücreleri için ilaç olabilecek, ancak sağlıklı hücreleri olumsuz yönde etkilemeyecek şartların belirlenmesi önemlidir.

Literatürde arı zehrinin anti-kanser etkisinin bilinmesine rağmen, kanser hücrelerindeki seçiciliğinin moleküler temeli ve uzun vadedeki sitotoksik etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Örneğin arı zehrinin apoptotik yolları aktifleştirerek sitotoksosite gösterdiğine dair bulgular vardır (Moga vd., 2018). Ancak arı zehrinin sağlıklı hücrelerde değil de kanser hücrelerinde hedef aldığı bazı hücresel mekanizmalar, örneğin hücre ve sitoplazmasındaki değişiklikler ve mitokondri DNA kopya sayısı ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu tezin amacı 1) arı zehrinin kanser hücrelerinde sebep olduğu sitotoksitenin arı zehrinin ortamdaki uzaklaştırılmasına rağmen devam edip etmediğinin, yani bir kere muamele edilen arı zehrinin bir ölüm şalteri gibi etki edip etmediğinin araştırılması (uzun vadedeki sitotoksik etkisi) ve bu etkinin kemoterapi ajanı olan sisplatinin benzer şekilde uygulanan uzun vadedeki sitotoksik davranışı ile karşılaştırılması ve 2) arı zehrinin kanser hücrelerinde genel olarak gösterdiği seçici sitotoksik etkiyi hücrede hangi parametreler üzerinden gösterebildiğinin araştırılmasıdır. Bu parametreler; DNA hasarının indüklenmesi, mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısında değişiklik ve/veya hücre iskeletinde değişiklik yapabilme özelliklerinin araştırılmasıdır. Tezin ilk amacı üzerine literatürde her hangi bir bulgu yoktur. Ayrıca mtDNA kopya sayısı üzerinde etkisinin olup olmadığına dair bir bulgu da yoktur.

## 1.2. Apiterapi ve Arı Zehri

Apiterapi veya “arı tedavisi” (Latince’de bal arısı *Apis mellifera*) bal arıları tarafından üretilen ürünlerin tıbbi kullanımınıdır. Apiterapinin tarihi geçmişi 3000 ila 5000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Ali, 2012). Arı zehri, hayvanlar âleminde arıları diğer eklem bacaklılardan omurgalı hayvanlara kadar çok çeşitli avcılara karşı korumak için tasarlanmış eşsiz bir silahtır. Arının karın boşluğunda yer alan arı zehri (bee venom, BV), bal arısı işçilerinin ve kraliçelerinin sokma iğneleri ile bağlantılı zehir bezleri tarafından üretilen aktif bir üründür. BV, aktif enzimlerin, peptidlerin ve aminlerin kompleks bir karışımıdır. En önemli bileşenleri melittin ve fosfolipaz A2, apamin, histamin, dopamin, norepinefrin, adolapin ve mast hücresi parçalayıcı peptidlerdir (Huh vd., 2010; Lariviere ve

Melzack, 1996; Son vd., 2007). Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma BV'nin ağrı kesici, anti-inflamatuvar, sitotoksik, anti-mikrobiyal, anti-viral ve anti-kanser aktivitelerine sahip olduğunu ortaya koymuştur (Son vd., 2007; Uddin vd., 2016). Eski bir ilaç olarak BV, artrit romatizma, multipl sikleroz, sırt ağrısı ve cilt hastalıklarını tedavi etmek için kullanılmaktadır (Ip vd., 2012). Hepsinden önemlisi, BV'nin apoptoz, nekroz, sitotoksisite ve büyümeyi durdurma gibi kanseri kontrol edici çeşitli etkileri prostat, meme, akciğer, karaciğer, cilt ve mesane kanserleri dâhil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde tespit edilmesidir (Oršolic, 2012; Tu vd., 2008). BV, lenf düğümlerinde bölgesel hücresel immün yanıtın uyarılmasını sağlayarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder (Liu vd., 2002; Orsollic vd., 2003). Arı zehrinin insan lösemi hücrelerinde apoptozu indüklerken; sağlıklı kemik iliği hücrelerinde sitotoksisiteye sebep olmamasının bazı mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği bildirilmektedir. Örneğin BV insan lösemi hücrelerinde Bcl-2 ve Kaspaz-3 sinyal yollarını düzenleyerek apoptoza sebep olmaktadır (Moon vd., 2006). Başka bir çalışmada ise BV'nin, sinoviyal fibroblastlarda yine Kaspaz-3 yolağını aktive ederek ve insan akciğer kanser hücrelerinde ise COX-2 ekspresyonunu azaltarak apoptozu indüklediği bildirilmektedir (Hong vd., 2005; Jang vd., 2003).

### 1.3. Kanser

M.Ö. 300'lü yıllarda yaşamış ve 'tıbbın babası' olarak bilinen Hipokrat kanseri ilk olarak Yunanca 'karkinos' terimi ile tanımlamıştı. Bu dönemde vücutta değişik şişlik, ağrı ve kızarıklık meydana getiren hastalığa yengeç ısırığındaki ağrıya benzetildiği için Yunanca yengeç anlamına gelen bu terim verilmişti. Daha sonrasında ise Romalı tıp doktoru Celsus, Latince yengeç anlamına gelen 'cancer' terimini kullanmıştır. Ardından başka bir Romalı doktor Galen M.S. bu tümörleri tanımlamak için Yunanca şişlik anlamına gelen 'oncos' terimini kullanmıştır. Kanser, tarih boyunca tanınan ve eski Mısırlılar tarafından da bilinen terimdi (Pelengaris, 2006). Ancak on yedinci yüzyıla kadar kanserin resmi çalışmasının (onkoloji) belgelendirildiği bir kaynak yoktu.

Genel manada kanser, bazı hücrelerin kontrollü olarak gerçekleştirilen hücre bölünmesi sürecinden saparak kontrolsüz büyüyerek ve köken aldıkları dokulardan başka yerlere göç ederek invaze olmaları ve böylece dokularda işleyişi bozmasıyla tanımlanan bir hastalıktır. Normal hücreler büyüme, bölünme ve ölme süreçlerini belli sinyallerle

ayırt ederek gerçekleştirirken, kanser hücreleri bu sinyallerden kaçarak kontrolsüz büyümektedirler. Bu çoğalmanın devam etmesine ve yayılmasına izin verilirse ölümcül olabilmektedir. Gerçekte, kansere bağlı ölümlerin %90'ı metastaz adı verilen tümörün diğer doku ve organlara yayılmasından kaynaklanmaktadır (Hejmadi, 2009).

Modern kanser biyolojisi bulgularına göre hemen hemen tüm memeli hücreleri; hücrenin çoğalması, farklılaşması ve ölümünü kontrol etmek için benzer hücresel ve moleküler yollar kullanılmaktadır. Kanserin doğuşu ve tedavisine ilişkin araştırmaların temelini oluşturan teori, normal hücrelerin moleküler, biyokimyasal ve hücresel seviyedeki bu yollardaki değişiklikler sonucu kansere dönüşmesidir ve her hücre için bozulmanın meydana gelmesi için belli bir oran vardır. Son 50 yılda kanser üzerine yapılan çalışmalar, kanserin artık sadece mutasyonlarla değil aynı zamanda genomdaki epigenetik değişiklikleri de içeren daha kompleks bir hastalık olarak tanımlamasına yol açmıştır. Bu değişiklikler özellikle hücre bölünmesi veya ölmesi arasındaki hassas dengeyi bozarak hücreye sürekli bölünme emri veren proteinler üretmektedir. Kanserin başlaması ve ilerlemesi hem hücre içi faktörlere (kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, epigenetik mekanizmalar, bağışıklık koşulları gibi) hem de çevresel faktörlere (örneğin tütün kullanımına, kimyasal ve radyasyona maruziyete ve mikroorganizmalar yoluyla oluşan enfeksiyonlara) bağlıdır. Bu faktörler tek tek veya birlikte hareket ederek anormal hücre davranışı ve aşırı proliferasyona sebep olabilmektedir (Hejmadi, 2009; Pelengaris, 2006).

### **1.3.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Genetik Değişiklikler**

Tanımlanabilir 50'den fazla kalıtsal kanser türü olmasına rağmen, popülasyonun %0,3 'ünden azı ailesel mutasyonlara bağlıdır ve bunlar tüm kanser vakalarının %3-10'undan azını oluşturur (Ferguson vd., 2015; Roukos, 2009). Kalıtsal (ailevi) kanserler, bir veya daha fazla gende olan mutasyonların, bireyleri kanser gelişimine yatkın hale getirdiği için bu kanserlerin erken başlangıcına neden olabilen genetik bir hastalıktır. Örneğin DNA tamir genleri olan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilen bazı mutasyonlar sonucu meme ve yumurtalık kanserlerinin ortaya çıkma riski %75 'den daha fazla olarak bildirilmektedir (Roukos, 2009). Diğer bir örnek ise kolorektal kanserlerin bazılarının ailesel formda karşımıza çıkmasıdır. Bu formlar ailesel adenomatoz polipozis ve kalıtsal polipozik olmayan kolon kanserleridir; ancak bunlar kolon kanseri



vakalarının %5 'inden daha azını oluşturur (Hodgson, 2008). Çoğu durumda, genetik testler, nesiller boyunca geçen mutant genleri ve/veya anormal kromozomları tanımlamak için kullanılabilir. Böylece bireylerde kansere genetik yatkınlık bu şekilde saptanabilir. Ancak kanserlerin büyük çoğunluğu kalıtsal değildir ("sporadik kanserler").

Kanser vakalarının çoğu, hücre büyümesini düzenleyen tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır. Diğer yaygın mutasyonlar, DNA tamir genlerinin, proto-onkogenlerin ve kan damarlarının üretiminde (anjiogenezde) rol oynayan genlerin işlevini değiştirir (Hodgson, 2008). Gen mutasyonları, görüldükleri hücre tipine bağlı olarak (germline veya somatic) olarak sınıflandırılır. Germline, üreme hücreleri olan yumurta ve spermi ifade ederken, somatik üreme hücreleri dışında vücudun tamamını oluşturan hücreleri temsil eder. Germline hücreleri haploit, somatik hücreler ise diploittir. Germline mutasyonları nesiller boyunca aktarılır ve kanser riskini artırır. Bütün bunlarla beraber kanser iki grup gende oluşan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bunlar tümör baskılayıcı genler (DNA tamir genleri, apoptoz genleri vs) ve hücre çoğalmasında işlev gören proto-onkogenlerdir (Lengauer vd., 1998). Bu genlerin herhangi birisinde ortaya çıkabilecek bir mutasyon sağlıklı hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine sebep olabilir. Oluşan mutasyonlar daha ziyade kümülatif oldukları durumda, yani uzun vadede mutasyonların birikmesi sonucu kanser oluşumunda etkilidir.

Normal bir hücrenin bir kanser hücresine dönüşmesi için, hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen genlerin değiştirilmesi gerekir (Croce, 2008). Bu değişiklikler; epigenetik ve genetik değişiklikler olarak ortaya çıkabilir. Epigenetik değişiklikler, DNA metilasyonu ve/veya histon modifikasyonları yoluyla gerçekleşir ve bu değişiklikler genlerin ifadesinin pozitif veya negatif yönde değiştirir (Kim ve Kaang, 2017). Genetik değişiklikler ise kromozomların kazanılmasından veya kaybolmasından, tek bir DNA nükleotidini etkileyen bir mutasyona kadar farklı düzeylerde gerçekleşebilir. Ayrıca 100 ila 500 genin ekspresyonunu kontrol eden bir mikroRNA'nın susturulması veya aktive edilmesi de kanser oluşumunda etkilidir (Balaguer vd., 2010; Lim vd., 2005). Bu değişikliklerden etkilenen iki geniş gen kategorisi vardır. Bunlar proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir.

### 1.3.1.1. Proto-Onkogenler

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü, proto-onkogenlerin kontrolünü kaybederek hücrenin aşırı proliferasyonu ile oluşabilir. Proto-onkogenler hücre bölünmesini uyaran, hücre farklılaşmasını önleyen ve hücre ölümünü durduran proteinleri kodlar. Proto-onkogenler; olgun hücrelerde sürekli olarak eksprese edilmezler. Ancak bazı mutasyonlar sonucu eksprese edilmeleri gereken durumlar dışında aktif olarak eksprese olarak kansere neden olma potansiyeline sahiptirler (Fahraeus vd., 1999) ve bu genlerin mutasyona uğramış haline onkogen denir (Weinstein ve Joe, 2006). Onkogenler, hücre bölünmesini çeşitli yollardan, örneğin, mitozu teşvik eden hormonları üreterek indükleyebilir. Başka bir deyişle, hücre üzerindeki bir hormon reseptörü uyarıldığında bu sinyal, transkripsiyonu düzenlemek için hücre yüzeyinden hücre çekirdeğine iletilir (Chandek ve Mooi, 2010). Onkogenler DNA'nın transkripsiyonuna katılarak protein sentezinde yer alabilirler. Böylece onkogenler normal düzeyde seyreden hücre döngüsünü bozarak kontrolsüz bölünmeye sebep olabilir (Weinstein ve Joe, 2006).

### 1.3.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, mitozu ve hücre bölünmesini baskılayan proteinleri, hücre ölümünü indükleyen proteinleri veya DNA'yı tamir eden proteinleri kodlayarak tümör oluşumunu engellemekle görevli genlerdir. Genel olarak tümör baskılayıcılar, hücrel stres veya DNA hasarı ile aktive edilen transkripsiyon faktörleridir. Oluşan DNA hasarı çoğunlukla, tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonuna yol açan enzimleri ve yolları tetikler. Bu tür genlerin görevi, DNA onarımı için devam eden hücre döngüsünü durdurmak ve DNA'da oluşan hataların yeni hücrelere geçmesini engellemektir.

En önemli tümör baskılayıcı genlerden biri olan *p53* geninin ürünü olan p53 proteini, hipoksi (oksijen azlığı) ve ultraviyole radyasyon hasarı gibi birçok hücrel stres etkeni tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür. p53 esas olarak mitozun G1 kontrol noktasına (G1-S geçişine) etki ederek hasarlı DNA ve diğer olumsuz koşullara cevap olarak hücre döngüsünün ilerlemesini bloke eder (Matoba vd., 2006). Dolayısıyla tümör baskılayıcı genin kendisinde veya onu aktive eden sinyal yolağında meydana gelen bir mutasyon DNA onarımını engelleyebilir veya inhibe edebilir. Bunun sunucunda kanser

kaçınılmaz olabilir. Bunların dışında tümör baskılayıcı genlerde ailesel mutasyonlar da olabilir. Örneğin, *Rb* geni mutasyonları retinoblastoma ile bağlantılı iken *APC* gen mutasyonlarını adenopolipozis kolon kanseri ile bağlantılı olabilmektedir (Kwong ve Dove, 2009). Ayrıca, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki kalıtsal mutasyonlar da meme kanserinin başlamasına neden olabilir (Roukos, 2009).

### **1.3.2. Kanser Moleküler Tedavisi**

Kanser tedavilerinin temel amacı, kontrolsüz büyüyen tümör (malign) hücrelerini seçici olarak öldürmek veya büyümesini engellemektir. Ancak, mevcut tedaviler kanser hücrelerinin yanı sıra normal hücreleri de olumsuz etkilemektedir. Kansere sebep olan biyolojik süreç aydınlatıldıkça kanser tedavisi devrimsel değişikliklere uğramaktadır. Antik Mısır'da tümör çıkarma ameliyatları tarihi kayıtlara geçerken 19.yy sonlarında hormonal tedavi ve radyasyon tedavisi gelişmiştir (Enger, 2012). Kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler 20. yüzyılın ürünleridir (Fahraeus vd., 1999). Bu geleneksel kanser tedavi (hormonal ve radyasyon) yöntemleri ile dünyada bir yılda ortalama 9,6 milyon kişinin hayatını kaybettiği belirlenmiştir. Bundan dolayı kanser hastalığına yönelik yeni yöntem arayışı 21.yy'ın en çarpıcı hedefleri arasındadır (Bray vd., 2018). Günümüzde rutin kanser tedavisi; cerrahi tedavi, kemoterapi ve/veya radyoterapi olarak uygulanmaktadır. Bunlarla birlikte yaygın olmamakla birlikte immünoterapi, kişiselleştirilmiş tıp ve alternatif tıp yaklaşımları ile de tedavi desteklenebilmektedir.

#### **1.3.2.1. Cerrahi Tedavi**

Kanser tedavisinde kullanılan cerrahi (ameliyat), kanserli dokunun ve/veya bölgenin hastanın vücudundan çıkarıldığı bir işlemdir (Subotic, 2012). Kanser cerrahisi, M.Ö. 1600'lerde Eski Mısır'a kadar uzanan ilk kanser tedavilerindendir (Minagar vd., 2003). Başlarda hastalar için riskli olması nedeniyle nadir kullanılan kanser cerrahisi, onkolojik olarak yeterli bir cerrahi prosedürünün belirlenmesi ile birlikte, 1867 yılında kanser tedavisi için yaygın olarak kullanılan bir tıbbi müdahale haline gelmiştir. Onkolojik cerrahide ilerleme meme, kolorektal, mide, bademcik ve nörolojik kanserler dâhil olmak üzere tüm solid kanser türlerinde bölgesel tümörün çıkarılması ile daha yaygın hale

gelmiştir. Ancak hematolojik kanserlerde cerrahi yöntem uygulanabilir değildir. X ışınlarının keşfi ve tıbbi görüntülemenin başlaması ile tümörlerin yerinin ve kapsamının tanımlanmasını sağlayan radyografi ve bilgisayarlı tomografi taraması ortaya çıkmıştır. Bu taramalar cerrahinin ön aşaması olarak tümör yerini saptamak için kritik öneme sahip olmuştur (Halsted, 1894). Solid tümörlerin tedavisinde hastaların bir kısmında tedaviye yanıt alınamasa da uzun süreli sağ kalım oranları artmış, fakat hastalar arasındaki ölüm oranları değişmeden kalmıştır (Wyld vd., 2015). Yine de kitlesel tümörlerin cerrahi ile vücuttan çıkarılması kanser tedavisi için ilk aşama olarak uygulanmakta olup, tek başına yetersiz kalacağı için cerrahinin kemoterapi ve/veya radyoterapi ile devam ettirilmesi tedavi şansını artırmaktadır. Cerrahi tedavinin en yaygın yan etkisi tümör dokusunun tam temizlenememesidir. Ayrıca bazen erken evreden çıkmış olan türlerde, kanser hücrelerinin bir kısmı başka dokulara metastaz yapmak amacıyla tümörden ayrıldıkları için, tüm kanserli doku çıkarılsa bile cerrahi müdahale nihai olarak çok da etkin olamayabilir.

### **1.3.2.2. Radyoterapi**

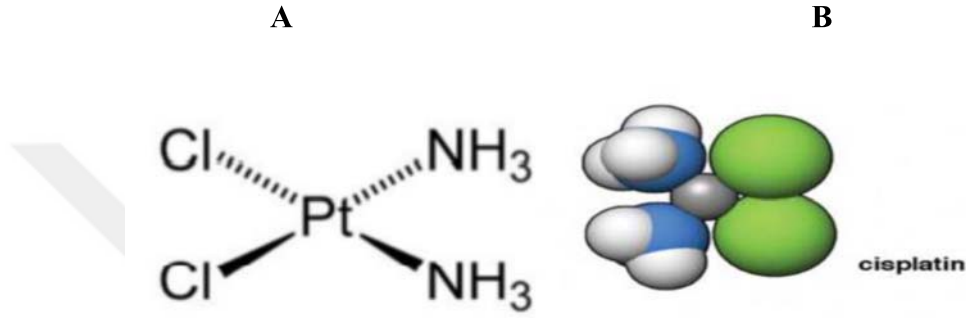
Radyasyon terapisi veya radyoterapi, genellikle tümör hücrelerini kontrol etmek veya öldürmek amacıyla doğrudan iyonlaştırıcı radyasyonun kanser tedavisinin bir parçası olarak kullanılmasını içeren bir terapi türüdür. İyonize radyasyon, kanserli dokunun DNA'sına zarar vererek hücre büyümesini kontrol altına alır ve böylece hücre ölümüne sebep olur. Radyasyon tedavisi vücudun belli bir bölgesinde bulunan kanser türlerinin tedavisinde etkilidir. Genellikle malign bir tümörün ameliyat sonrası tekrarlamasını önlemek için adjuvan yani ana tedaviye yardımcı bir tedavi türü olarak kullanılmaktadır. Radyasyon tedavisi çoğu zaman kemoterapi ile birlikte uygulanmaktadır. Agresif veya tedaviye cevap vermeyen (dirençli) kanserlerde kemoterapi öncesi ve sonrasında kullanılmaktadır. Her ne kadar kanserli dokuları normal dokulardan ayırt etmek için, radyasyon ışınları tümörleri hedeflese de, tümör çevresindeki dokularda da tahribata neden olabilmesi radyoterapinin en yaygın yan etkisidir (Schaue ve McBride, 2015).

### 1.3.2.3. Kemoterapi

Kemoterapi, ilk olarak 1900'lerin başlarında Paul Ehrlich tarafından, antibiyotik kullanımı gibi herhangi bir hastalığı tedavi etmek için kimyasal madde kullanımı olarak tanımlanmıştır (DeVita ve Chu, 2008). İlk modern kemoterapötik ajan, 1907'de keşfedilen ve sifiliz tedavisinde kullanılan bir arsenik bileşiği olan Arsenfenamin idi. Bunu daha sonra Sülfonamidler ve Penisilin takip etti (Nichols ve Walker, 1923). Günümüzde kullanılan kemoterapi ilaçları kanser hücreleri gibi hızla büyüyen ve bölünen hücreleri hedefler. Bu ilaçlar kanseri tamamen iyileştirmek dışında, yaşam süresini uzatmak ve/veya semptomları azaltmak amacıyla kullanılabilir (Chabner ve Roberts, 2005). Kemoterapi belirli bölgeleri hedef alan radyasyon veya ameliyattan farklı olarak tüm vücudu etkilemektedir. Pek çok farklı kanser türü olduğu gibi doğru orantılı olarak pek çok da farklı tedavi türleri vardır. Kemoterapi çok çeşitli kanser türleri ve hastalıkları için kullanılabilir ve farklı kimyasallar bu amaçla kullanılır. Bunlara örnek olarak Cisplatin, Cyclophosphamide, Methotrexate, 5-fluorouracil, Vinorelbine, Doxorubicin, Docetaxel, Epirubicin, Vincristine, Folinic acid, Oxaliplatin verilebilir. Bu kimyasallar; alkilleyici ajanlar, anti-metabolitler, antrasiklinler, topoizomeraz inhibitörleri, mitotik inhibitörler, kortikosteroidler gibi farklı bileşikleri içerirler (Malhotra ve Perry, 2003). Belirtilen bu ilaçların her biri; lösemi, lenfoma, multipl miyelom, sarkom, meme, bağırsak yolu, prostat, yumurtalık kanserleri gibi farklı kanser ve hastalıkları tedavi etme potansiyeline sahiptir. Ancak bu kimyasalların ve kimyasal karışımların yan etkileri olabilir. Kemoterapinin de diğer ilaçlar gibi yan etkileri vardır. En sık görülen yan etkiler; bulantı, kusma, yorgunluk, saç dökülmesi, baş ağrısı, kas ağrısı, mide ağrısı ve yanma, sinir hasarlarından kaynaklanan ağrıdır (Rybak vd., 2009). Ayrıca cilt, saç, bağırsak ve kemik iliği hücreleri gibi hızlı büyüyen bazı sağlıklı hücreleri de etkileyebilir. Kemoterapinin tedavideki bazı yan etkilerinin nedeni budur (Rybak vd., 2009).

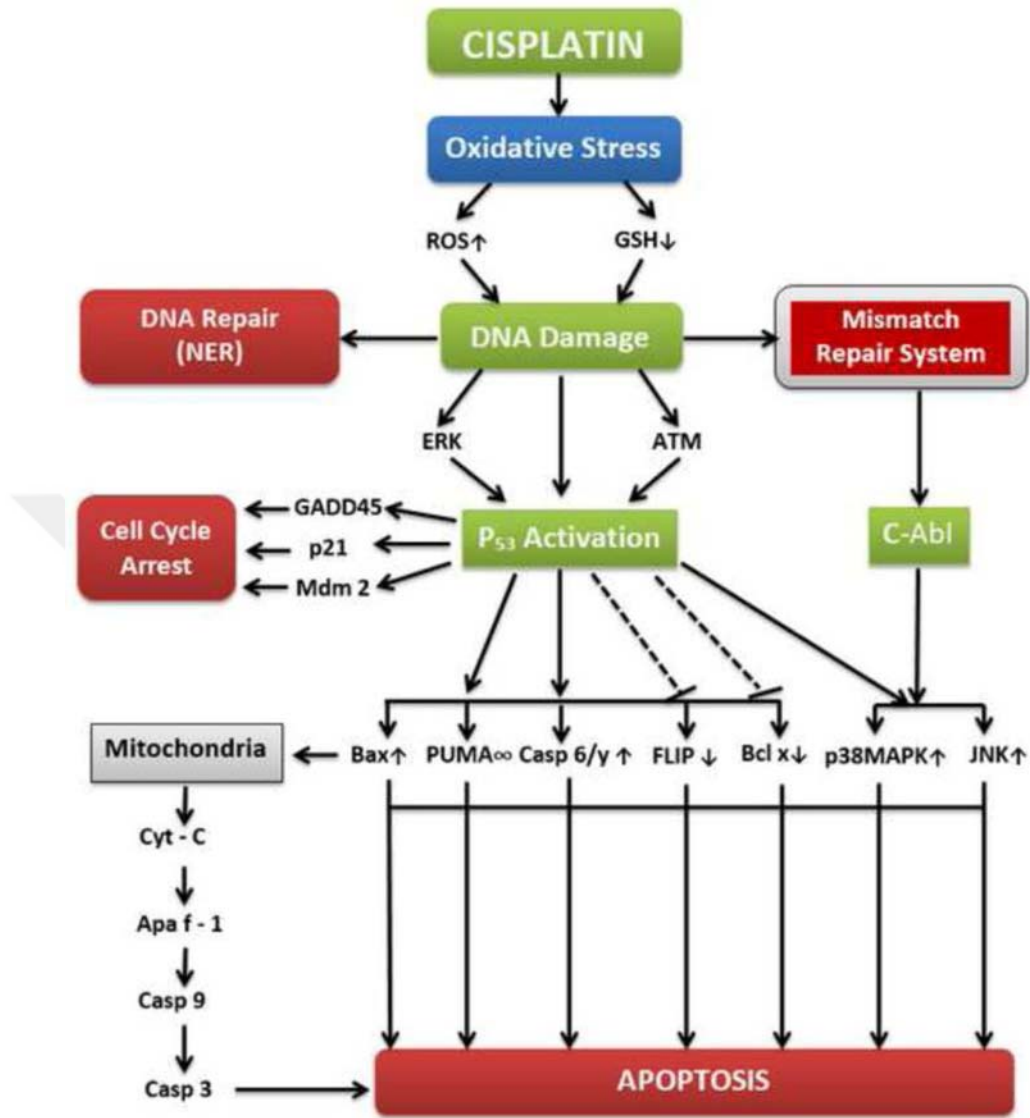
Bugün dünyada en çok kullanılan kemoterapi ilaçlarından biri olan Sisplatin 1845'te keşfedildi ve 1978/1979'da tıbbi kullanım için lisans aldı (Oun vd., 2018). Sisplatin, Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen ve bir sağlık sisteminde ihtiyaç duyulan en etkili ve güvenli ilaçlar listesi olan "Dünya Sağlık Örgütü Temel İlaçlar Listesi"nde yer almaktadır (WHO, 2015). Sisplatin, cis-diamminedichloroplatin (II) olarak da

adlandırılan kare düzlemsel bir geometriye sahip metalik (platin) bir koordinasyon bileşimidir (Şekil 1). Bu anlamda sisplatin, platin bazlı anti-neoplastik ilaç ailesinde yer almaktadır. Oda sıcaklığında beyaz veya koyu sarı ila sarı-turuncu kristal toz formundadır. Suda, dimetilprimanid ve N, N-dimetilformamid içinde hafifçe çözünür. Sisplatin normal sıcaklık ve basınçlarda kararlıdır, ancak zamanla yavaş yavaş trans-izomerlere dönüşebilir (IARC., 1981).



Şekil 1. Sisplatin'in kimyasal ve dört ligandla çevrili iki kat yüklü platin iyonunun bir gelmesiyle oluşan moleküler yapısı (Goodsell, 2006; Weiss ve Christian, 1993).

Sisplatin, birçok kanseri tedavi etmek için kullanılan bir kemoterapi ilacıdır (The American Society of Health-System Pharmacists, 2016). Bunlar testis kanseri, yumurtalık kanseri, rahim ağzı kanseri, meme kanseri, mesane kanseri, baş ve boyun kanseri, özafagus kanseri, akciğer kanseri, mezotelyoma ve beyin hücreleridir. Özellikle tedavi oranını %10'dan %85'e yükseltebildiği testis kanserine karşı çok etkilidir (Einhorn, 2009). Şekil 2'de gösterildiği gibi sisplatin kısmen DNA'ya bağlanarak ve replikasyonunu inhibe ederek çalışır. Yani DNA onarım mekanizmalarına müdahale ederek, DNA hasarına neden olabilir ve daha sonra da farklı yollar aracılığıyla kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebilir (The American Society of Health-System Pharmacists, 2016).



Şekil 2. Sisplatin'in kanser tedavisindeki moleküler mekanizması (Dasari ve Tchounwou, 2014).

Sisplatin kullanan hastalardaki ilaç direnci, şiddetli böbrek sorunları, alerjik reaksiyonlar, enfeksiyonlara karşı bağışıklık, gastrointestinal bozukluklar, kanama ve özellikle genç hastalarda işitme kaybı gibi sayısız istenmeyen yan etkiler nedeniyle, karboplatin ve oksaliplatin gibi diğer platin içeren anti-kanser ilaçları da tedavi amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca, sisplatinin diğer ilaçlarla kombinasyon terapilerinin ilaç direncinin üstesinden geldiği ve toksisiteyi azalttığı düşünülmektedir (Desoize, 2002).

### 1.3.3. Kişisel Tıp ile Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde ilerleme yavaştır ve tedavi süreci haftalar veya aylar almaktadır. Geleneksel olarak tedavi, patolojik muayeneye ve hastalığın semptomlarına dayanarak doktorlar tarafından verilir. Tanı bilimindeki ve erken tespit belirteçlerindeki ilerlemelerden sonra, patolojik semptomlar gelişmeden önce bazı kanser türleri tespit edilebilir. Bu belirteçler biyokimyasal, epigenetik, genetik, metabolomik, proteomik ve görüntüleme ile ilgili olabilmektedir. Aynı hastada belirli bir kanser türüne ait birden çok belirtecin tespit edilmesi, erken ve doğru bir şekilde teşhis koyulmasına yardımcı olabilir. Bu bilgiler kişiye özgü tedavilerin geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Klinikte kullanılan en yaygın tanı türü patoloji olsa da, kanser türüne has biyobelirteçleri kapsayan moleküler tanı kişiye özgü tedavileri geliştirmesi açısından önemlidir (Stricker vd., 2011).

Tümörlerdeki genetik varyasyonlarla birlikte, ilaçları metabolize eden ve işleyen genlerdeki kalıtsal genetik varyasyonlar da tedaviye olan yanıtı etkiler. Bu varyasyonlar, belirli ilaçların toksisitesini artırabilir. Bu bilgiler, genotip bilgisine dayanarak spesifik bir tedaviye cevap verecek olan kişiye özgü ilaçları tanımlayan “farmakogenomik” biliminin gelişimini sağlamıştır (Schroth vd., 2009). Kişiselleştirilmiş tıbbın amacı, kişiye özgü belirteçleri dikkate alarak, sağlıklı hücrelere en az toksisite gösteren veya hiç toksisite göstermeden kanser hücrelerini hedefleyerek; doğru ilacı (ilaçları), doğru zamanda ve doğru dozda kullanılacak şekilde tasarlanmaktadır.

Bir organizmadaki tüm hücreler her ne kadar aynı genetik materyale sahip olsalar da, her dokuda kodlanan proteinler birbirinden farklılık göstermektedir. Dolayısıyla aynı organizmadaki bir kanserde, farklı tümörler aynı DNA'ya sahip olabilir iken, gen ekspresyon profili farklı tümör tiplerinde farklıdır. Mikroarray gibi teknolojiler, bir seferde yüzlerce genin gen ekspresyon profilininin incelenmesini ve kansere bağlı bir gen ekspresyon profilinin normal profilden ayırt edilmesine olanak sağlar. Standart tıbbi tedavi, uzun yıllar boyunca, bireylerin genetik değişkenliğinin hesaba katılmadığı ve sonuçlardan çoğunun popülasyon düzeyinde olduğu toplumsal (cohort) tabanlı epidemiyolojik çalışmalar tarafından yönlendirilmişti (Offit, 2011). Ancak, günümüzde gündemde olan kişiselleştirilmiş tıp, bir tedavi stratejisi oluşturulmadan önce bireyin genetik yapısını ve hastalık geçişini dikkate alır. Bu kişiselleştirilmiş tedavi, bir hastanın aile geçmişine, sosyal koşullarına, çevresine ve yaşam tarzına dayandığı için geleneksel tedaviden ayrılır.



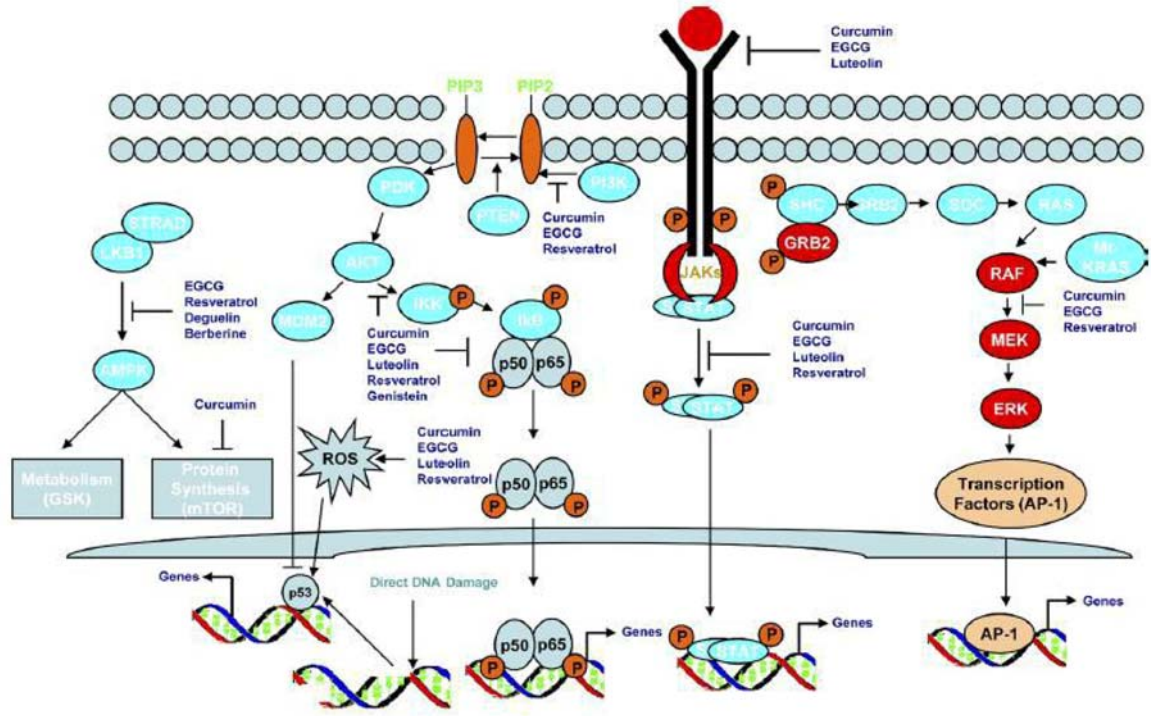
Modern kişiselleştirilmiş tıp, hedefe yönelik tedaviye dayanmaktadır. Hedefe yönelik tedavide, değişmiş yolak ve kansere neden olan bileşenler hakkında bulunan bilgiler önemlidir. Örneğin, Herceptin, daha yüksek düzeyde *HER-2* geni ifade eden meme kanseri hastalarında kullanılır. Kronik miyeloid lösemi (KML) spesifik olarak 9:22 translokasyonu ile karakterize bir kanser türüdür. Bu hastalarda kromozom 9 ve kromozom 22 arasında gerçekleşen karşılıklı translokasyon sonucu Philadelphia kromozomu olarak adlandırılan mutant bir kromozom oluşur. Bu translokasyon sonucu oluşan *Bcr-abl* geninin ürünü olan protein tirozin kinaz aktivitesi göstererek hücre profilerasyonunu indükler (Offit, 2011). Bu yüzden bir tirozin kinaz inhibitörü olan ‘Gleevec’ kronik miyeloid lösemileri hastalarına uygulanır. Bütün bunlara ek olarak kişiselleştirilmiş tıp, bir hasta hakkında genetik veya diğer bilgileri sistematik bir şekilde kullanarak tedavi edici ilacı seçer ve optimize ederek hastaya uygular. Tedaviden sonraki süreçte ise hastayı koruma takibi oluşturur.

#### **1.3.4. Alternatif Tıp: Doğal Bileşiklerle Kanser Tedavisi**

Eski insan kalıntılarında ve tıp literatüründe, antik çağlardan beri eski Mısır'daki ve klasik dünyadaki firavunların zamanlarına dayanan kansere ait kanıtları tespit edilmiştir. Yüzyıllar önce yaşamış olan hekimlerin tanısını yorumlamak zor olsa da, tanılarının bir kısmının kanserle ilgili olduğu düşünülmektedir. Eski tıbbi literatüre göre, vücutta meydana gelen şişlik ve ağrılı bölgelerin keserek çıkartıldığı (ameliyat) ve ağrılı bölgede bazı doğal bitkilerin kullanıldığı görülmüştür. Bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklardan gelen doğal ürünler, eskiden beri gelen tecrübelerle halk arasında kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra da bu doğal ürünler, klinik çalışmalarla birçok kanserin tedavisinde kullanılmak üzere anti-kanser ajanlar olarak elde edilmiştir (Graham, 2000). Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) desteklediği programlar gibi büyük ölçekli anti-kanser ilaç keşfi ve tarama programları anti-kanser doğal bileşiklerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır. Son birkaç yılda, doğal ürün bazlı ilaç keşfi, birleşik sentez ve yüksek verimli tarama gibi yeni teknolojilere ve bunlarla ilişkili yaklaşımlara bağlı olarak artmaktadır. Vincristine, Irinotecan, Etoposide ve Paclitaxel, bitki kaynaklı bileşiklerin klasik örnekleridir. Actinomisin D, Mitomisin C, Bleomisin, Doksorubisin ve l-Asparaginaz mikrobiyal kaynaklardan; Sitarabin ise denizden elde edilen ilaçlardır (Kinghorn vd., 2008). Bugüne kadar kanser ilacı olarak; antrasiklinler,

vinca alkaloidleri, kamptotesinler ve yeni epotilonlar sınıfı geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları klinik kullanımlar ile bazıları ise klinik çalışmalarda test edilmiştir. Bütün bu ilaçlar; mikrotübüllerle etkileşim, topoizomerez I veya II'nin inhibisyonu, DNA'nın alkilasyonu ve tümör sinyal yolları olmak üzere çeşitli etki mekanizmaları ile karakterize edilir (Kingham vd., 2008).

Kanser terapisinde olumlu etkileri olduğu gösterilen birçok bitki bileşiği vardır. Örneğin, yakın zamanda yeşil çayda bulunan bir antioksidan olan EGCG'nin (epigallocatechin-3-gallate) dişi farelerde meme kanseri büyümesini önemli ölçüde yavaşlattığı gösterilmiştir (Singh vd., 2011). *Punica granatum*'un (nar) meyve suyu, kabuğu ve yağı kullanımının; tümörün hücre çoğalmasında, hücre döngüsünde ve anjiyogenez ile etkileşimi içeren anti-kanser aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Lansky ve Newman, 2007). Başka bir çalışmada, sarımsakta bulunan kükürt bileşiklerinin anti-kanser etkisine sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Ariga ve Seki, 2006). *Commiphora myrrha*'nın ve diğer türlerin kurutulmuş reçinesinden türetilen doğal bir bileşik olan myrrh, anti-enflamatuar ve dezenfektan özellikleriyle bilinir. Myrrh, tarihsel olarak mide ağrısı, hazımsızlık, zayıf kan dolaşımı, yara iyileşmesi, bazı cilt hastalıkları ve düzensiz adet döngüsü gibi çeşitli hastalıklarda kullanılmıştır. Myrrh'in anti-kanser alanında çok etkili olarak bilinmesinin sebebi, genel olarak kanser hücrelerini iyi öldürdüğü için değil, diğer kanser ilaçlarına karşı dirençli hücreleri öldürdüğü içindir (Gullett vd., 2010). Özellikle meme ve prostatta, kanser hücreleri tarafından aşırı üretilen doğal bir faktör olan Bcl-2 adlı bir proteini etkisiz hale getirerek çalıştığına inanılmaktadır. Her ne kadar myrrh bileşiği; Vincristine, Vinblastine ve Paklitaksel gibi bitkilerden elde edilen diğer anti-kanser ilaçları kadar güçlü görünmese de, avantajı sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini öldürmesidir (Kingham vd., 2008). Kansere karşı mücadelede en önemli bitki bileşiklerinden bir diğeri Pasifik Porsuk bitkisinden elde edilen Paklitakseldir. Paklitaksel, meme ve yumurtalık kanseri hastalarının klinik tedavisi için dünya çapında onaylanmıştır. Paklitaksel, anti-kanser aktivitesini mitozu inhibe ederek gerçekleştirmektedir (Song ve Dumais, 1991). Ayrıca diğer bazı bitki bileşikleri Kurkumin, Resveratrol, EGCG, Likopen, Genistein ve Luteolin özellikle tümör baskılayıcı p53 aktivasyonunda ve transkripsiyon faktörü NF-κB inaktivasyonunda etkilidir (Şekil 3) (Gullett vd., 2010).



Şekil 3. Kurkumin, Resveratrol gibi bazı bitki bileşiklerinin kanser tedavisindeki moleküler mekanizması ((Appella ve Anderson, 2001).

Tümör baskılayıcı *p53*; hücre döngüsü, apoptoz, genomik stabilite ve DNA tamirinin kontrolünde çok önemli bir rol oynar (Appella ve Anderson, 2001; Bode ve Dong, 2004). Aktif *p53*, düzenleyici DNA sekanslarına bağlanır ve hücre döngüsü inhibisyonu, apoptoz, genetik stabilite ve anjiyogenez inhibisyonunda fonksiyonu olan belirli genleri aktive eder (Carr, 2000; Ko ve Prives, 1996; Sherr ve Weber, 2000). Ayrıca, aktif *p53*, hem trans-aktivatör hem de trans-repressör olarak davranabilir (Agarwal vd., 2007). Bazı bitkisel bileşikler (Kurkumin, Resveratrol, EGCG, Likopen, Genistein ve Luteolin), *p53*'ü aktive ederek hücre döngüsünün durdurabilir veya apoptozu tetikleyebilir. Örneğin, EGCG, prostat kanseri ve meme kanseri hücrelerinde *p53* ve onun hedefleri *p21* ve *Bax* genlerinin ekspresyonunu indükler (Hastak vd., 2005). Luteolin'in, *p53* ve onun hedefleri olan *p21* ve *Bax* genlerini aktive ederek hücre siklusunu durdurduğu ve apoptozu indüklediği bilinmektedir (Thakur vd., 2010). Kurkumin'e maruz kalan meme ve mesane kanseri hücrelerinde, *p53*'e bağlı *Bax* indüksiyonu yoluyla apoptoz belirlenmiştir (Shankar ve Srivastava, 2007; Tian vd., 2008). Resveratrol de; *p53*'ü ve dolayısıyla *p21*, *p27*, *Bax*,

*Puma*, *Mdm2*, *Siklin G* ekspresyonunu aktive ederek apoptozu indükleyebilir (Shankar vd., 2007). Genistein; *p53* ve *p21*'i aktive etmiş ve insan malign glioma hücre hatlarında G2 / M kontrol noktasında hücreleri durdurarak apoptozu indüklemiştir (Schmidt vd., 2008). Bitkisel bileşikler ayrıca, yakından ilişkili iki protein olan *p63* ve *p73*'ü içeren memeli hücrelerinde hücre döngüsünü durdurarak apoptozu indükleyebilir. Örneğin EGCG bileşiği; *in vitro* multipl miyelom hücrelerinde *p73*'ü ve buna bağlı *p21*, *Siklin Gl*, *Perp*, *Mdm2*, *Wig1* ve *Pigl*'in ekspresyonunu aktive ederek apoptozu indüklemiştir (Shammas vd., 2006).

NF- $\kappa$ B, genlerin transkripsiyonunu destekleyen ana bir transkripsiyon faktörüdür (Aggarwal, 2004). Serbest radikaller, enflamatuar sitokinler, kanserojenler, gama radyasyonu ve UV ışığı dâhil olmak üzere NF- $\kappa$ B'nin birçok aktivatörü vardır. NF- $\kappa$ B hedef genleri; hücrel büyüme kontrol ederken, kontrolü kaybettiğinde; inflamasyon, apoptoz, istila, metastaz ve kemoterapi ve radyasyona duyarlılığa sebep olabilmektedir. Kurkumin, resveratrol, EGCG, likopen, genistein ve luteolin gibi doğal bileşikler, *p53*'ü aktive ettikleri gibi NF- $\kappa$ B'nin de güçlü inhibitörleridir (Kasinski vd., 2008; G. Y. Kim vd., 2004; Singh ve Aggarwal, 1995). Bu bileşikler, NF- $\kappa$ B'yi aktive eden sinyal yollarını, NF- $\kappa$ B'nin çekirdeğe translokasyonunu, dimerlerin DNA bağlanmasını veya transkripsiyonu bloke edebilir. NF- $\kappa$ B'nin inhibisyonu, *Bcl-2*, *Siklin D1*, *Matriks metaloproteazlar*, *VEGF* ve diğerleri dahil olmak üzere kanserde indüklenen hedef genlerinin inhibisyonu ile sonuçlanır (Hastak vd., 2003; Ju vd., 2007).

İnsanlar medeniyetin başlangıcından beri tedavi edici özellikleri için doğal bileşenleri kullanmışlardır. Bu doğal bileşenlerin kullanımı sadece bitkilerle sınırlı kalmayıp, zehirli hayvanlardan elde edilen toksinler de tedavi edici olarak kullanılmıştır. Zehirler; nörotoksinler (sinir uyarılarının iletimini hedef alan toksinler) ve miyotoksinler (kas dokusuna saldıran ve parçalayan toksinler) gibi biyolojik olarak aktif bileşenlerden oluşan bir karışımdır. Zehir bileşenlerinin terapötik amaçlı başarılı bir şekilde kullanılabilmesi, onu bilim adamları için daha ilgi çekici ve çalışılabilir bir alan haline getirmiştir. Zehirlerden geliştirilen terapötiklerin örnekleri arasında; büyük bir yılan türü olan *Bothrops jararaca* zehri (kaptopril), gila canavarı olarak bilinen kertenkele *Heloderma suspectum* zehri (eksenatid) ve deniz salyangozu olan *Conus magus* zehri (zikonotid) bulunur. Bazı yılan ve eklem bacaklı zehirleri, çeşitli kanser hücrelerinde yüksek derecede seçici toksisiteye sahiptir ve ayrıca kanser terapisinde ek tedaviler olarak

da kullanılmıştır (Ferlay vd., 2015; Hanahan ve Weinberg, 2011). Örneğin, kemoterapinin neden olduğu periferik nöropatili hastalarda farmakolojik bal arısı zehri uygulanmıştır (Yoon vd., 2012). Aslında, arı zehrindeki fosfolipaz A2, L-aminoasit oksidaz, disintegrin, melittin, polybia-MPI ve klorotoksin gibi birçok bileşen kanser gerilemesinde etkili olabilirler. Önceki bir çalışmada, arı zehrinin mitokondriyal membran potansiyelini zayıflattığı, sitokrom C salınımını ve kaspaz-3 aktivitesini artırarak DNA parçalanmasına sebep olduğu bulunmuştur (Chaisakul vd., 2016). Bu nedenle, birçok mekanizma yoluyla anti-kanser etki gösterme kapasitesine sahip bitki ve hayvan toksinlerinin tedavi amaçlı kullanımı, klinik yaklaşımlarda alternatif bir araç olabilir. Arı zehrinin anti-kanser etkisinin bilinmesine rağmen, kanser hücrelerindeki seçiciliğinin moleküler temeli ve uzun vadedeki etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

#### **1.4. Çalışmanın Amacı**

Arı zehrinin kanser hücreleri üzerindeki moleküler mekanizmasının araştırılması ve arı zehrinin kanser terapisindeki uzun vadedeki sitotoksik seçiciliğinin kemoterapi ajanı sisplatin ile karşılaştırılarak aydınlatılmasıdır.

Bu amaca yönelik yapılan deneylerde kullanılan yöntemler;

1. MDA-MB-231 metastatik meme kanseri, HEPG2 karaciğer kanseri hücreleri ve sağlıklı hücreler olan NIH/3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin kültürünün hazırlanması
2. Arı zehrinin farklı şartlarda hücelere uygulanarak etkili doz ve inkübasyon sürelerinin belirlenmesi
3. Arı zehrinin hücrelerden uzaklaştırıldıktan belli zaman sonrasındaki hücre ölümünün devam edip etmediğinin tripan mavisi yöntemi yoluyla belirlenmesi
4. Sisplatin'in farklı şartlarda hücelere uygulanarak etkili doz ve inkübasyon sürelerinin belirlenmesi
5. Sisplatin'in hücrelerden uzaklaştırıldıktan belli zaman sonrasındaki hücre ölümünün devam edip etmediğinin tripan mavisi yöntemi yoluyla belirlenmesi ve arı zehri sonuçlarıyla karşılaştırılması

6. Total DNA İzolasyonu yapılarak, DNA konstrantrasyonlarının ölçülmesi ve agaroz jel elektroforezinde DNA fragmentasyonunun tespit edilmesi
7. Yine total DNA kullanılarak QPCR yöntemi ile mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısının tespiti ve arı zehrinin sağlıklı ve kanser hücrelerindeki etkisinin mtDNA kopya sayısı açısından karşılaştırılması
8. Hoechst ile DNA boyaması,  $\gamma$ -H2AX ve beta aktin proteinlerinin immün boyama ile boyanarak arı zehrinin DNA hasarı ve/veya hücre iskeleti üzerine etkisinin belirlenmesidir.



## **2. YAPILAN ÇALIŞMALAR**

### **2.1. Hücre Kültürü**

Kullanılan hücreler, MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücreleri (ATCC, Katalog No. HTB-26), HEPG2 insan karaciğer kanseri hücreleri (ATCC, Katalog No. HB-8065) ve NIH/3T3 embriyonik fare fibroblast (ATCC, Katalog No. CRL-1658) hücreleridir. MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri, sırasıyla RPMI, EMEM ve DMEM besiyerlerinde kültür edildi. Bu medyalar MDA-MB-231 ve HEPG2 hücreleri için %10 fetal sığır serumu (FBS), NIH/3T3 hücreleri içinse %10 bovin keçi serumu (BCS) içermekte olup ayrıca her medyaya %1 penisilin-streptomisin ilave edildi. Tümü steril içerikten oluşturulan medyalar 0,22 µm por genişliğine sahip filtreden geçirilerek yeniden steril edildi. Kültürler, %5 karbondioksit ve 37°C'lik etüvlerde inkübe edildi. Hücreler öncelikle 3-5 günde bir tripsin muamelesi ile pasajlanarak çoğaltıldı. Hücrelerin yıkanması sırasında MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri 590xg'de 5 dakika süresince santrifüj edildi. Bu hücrelerin tüm tez boyunca kullanıldığı pasajlar MDA-MB-231 için 7, HEPG2 için 8 ve NIH/3T3 için 12'dir. Pasajlama, dondurma ve çözme sırasında hücrelerdeki canlılık oranı tripan mavisi yöntemiyle ölçüldü (Ayrıntılar için Bkz. Bölüm 2.4.)

#### **2.1.1. Hücrelerin Dondurularak Stoklanması**

Hücreler %5 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren kültür medyasında dondurularak -196°C'deki sıvı azot tankında saklandı. Deneyler ana stoktaki bu hücrelerin çözülerek kullanılmasıyla yapıldı.

#### **2.1.2. Dondurulan Hücrelerin Çözülmesi**

Hücre çözme protokolü, tanktan alınan tüplerin hızlı bir şekilde 37°C'de ki su banyosunda (tüp kapakları su seviyesinin üstünde kalacak şekilde) 2-3 dakika bekletilmesi ve çözülen hücrelerin besiyerine aktarılması, santrifüj yoluyla DMSO'dan uzaklaştırılması ile gerçekleştirildi.

## 2.2. Arı Zehrinin Sağılması ve Arı Zehri Stoklarının Yapılması

Arı zehri, Türkiye'nin Karadeniz bölgesindeki bal arıları, *Apis mellifera*'dan elde edildi. Arı zehri sağılması/eldesi, arılara zarar vermeden düşük seviyeli elektro-şok yöntemiyle Zonguldak Arıcılar Birliği tarafından gerçekleştirildi. Toplanan arı zehri liyofilize edildi ve kullanıma kadar +4°C'de muhafaza edildi. Liyofilize arı zehri %0.9 NaCl çözeltisi içinde hazırlandı ve ana stok 5000 µg/mL konsantrasyonda alıktlandı ve -20°C'de stoklandı.

## 2.3. Arı Zehri ve Sisplatin Muamelesinden Sonra MTT ile Sitotoksisite Tayini

Tamamlanmış 117Z747 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında Esra BİRİNCİ tarafından arı zehrinin 0, 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL dozlarında sitotoksisite deneyleri MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromür, 5mg/mL) metoduyla yapılmıştır. Belirlenen bu dozlar ve inkübasyon süresi bu tez kapsamında arı zehrinin uygulanması sırasında kullanılmıştır. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında, stok arı zehri 0, 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında hücrelerin üzerine ayrı ayrı ilave edildi. Arı zehri ilavesi sonrasında hücreler 24 saat boyunca, % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Tezin devamı olarak projeye paralel olarak aynı dozlarda sisplatin deneyleri planlanmıştır. Hücreler, 96 gözlü plakalara, göz başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi ve gece boyu inkübe edildi. Hücrelere 0, 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL dozlarında sisplatin (Koçak 10mg/20mL Kat No:19111614) ile muamele edildi ve 24 saat 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. Her bir doz, en az üç deney içi tekrar olarak hazırlandı ve her bir bağımsız deney en az üç kere tekrar edildi. İnkübasyondan sonra, her bir kuyucuğa 10 µL MTT ilave edildi ve 4 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi. Son olarak, her bir kuyucuğa 100 µL reaksiyon durdurma çözeltisi (% 20 SDS + % 37 HCl) ilave edildi ve oda sıcaklığında gece boyu sallayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, renk gelişimi gözlemlendi ve mikropilaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de absorbans ölçüldü. Her hücre hattı için IC<sub>50</sub> değerleri =



$\times \ln( ) +$  formülüne göre hesaplandı. Ek olarak arı zehri ve sisplatin için selektif indeks (SI) sağlıklı hücrelerin  $IC_{50}$  değerinin kanserli hücrelerin  $IC_{50}$  değerine oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Badisa vd., 2009).

#### **2.4. Arı Zehri ve Sisplatinin Uzun Vadedeki Sitotoksik Etkisinin Tripan Mavisi Yöntemi Yoluyla Belirlenmesi**

Tripan mavisi hücre canlılığını belirlemede kullanılan negatif yüklü bir boyadır. Canlı hücrelerde membran yapısı bozulmamış olduğundan boya hücre içine giremezken, ölü hücreler boyayı absorbe eder ve ölü hücreler mikroskop altında mavi görünür.

Sağlıklı ve kanserli hücreler, 24 saat boyunca ayrı ayrı arı zehri veya sisplatin ile muamele edildikten sonra bir kez 1x PBS (fosfat tamponlu salin) (Wisent, 311-010-CL) ile yıkandı. Tripsin ile kaldırılan hücreler 230 rpm'de santrifüjlenerek toplandı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler besiyerinde yeniden süspansiyon edildi. 10  $\mu$ L hücre süspansiyonu, 10  $\mu$ L % 0.4 tripan mavisi (Biological Industries, B 103-102-1B) ile karıştırıldı (1:1 oranında) ve oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika süreyle inkübe edildi. Hücre ve boya karışımı, cihazın lameline her bir kuyucuğa 10  $\mu$ L olacak şekilde yüklendi. Countess FL II otomatik hücre sayacı (Thermofisher) kullanılarak hücre canlılığı tespit edildi. Canlılıkların standart hataları (S.E. +/- standard error of the mean) SPSS yazılımı kullanılarak hesaplandı. Tüm deneyler en az üç bağımsız tekrar olarak yapıldı, ayrıca her bir örnek bir deney tekrarı içinde de en az üç kere ölçülerek cihazın güvenilirliği test edildi. Hücrelerin geri kalanı üç kere 1x PBS ile yıkanarak arı zehri / sisplatinden tamamen arındırıldı ve yıkanmış hücreler arı zehri / sisplatin olmayan taze bir besiyerinde tekrar 24 saat kültürlendi (Bir grup hücre kontrol amacıyla yıkama yapılmadan arı zehri / sisplatin olmayan taze bir besiyerinde kültür edildi). Daha sonra aynı metot bir sonraki 24 ve 48 saat boyunca da uygulandı ve böylece arı zehri/sisplatin ile ilk 24 saat muamele edilen hücrelerin canlılık oranları, arı zehri/sisplatin içermeyen medyalar kullanılarak sonraki 24, 48 ve 72 saat sonunda da belirlendi.

## 2.5. Total DNA İzolasyonu

0, 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında arı zehri muamelesinden sonra hücreler, 5 dakika boyunca 590xg'de santrifüjleme yoluyla toplandı ve 1x PBS ile yıkandı. Total DNA, DNA izolasyon kiti (GeneAll Biotechnology, Katalog No. 06-101, Seul, Güney Kore) kullanılarak kit protokolüne göre izole edildi. Protokol kısaca şu adımları içermektedir: 1) Proteinaz K (20 mg/mL) ve RNaz (10mg/mL) hücrelere eklendi, ardından liziz tampon eklendi. 2) Örnekler, 10 dakika boyunca 56°C'de inkübe edildi. 3) Etanol ilave edildi ve karışımlar kolon tüplerine aktarıldı. 4) Örnekler santrifüjlendi ve yıkandı. 5) Toplam DNA elüsyon tamponu ile çözüldü. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları Nanodrop spektrofotometre (ThermoFisher) ile ölçüldü ve örnekler -20°C'de saklandı. Total DNA örnekleri, çekirdek ve organel (mitokondriyal DNA dahil) olmak üzere hücresel DNA'dan oluşur.

## 2.6. QPCR Yöntemi ile Mitokondriyal DNA Kopya Sayısının Tespiti

Mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısı varyasyonu (copy number variation, (CNV) tayini için QPCR analizi yapıldı. *MTCO1* (mtDNA geni) ve *HBB* (çekirdek DNA geni) için iki farklı primer seti kullanıldı. MDA-MB-231 ve HEPG2 hücre hatları için *MTCO1* ve *HBB* insan primerleri, NIH/3T3 hücreleri için *Mtco1* ve *Hbb* fare primerleri kullanıldı. Kullanılan primerler Tablo 1'de verildi. *MTCO1* geni hücrede çok sayıda kopya olarak bulunurken *HBB* geni tek kopya genidir. Dolayısıyla *MTCO1* geninin kopya sayısı, tek kopya olan *HBB* geni ile karşılaştırılarak göre analiz edilir. Yani *HBB* geni, internal kontroldür. QPCR karışımı (ROX referans boya ile 1 x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus), Solis BioDyne firmasından (Kat. 08-14-00001, Tartu, Estonya) satın alındı. Bu karışım, dNTP, MgCl<sub>2</sub> ve polimeraz enzimi içermektedir. Her bir QPCR reaksiyonu; 4 ng total DNA örneği, toplamda sırasıyla 0,8 µL forward primer ve 0,8 µL reverse primer, 4 µL QPCR karışımı ve su ile 20 µL'ye tamamlanarak hazırlandı (Tablo 1). Reaksiyonlar, BioRad CFX96 cihazı ile 96 gözlü plakalarda ve her örnekten 3'er kuyucuk olacak şekilde gerçekleştirildi. Kontrol reaksiyonlarında DNA kullanılmamıştır (NTC, non-template control). QPCR koşulları, 1) 95°C'de 95 saniye süreyle ilk aktivasyon için 1 döngü, 2) 95°C'de 15 saniye süreyle denatürasyon, 3) 15 saniye boyunca 56°C'de primer bağlanması

ve 4) 72°C'de 15 saniye süreyle yeni zincir DNA'sının uzaması ve 5) 72°C'de 10 dakika olarak ayarlandı (2, 3 ve 4. basamaklar 40 döngü olarak yapıldı). Bağlı mtDNA kopya sayıları  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplandı. ( $\Delta Ct = Ct_{MTCO1} - Ct_{Hbb}$  ve  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tiçeren(BV)}} - \Delta Ct_{\text{tiçermeyen(BV)}}$ ) ( $Ct$ , eşik döngü değeri). Deneyler bağımsız üç tekrar halinde yapıldı. Her deney içinde iki tekrar yapıldı.

Tablo 1. QPCR Kit İçeriği

İçerikler	Hacim	Final konsantrasyonu
5x HOT FIREPol Probe qPCR mix plus	4µL	1x
Primer forward (10pmol/µL)	0,4 µL	200 nM
Primer reverse (10pmol/µL)	0,4 µL	200 nM
Kalıp DNA	Değişken	Değişken
dH <sub>2</sub> O	20 µL ye tamamlanır.	
Toplam	20 µL	

Tablo 2. Mitokondriyal DNA Kopya sayısı için QPCR'da kullanılan Primerler

Organizma (Hücre hattı)	Gen	Primerler (5' → 3')
<b>İnsan</b> (MDA-MB-231 ve HEPG2)	<i>HBB</i>	Forward - CTC ACC TGG ACA ACC TCA AG Reverse - CAAGCGTCCCATAGACTCAC
	<i>MTCO1</i>	Forward - CCCTGCCATAACCCAATACC Reverse - CAGCTAGGACTGGGAGAGATAG
<b>Fare</b> (NIH/3T3)	<i>Hbb</i>	Forward - CAGTCCTTCTCTCTCCTCTC Reverse - CCTTGTCTCTGAGCAAGTTAC
	<i>Mtco1</i>	Forward - CCACCATCATTTCTCCTTCTCC Reverse - CTCCTGCATGGGCTAGATTC

## 2.7. Agoroz Jel Elektrofrez

QPCR ürünleri agaroz jel elektrofrez kullanılarak doğrulandı. %1'lik agaroz jel hazırlamak için, 0,5 gram agaroz tartılıp üzerine 50 mL 1x TAE eklendi. Karışım mikrodalga fırında kaynayana kadar (yaklaşık 1,5 dk) ısıtıldı. Oda sıcaklığında 20 dakika bekledikten sonra üzerine 5 µL etidyum bromür eklendi ve karışım elektrofrez tankına döküldü. Örnekler üzerine 1:6 oranında yükleme boyası (6x) eklenerek, taraklarla oluşturulan kuyucuklara yüklendi. Jel 112 voltta yaklaşık 15 dakika yürütüldü ve UV transimülatör ile görüntülendi. Kullanılan markırlar şunlardır; 1) MDA-MB-231 hücreleri için Thermo Scientific (Kat No. SM0311), 2) HEPG2 hücreleri için New England Biolabs

(Kat No. N3231S, MA, ABD) ve 3) NIH/3T3 hücreleri için New England Biolabs (Kat No. N3200S).

## 2.8. DNA Fragmentasyonu

DNA fragmentasyon deneyi, DNA hasarı sonucu DNA'nın fragmente olup olmadığını anlamak için yapıldı. Fragmente olan DNA jelde tek değil de merdiven şeklinde bantlar şeklinde gözlenmektedir (Elmore, 2007). Bu deney arı zehrinin DNA'da kırıklara sebep olup olmadığını tayin etmek için kullanıldı. Total DNA'ların 2 µg konsantrasyonu %0,8' lik agaroz jel elektroforezinde 30V'da 3 saat yürütüldü ve UV transimülatör ile görüntülendi. Kullanılan DNA markırları; 1) MDA-MB-231 hücreleri için Thermo Scientific (Kat No. SM0311), 2) HEPG2 hücreleri için New England Biolabs (Kat No. N3231S, MA, ABD) ve 3) NIH/3T3 hücreleri için New England Biolabs (Kat No. N3200S).

## 2.9. DNA Boyaması (Hoechst), DNA Hasarı ( $\gamma$ -H2AX) ve Hücre İskelet Proteininin ( $\beta$ -aktin) İmmünboyama ile Tespiti

İmmünboyama bir hücre antijenini floresan etiketli antikorla arama tekniğidir. İmmünboyama genel olarak örneğin fikse edilmesi, permabilize edilerek geçirgen hale getirilmesi, antijene özel spesifik primer antikor muamelesinin ardından floresan etiket taşıyan ikincil antikorlarla muamele edilmesi, mikroskop fotoğraflarının çekilmesi, fotoğrafların ilgili yazılımlarla analiz edilmesi ve ölçümlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması aşamalarından oluşur. Bu deneyde ilk olarak MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri 96 well plate ekilip çoğaltıldı. Daha sonra 0, 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda arı zehri ile 24 saat muamele edildikten sonra hücre hatlarının her biri özel olarak içinde büyüdüğü RPMI (MDA-MB-231), EMEM (HEPG2) VE DMEM (NIH/3T3) medialarıyla yıkandı. Sonrasında hücreler %4 (w/v) paraformadehit (PFA) (ChemSolute 135 Bio, Kat No. 8416. 0500, Germany) ile oda sıcaklığında yarım saat fikse edildi. Hücreleri geçirgen hala getirmek için %0,5 Triton-100 (Biomatik, Kat No. A4025,

ON, Canada) içeren 1x PBS ile 15 dakika boyunca oda sıcaklığında muamele edildi (sadece 0, 12, 25, ve 50 µg/mL dozlarını içeren koyucuklara). Devamında hücreler %20 (v/v) keçi serumu (Capricorn, Kat No. GOA-1B), 200 mg/mL BSA (Sigma, Kat. No. A1470) ve %0,01 (v/v) Tween-20 (Sigma, Kat No. P1379) içeren 1x PBS ile 2 saat 37°C de bloke edildi. Sonrasında hücreler 20 mg/mL BSA ve %0,05 triton-100 (v/v) içeren 1x PBS içinde hazırlanan fare poliklonal primer antikoru  $\gamma$ -H2AX (1:200) (Aviva systems biology, Kat. No. OAAN02886) ile her kuyucuğa 60 µL olacak şekilde bir gece 4°C de muamele edildi. Kontrol grubu hücreleri sadece sekonder antikorlar muamele edilmiştir. İnkübasyondan sonra primer antikor 1x PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkamadan sonra kontrol grubunun dışında ki primer antikor  $\gamma$ -H2AX ile muamele edilen dozlara (0, 12, 25, ve 50 µg/mL) seconder Goat Anti-Mouse IgG H&L (Texas Red ®) (ab6787) antikor ve 20 mg/mL BSA ve 0,05% triton-100 (w/v) içeren 1x PBS ile 1:1000 konsantrasyonunda hazırlandıktan sonra muamele edildi. Boyama için 4°C de gece boyu bekletildi. Boyamadan sonra 3 kez 1x PBS ile yıkandı. Devamında hücreler 20 mg/mL BSA ve 0,05% triton-100 (w/v) içeren 1x PBS içinde hazırlanan fare monoklonal primer antikoru anti- $\beta$ -aktin (1:250) (BioLegend, Kat. No. 643801) ve ile her kuyucuğa 60 µL olacak şekilde muamele edildi. İnkübasyon karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 1 saat olarak yapıldı ve akabinde hücreler 1x PBS ile 3 kez yıkandı. Anti- $\beta$ -aktin muamelesinden sonra 20 mg/mL BSA ve %0.05 triton-100 (v/v) içeren 1x PBS içinde hazırlanan sekonder antikor (1:1000) Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150113) ve ile 1 saat karanlık ortamda ve oda sıcaklığında muamele edildi. Daha sonra hücreler 3 kez 1x PBS ile yıkandı. En son aşama olarak da DNA'yı işaretleyebilmek için 1x PBS içinde hazırlanan 4 µg/mL bis Benzimide Hoechst 33342 (Sigma, Kat No. 14533) her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde muamele edildi. Son olarak her kuyucuk mikroskop altında incelendi ve farklı alanlardan olmak üzere her örnek başına en az beş alanın resimleri çekildi. Çekilen fotoğraflarda, ilgili markerlar için boyama miktarları ImageJ yazılımı ile analiz edilerek istatistiksel karşılaştırmalar yapıldı.

## 2.10. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS yazılımı ile yapıldı (Versiyon 23). Hücre canlılıkları UNIANOVA (tek değişkenli varyans analizi) kullanılarak karşılaştırıldı. İkili karşılaştırmalar için UNIANOVA'nın Post-Hoc testi yapıldı. Karşılaştırmalarda anlamlılık değerleri;  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) ve  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*) olarak kullanıldı.

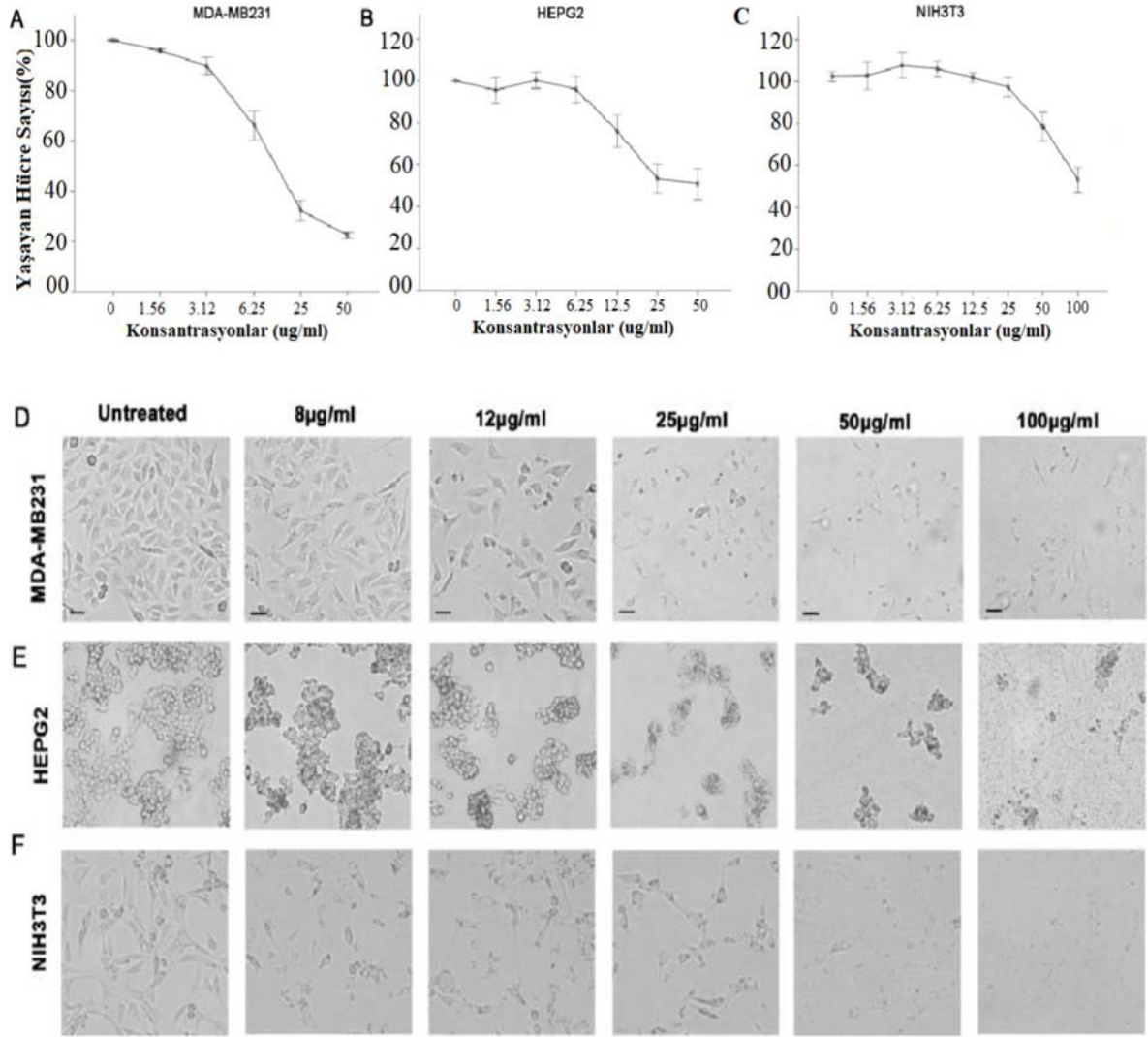


### **3. BULGULAR**

#### **3.1. Arı Zehrinin Uzun Vadedeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi**

##### **3.1.1. Arı Zehrinin Sitotoksik Dozlarının MTT ile Belirlenmesi**

Arı zehrinin MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerindeki sitotoksik etkisi Bölüm 2.3.'de belirtildiği gibi MTT testi ile değerlendirildi. MDA-MB-231 (Şekil 4A), HEPG2 (Şekil 4B) ve NIH/3T3 hücrelerinde (Şekil 4C) sırasıyla arı zehri muamelesinden sonra doza bağlı olarak hücre canlılığında önemli bir düşüş gözlemlendi. IC<sub>50</sub> dozları, MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri için sırasıyla 8 µg/mL, 12 µg/mL ve 50 µg/mL olarak hesaplandı. Bu sonuçlar, NIH/3T3 'ün diğer kanser hücrelerine kıyasla arı zehri muamelesine karşı dirençli olduğunu göstermektedir. Arı zehrinin kanser hücrelerini normal hücrelere göre daha fazla öldürdüğü bulgusu, selektif indeks (SI) (SI = IC<sub>50</sub> normal hücre / IC<sub>50</sub> kanser hücresi) adı verilen bir parametre ile değerlendirildi. SI ne kadar büyük ise test edilen ajanın kanser için seçiciliği o kadar yüksektir (Badisa vd., 2009). Buna göre, MDA-MB-231 hücrelerinin arı zehri için SI değeri 6,25 (NIH/3T3 IC<sub>50</sub> = 50 / MDA IC<sub>50</sub> = 8) ve HEPG2 hücreleri için SI değeri ise 4,16 (NIH/3T3 IC<sub>50</sub> = 50 / HEPG2 IC<sub>50</sub> = 12) dir. Her ikisi de arı zehrinin kanser hücrelerinde seçici bir sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca her bir dozun MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri için aydınlık alan mikroskop görüntüleri, sırasıyla Şekil 4D, E ve F'de gösterilmiştir. Morfolojik olarak kanser hücrelerinin küçüldüğü ancak normal fibroblastları etkilemediği gözlemlenmiştir. Fakat sağlıklı hücrelerde hücre yoğunluğunun özellikle daha yüksek BV dozlarında değiştiği gözlemlenmiştir.

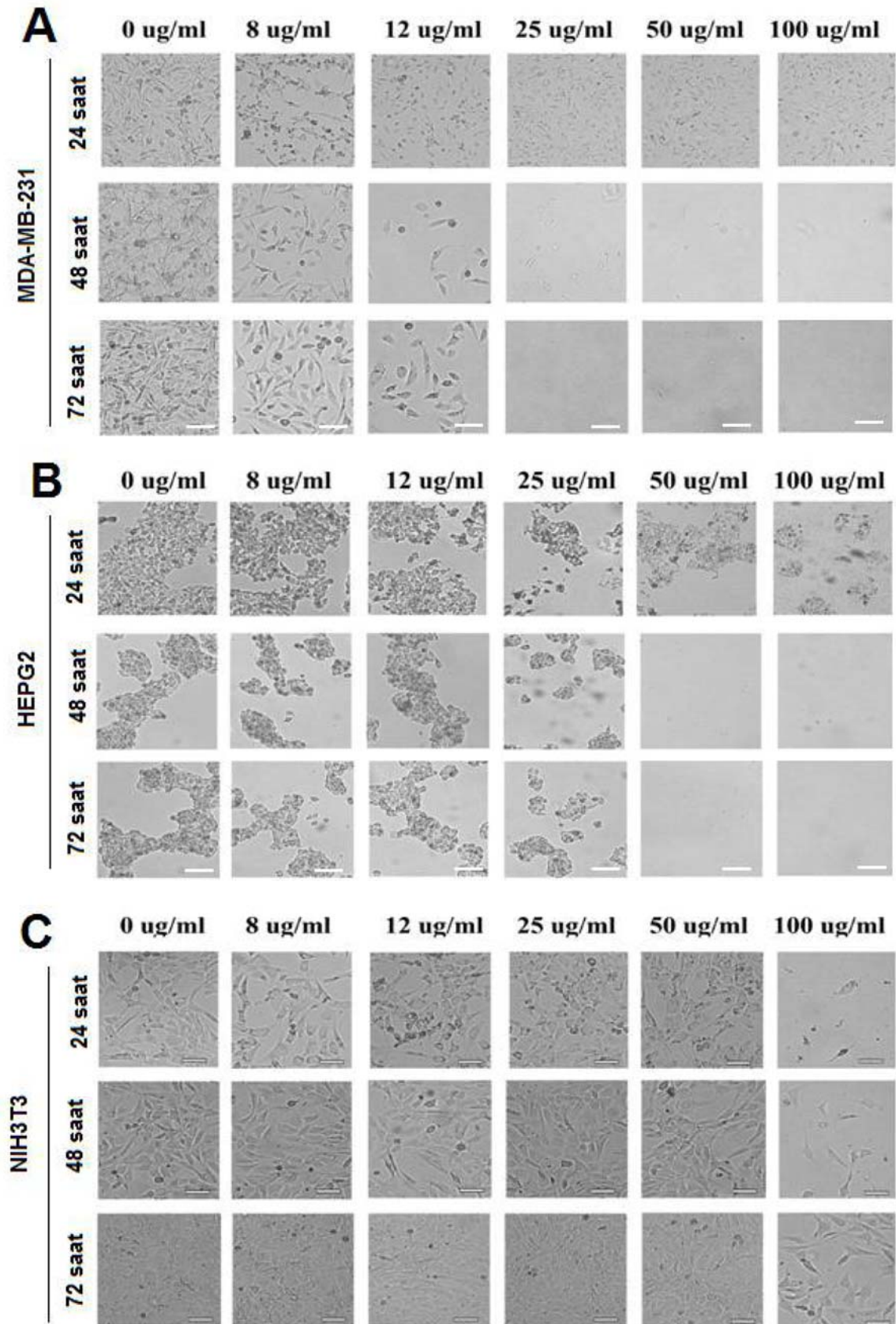


Şekil 4. Arı zehrinin kanser hücreleri ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi. A, B ve C arı zehrinden sonra sırasıyla MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinde MTT testi ile belirlenen hücre canlılıklarını (%) göstermektedir. MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 8 µg/mL, 12 µg/mL ve 50 µg/mL'dir. Arı zehri seçici olarak kanser hücrelerini öldürmüştür. D, E ve F arı zehrinden sonra sırasıyla MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinin aydınlık alan mikroskop görüntülerini göstermektedir. Yüksek dozlarda arı zehri hücre boyutlarında küçülmeye ve hücre yoğunluğunda azalmaya sebep olmuştur. Ölçek 80 mikrondur.

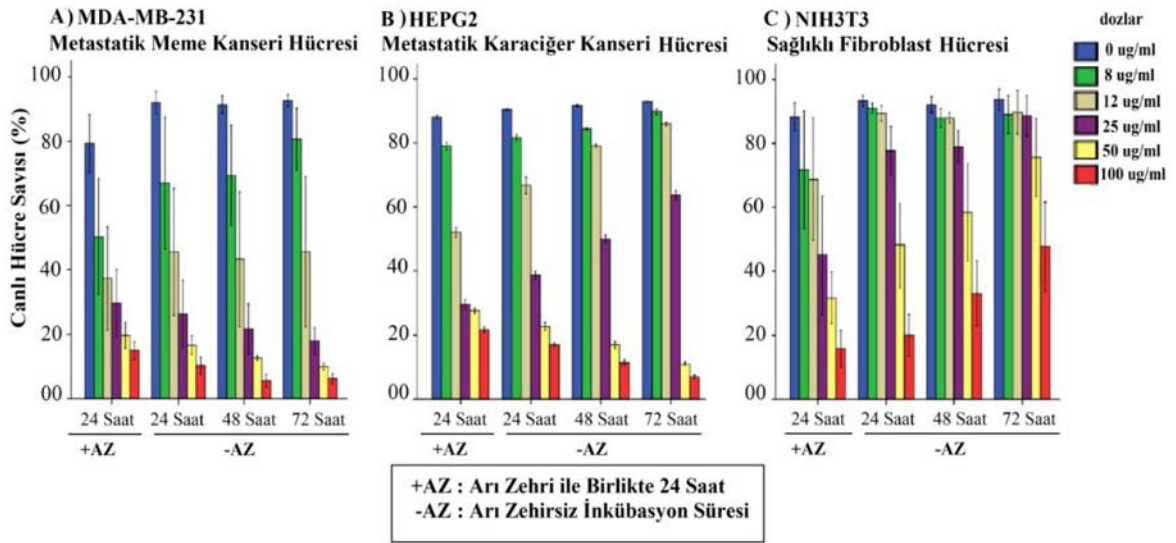


### 3.1.2. Arı Zehrinin Farklı Dozlarının Normal ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Uzun Vadeli Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Arı zehrinin 0, 8, 12, 25, 50 ve 100 µg/mL dozlarının sırasıyla MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerine 24 saat boyunca muamele edilmesinden sonra hücrelerin canlılık oranı tripan mavisi boyası ile tespit edilmiştir. Daha sonra arı zehri yıkanmış ve hücreler her 24 saatte bir olmak üzere arı zehirsiz temiz bir besiyerinde kültür edilerek 24, 48 ve 72 saatler sonunda hücre canlılığı tespit edilmiştir (Bkz Bölüm 2.4). Arı zehirsiz ortamda 24, 48 ve 72 saat sonra MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinin mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 5A-C'de verilmektedir. Ayrıca canlı hücre sayılarının (%) karşılaştırmalı grafikleri Şekil 6A, B ve C'de gösterilmiştir. İstatistiksel analizler ise MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 için sırasıyla Tablo 3-5'te verilmiştir (Anlamli olan düşüşler kırmızı ile, anlamli olan yüksek değerler ise yeşil ile yazılmıştır). Buna göre, MDA-MB-231 hücrelerine 25 µg/mL ve daha yüksek dozlarda 24 saat arı zehri uygulanıp, yıkandıktan sonraki 24, 48 ve 72. saatlerin hepsinde hücre canlılık oranı anlamli olarak düşmeye başlamıştır (Tablo 3). HEPG2'de ise anlamli düşüşün gözlemlendiği doz 50 µg/mL ve 100 µg/mL iken (Tablo 4), NIH/3T3 hücrelerinde tüm doz ve sürelerde anlamli olarak canlılık oranında artışlar olmuştur (Tablo 5).



Şekil 5. Normal ve kanser hücrelerinin arı zehrinin farklı dozları ile muamele edilip uzaklaştırıldıktan 24, 48 ve 72 saat sonraki hücre yoğunluğu. A, B ve C; 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri üzerindeki hücre yoğunluğu ve morfolojik etkisini göstermektedir. Sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinin kontrol ve dozlarının tamamında hücre yoğunluğu artarken kanser hücrelerinin (MDA-MB-231 ve HEPG2) özellikle 25, 50 ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarında hücrelerin küçüldüğü ve yoğunluğun azaldığı görülmüştür. Ölçek çubuğu 40 mikrondur.



Şekil 6. Arı zehrinin hücrelerden uzaklaştırıldıktan 24, 48 ve 72. saatlerde hücre ölümünün devam edip etmediğinin tripan mavisi yöntemi yoluyla belirlenmesi.

(A) MDA-MB-231 hücrelerinin 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarında canlı hücre yüzdesi artarken 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarında yaşayan hücre sayısı azalmıştır. (B) HEPG2 hücrelerinin 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarında canlı hücre yüzdesi artarken 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarında yaşayan hücre sayısı (%) olarak azalmıştır. (C) 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarında NIH/3T3 canlı hücrelerin yüzdesi artmıştır.

Tablo 3. MDA-MB-231 hücrelerinde arı zehrinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi

İnkübasyon (saat) karşılaştırması(+AZ, Arı zehri ile inkübasyon)(-AZ, Arı zehri yıkandıktan sonra inkübasyon)		Arı zehri dozlarında anlamlılık dereceleri (µg/mL)					
		0	8	12	25	50	100
24 (+AZ)	24 (-AZ)	0,230	0,070	<b>0,001</b> ↑	<b>0,002</b> ↓	<b>0,027</b> ↓	<b>0,013</b> ↓
	48 (-AZ)	<b>0,047</b> ↑	<b>0,039</b> ↑	<b>0,000</b> ↑	<b>0,001</b> ↓	<b>0,003</b> ↓	<b>0,001</b> ↓
	72 (-AZ)	<b>0,008</b> ↑	<b>0,017</b> ↑	<b>0,000</b> ↑	<b>0,000</b> ↓	<b>0,001</b> ↓	<b>0,000</b> ↓
24 (-AZ)	48 (-AZ)	0,230	0,591	<b>0,044</b> ↑	0,099	<b>0,034</b> ↓	<b>0,004</b> ↓
	72 (-AZ)	<b>0,024</b> ↑	0,204	<b>0,014</b> ↑	<b>0,020</b> ↓	<b>0,009</b> ↓	<b>0,001</b> ↓
48 (-AZ)	72 (-AZ)	0,101	0,404	0,274	0,184	0,190	<b>0,020</b> ↓

Tablo 4. HEPG2 hücrelerinde arı zehrinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi

İnkübasyon (saat) karşılaştırması (+AZ, Arı zehri ile inkübasyon) (-AZ, Arı zehri yıkandıktan sonra inkübasyon)		Arı zehri dozlarında anlamlılık dereceleri (µg/mL)					
		0	8	12	25	50	100
24 (+AZ)	24 (-AZ)	<b>0,001</b> ↑	<b>0,002</b> ↑	<b>0,002</b> ↑	0,540	0,070	<b>0,031</b> ↓
	48 (-AZ)	<b>0,001</b> ↑	<b>0,001</b> ↑	<b>0,000</b> ↑	0,075	<b>0,003</b> ↓	<b>0,002</b> ↓
	72 (-AZ)	<b>0,000</b> ↑	<b>0,000</b> ↑	<b>0,000</b> ↑	<b>0,029</b> ↑	<b>0,001</b> ↓	<b>0,001</b> ↓
24 (-AZ)	48 (-AZ)	0,304	0,084	<b>0,018</b> ↑	0,161	<b>0,015</b> ↓	<b>0,015</b> ↓
	72 (-AZ)	0,057	<b>0,020</b> ↑	<b>0,004</b> ↑	0,055	<b>0,003</b> ↓	<b>0,005</b> ↓
48 (-AZ)	72 (-AZ)	0,214	0,212	0,095	0,393	0,070	0,178

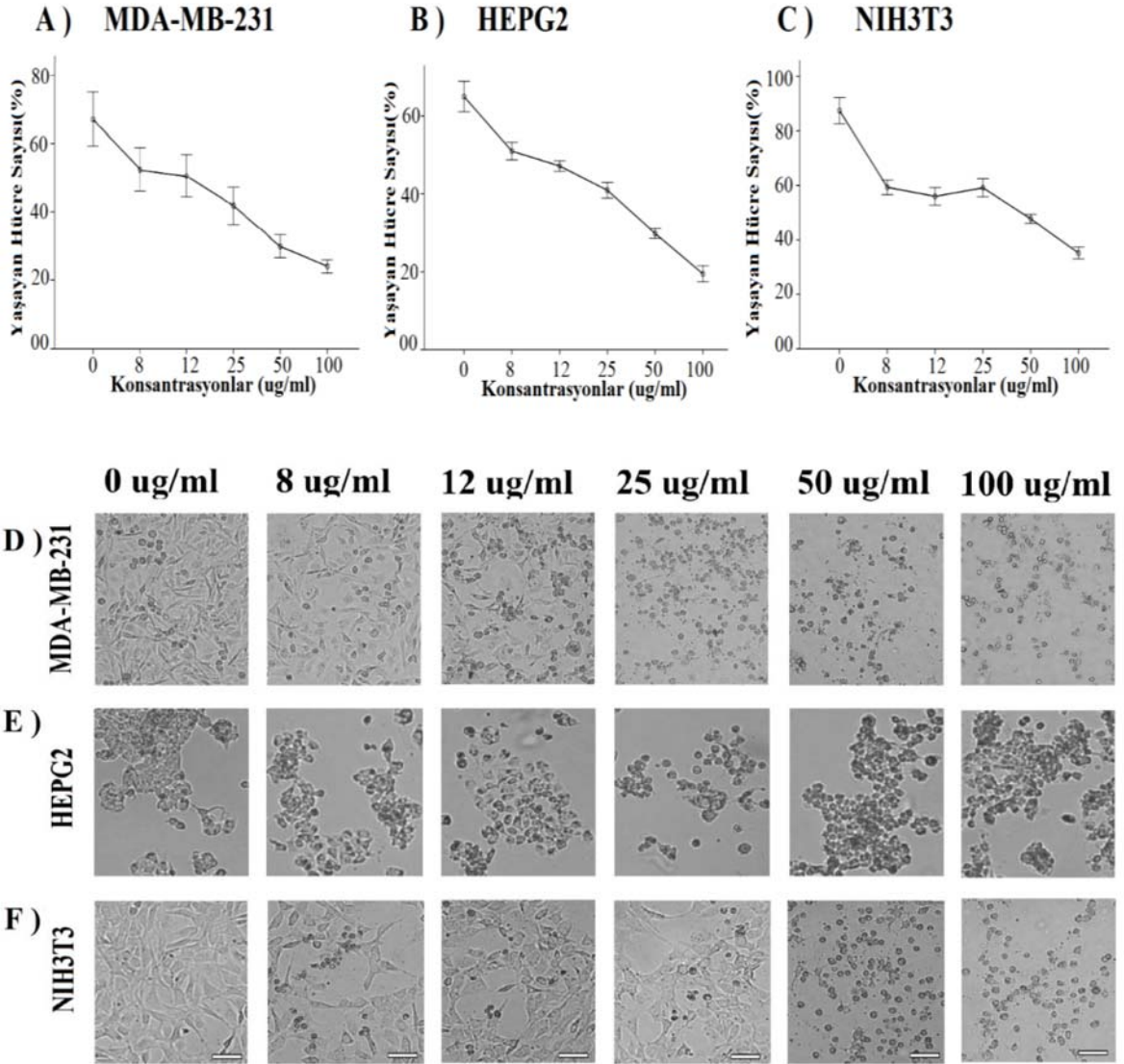
Tablo 5. NIH/3T3 hücrelerinde arı zehrinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi

İnkübasyon (saat) karşılaştırması (+AZ, Arı zehri ile inkübasyon) (-AZ, Arı zehri yıkandıktan sonra inkübasyon)		Arı zehri dozlarında anlamlılık dereceleri (µg/mL)					
		0	8	12	25	50	100
24 (+AZ)	24 (-AZ)	<b>0,007</b> ↑	<b>0,039</b> ↑	0,181	0,193	<b>0,016</b> ↑	<b>0,003</b> ↑
	48 (-AZ)	<b>0,002</b> ↑	<b>0,002</b> ↑	<b>0,010</b> ↑	<b>0,018</b> ↑	<b>0,000</b> ↑	<b>0,001</b> ↑
	72 (-AZ)	<b>0,000</b> ↑	<b>0,001</b> ↑	<b>0,005</b> ↑	<b>0,008</b> ↑	<b>0,000</b> ↑	<b>0,000</b> ↑
24 (-AZ)	48 (-AZ)	0,071	<b>0,016</b> ↑	<b>0,039</b> ↑	0,080	<b>0,001</b> ↑	<b>0,024</b> ↑
	72 (-AZ)	<b>0,005</b> ↑	<b>0,005</b> ↑	<b>0,018</b> ↑	<b>0,029</b> ↑	<b>0,000</b> ↑	<b>0,002</b> ↑
48 (-AZ)	72 (-AZ)	<b>0,030</b> ↑	0,197	0,441	0,373	<b>0,004</b> ↑	<b>0,015</b> ↑

## **3.2. Sisplatinin Uzun Vadedeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi**

### **3.2.1. Sisplatinin Sitotoksik Dozlarının MTT ile Belirlenmesi**

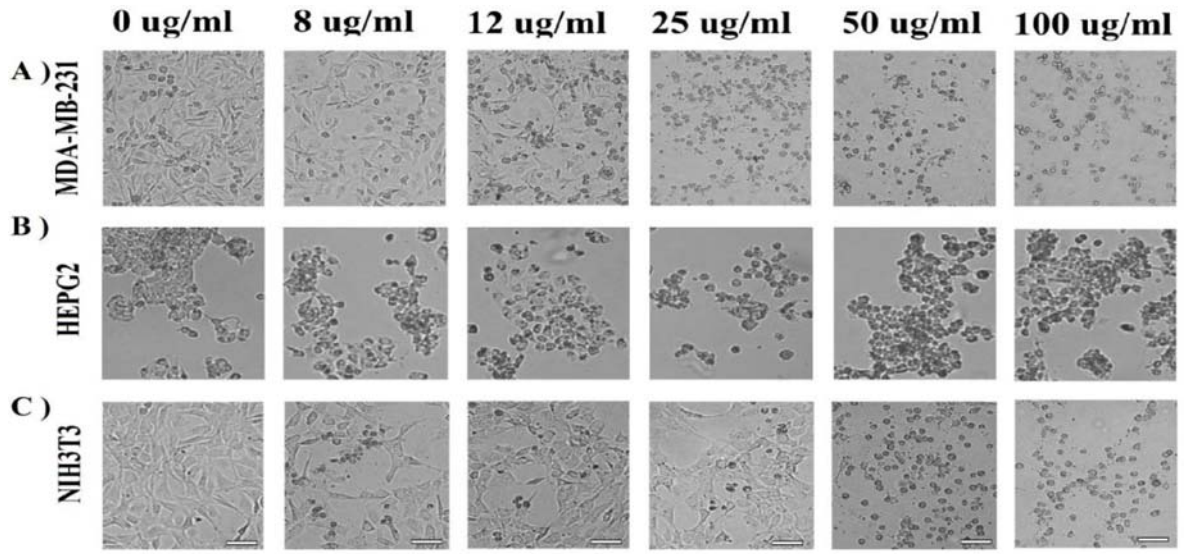
Arı zehrinin sitotoksikite deneylerine kontrol olarak bu tez kapsamında sisplatinin sitotoksikitesi malzemeler ve yöntemler bölümünde tarif edildiği gibi MTT testi ile değerlendirilmiştir. MDA-MB-231 (Şekil 7A), HEPG2 (Şekil 7B) ve NIH/3T3 hücrelerinde (Şekil 7C) 8 µg/mL, 12 µg/mL ve 25 µg/mL sisplatinden sonra hücre canlılığında önemli bir düşüş gözlemlendi. IC<sub>50</sub> dozları, MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri için sırasıyla 12 µg/mL, 8 µg/mL ve 8 µg/mL olarak hesaplandı. Bu sonuçlar, sisplatinin kanser hücrelerinde olduğu gibi sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinde de sitotoksikiteye sebep olduğunu göstermektedir. Sisplatinin seçici sitotoksik etkisi yine selektif indeks (SI) ile değerlendirildi. Buna göre, MDA-MB-231 ve HEPG2 için SI sırasıyla 1,61 ve 0,57'dir. Her ikisi de sisplatinin kanser hücrelerinde seçici bir sitotoksik potansiyele sahip olmadığını göstermektedir. Arı zehri sağlıklı hücreleri kanserli hücelere göre daha az bir seviyede öldürürken kemoterapi ajanı sisplatin hem kanserli hem de sağlıklı hücreleri öldürmüştür. Bu sonuçlar arı zehrinin kanser hücrelerine karşı seçici olduğunu ancak sisplatinin bu seçiciliğe sahip olmadığını göstermektedir. Her dozun aydınlık alan mikroskopi görüntüleri, sırasıyla MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 için Şekil 7D, E ve F'de gösterilmiştir. Sisplatinin bütün dozlarından sonra sağlıklı hücrelerde dahil olmak üzere tüm hücrelerde hücre yoğunluğunun azaldığı ve hücre boyutunun küçüldüğü gözlemlenmiştir.



Şekil 7. Sisplatinin kanser hücreleri ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi. A, B ve C sırasıyla sisplatinin MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinde MTT testi ile belirlenen hücre canlılıklarını (%) göstermektedir. D, E ve F sırasıyla sisplatinin MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinin aydınlık alan mikroskop görüntülerini göstermektedir. MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri için  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Sisplatin kanser hücrelerini seçici olarak değil tüm hücreleri (hem kanserli hem de sağlıklı) öldürmüştür. Ölçek çubuğu 40 mikrometredir.

### 3.2.2. Sisplatinin Farklı Dozlarının Normal ve Kanserli Hücreler Üzerindeki Morfolojik Etkisinin Belirlenmesi

Sisplatinin 0, 8, 12, 25, 50 ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarının sırasıyla MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerine muamele edilmesinden 24 saat sonra, her dozun ışık mikroskobu altındaki görüntüsü belirlendi. Sisplatin'in özellikle yüksek dozlarında hücre morfolojisini değiştirdiği Şekil 8A, B ve C'de gösterilmektedir.



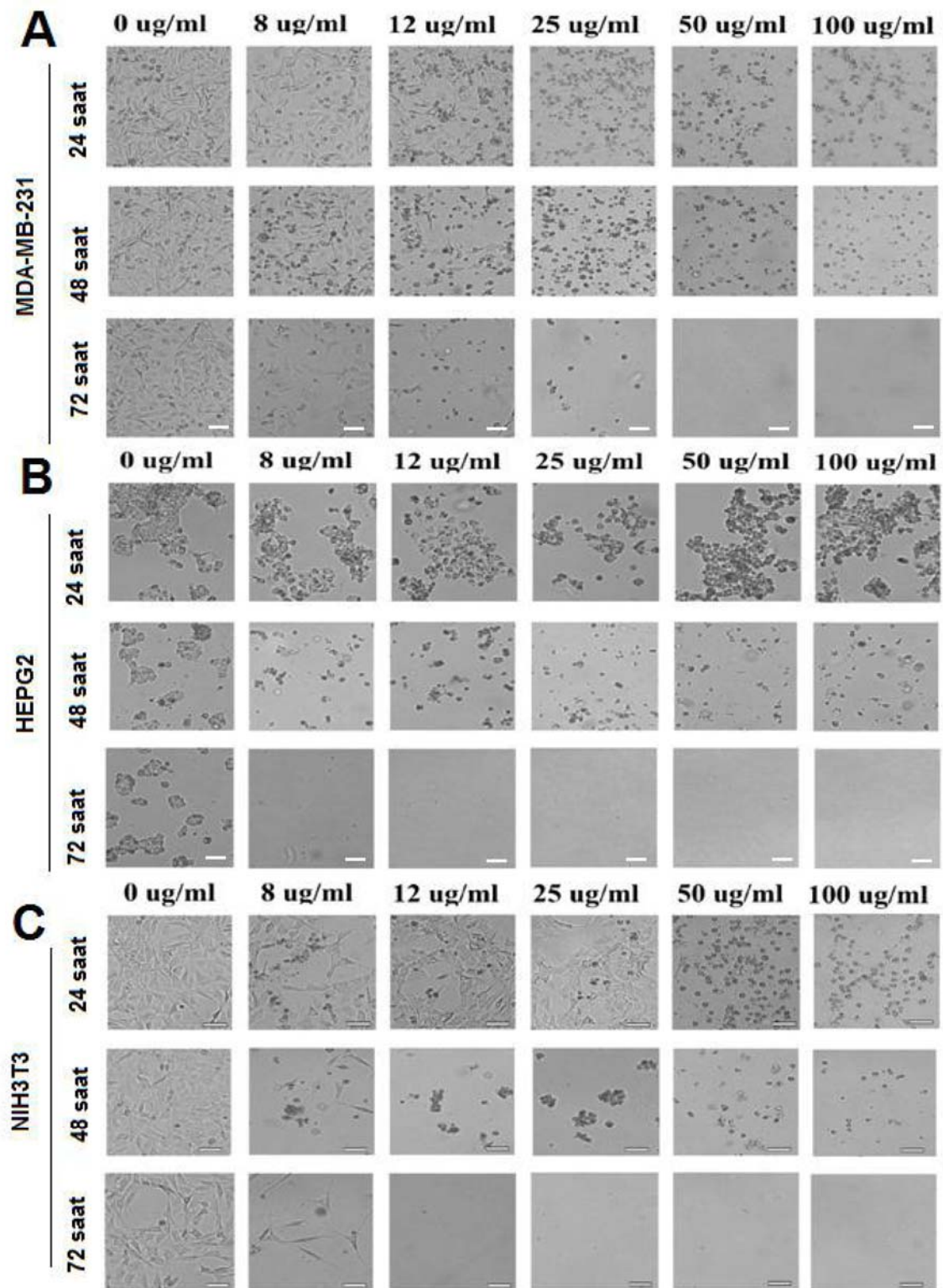
Şekil 8. Normal ve kanser hücrelerine sisplatinin farklı dozları ile muamele edilip uzaklaştırıldıktan 24, 48 ve 72 saat sonra hücre yoğunluğu. A, B ve C ışık mikroskobu altında sisplatin'in farklı dozlarının MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücreleri üzerindeki morfolojik etkisi kontrole (untreated) göre gösterilmektedir. Sisplatin muamelesinden sonra bütün dozlarda hücre yoğunluğu azalırken arı zehrinde sadece MBA-MB-231 ve HEPG2 hücrelerinin yüksek dozlarında (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de) hücre yoğunluğu azalmıştır. Ölçek çubuğu 40 mikrondur.

### 3.2.3. Sisplatinin Farklı Dozlarının Normal ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Uzun Vadeli Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

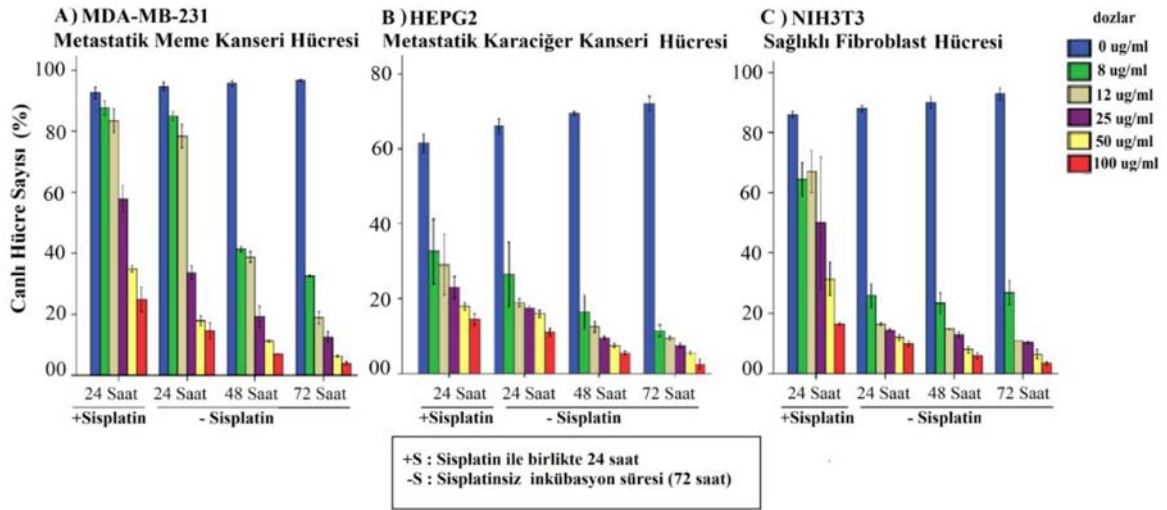
Sisplatinin 0, 8, 12, 25, 50 ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarının sırasıyla MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerine muamele edilmesinden 24 saat sonra, sisplatin hücrelerden uzaklaştırılmıştır. Arı zehrindeki uygulamanın aynısı olacak şekilde (Bkz. Bölüm 3.1.2) hücreler normal (sisplatin içermeyen) besiyeri içerisinde büyütülerek 24, 48 ve 72. saatlerde hücre canlılıkları tespit edilmiştir. MDA-MB231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri sırasıyla Şekil 9A, B ve C panellerinde

gösterilmiştir. Hücre yoğunluğu ve morfolojisi daha düşük dozlardan itibaren değişmiştir. Ayrıca canlı hücre sayılarının (%) grafikleri Şekil 10A, B ve C’de gösterilmiştir. İstatistiksel analizler ise MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 için sırasıyla Tablo 6, 7 ve 8’te verilmiştir (Arı zehri ile benzer şekilde, anlamlı olan düşüşler kırmızı ile anlamlı olan yüksek değerler ise yeşil ile yazılmıştır). Buna göre, tüm hücrelerde en düşük dozdan başlamak üzere yüksek dozların da hepsinde (8-100 µg/mL) hücre canlılık oranları anlamlı olarak düşmeye devam etmiştir (Şekil 10 ve Tablo 6-8). Her ne kadar kanser hücrelerinde canlılık oranının düşmesi pozitif bir bulgu olarak ortaya çıksa da, sağlıklı hücrelerde de aynı şekilde canlılık oranının anlamlı olarak düşmesi kanserin seçici tedavisi için hedeflenen bir bulgu değildir. Bu durumda arı zehrinin sağlıklı hücrelere daha az etki ettiği aşikâr olup, sisplatin ile karşılaştırıldığında arı zehrinin daha avantajlı bir ajan olduğu düşünülebilir.





Şekil 9. Normal ve kanser hücrelerine sislptinin farklı dozları ile muamele edilip uzaklaştırıldıktan 24, 48 ve 72 saat sonra hücre yoğunluğu. A, B ve C ışık mikroskobu altında, sislptinin farklı dozlarının verilip uzaklaştırıldıktan sonraki 24, 48 ve 72. saatte MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinin üzerindeki hücre yoğunluğu ve morfolojisine etkisini göstermektedir. MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinin tüm dozlarında hücre yoğunluğu kontrole göre azalmıştır. Sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinin düşük dozlarındaki (8, 12 ve 25,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) hücre yoğunluğu azalmıştır. Ölçek çubuğu 40 mikrondur.



Şekil 10. Sislptinin hücrelerden uzaklaştırıldıktan 24, 48 ve 72 saat sonra hücre ölümünün devam edip etmediğinin tripan mavisi yöntemi yoluyla belirlenmesi. A: MDA-MB-231 hücrelerinin dozlarındaki artışla ters orantılı olarak hücre canlılık yüzdesi azalmıştır. Özellikle 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarında yaşayan hücre sayısı azalmıştır. B: HEPG2 hücrelerinin tüm dozlarında hücre canlılık yüzdesi diğer iki hücre hattına göre daha fazla azalmıştır. C: NIH/3T3 hücreleri sağlıklı hücre hattı olmasına rağmen Sislptin'in 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarında devamlı olarak canlı hücrelerin yüzdesi azalmıştır.

Tablo 6. MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi

İnkübasyon (saat) karşılaştırması (+CIS, sisplatin ile inkübasyon) (-CIS, sisplatin yıkandıktan sonra inkübasyon)		Sisplatin dozlarında anlamlılık dereceleri					
		0 µg/mL	8 µg/mL	12 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
24 (+CIS)	24 (-CIS)	0,286	0,236	0,281	<b>0,001 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,017 ↓</b>
	48 (-CIS)	0,124	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,001 ↓</b>
	72 (-CIS)	0,051	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>
24 (-CIS)	48 (-CIS)	0,583	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,012 ↓</b>	<b>0,001 ↓</b>	0,055
	72 (-CIS)	0,286	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,002 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,014 ↓</b>
48 (-CIS)	72 (-CIS)	0,583	<b>0,003 ↓</b>	<b>0,002 ↓</b>	0,173	<b>0,006 ↓</b>	0,406

Tablo 7. HEPG2 hücrelerinde sisplatinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi

İnkübasyon (saat) karşılaştırması (+CIS, sisplatin ile inkübasyon) (-CIS, sisplatin yıkandıktan sonra inkübasyon)		Sisplatin dozlarında anlamlılık dereceleri					
		0 µg/mL	8 µg/mL	12 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
24 (+CIS)	24 (-CIS)	0,170	0,547	0,160	0,067	0,148	0,108
	48 (-CIS)	<b>0,041</b> ↑	0,155	<b>0,047 ↓</b>	<b>0,004 ↓</b>	<b>0,001 ↓</b>	<b>0,006 ↓</b>
	72 (-CIS)	<b>0,018</b> ↑	0,083	<b>0,028 ↓</b>	<b>0,002 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	<b>0,002 ↓</b>
24 (-CIS)	48 (-CIS)	0,263	0,335	0,326	<b>0,022 ↓</b>	<b>0,002 ↓</b>	<b>0,032 ↓</b>
	72 (-CIS)	0,090	0,176	0,177	<b>0,011 ↓</b>	<b>0,001 ↓</b>	<b>0,007 ↓</b>
48 (-CIS)	72 (-CIS)	0,406	0,613	0,633	0,416	0,148	0,152

Tablo 8. NIH/3T3 hücrelerinde sisplatinin sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi

İnkübasyon (saat) karşılaştırması  (+CIS, sisplatin ile inkübasyon)  (-CIS, sisplatin yıkandıktan sonra inkübasyon)		Sisplatin dozlarında anlamlılık dereceleri					
		0 µg/mL	8 µg/mL	12 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
24 (+CIS)	24 (-CIS)	0,422	<b>0,003 ↓</b>	<b>0,001 ↓</b>	0,085	<b>0,009 ↓</b>	<b>0,004 ↓</b>
	48 (-CIS)	0,148	<b>0,003 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	0,076	<b>0,005 ↓</b>	<b>0,001 ↓</b>
	72 (-CIS)	<b>0,035 ↑</b>	<b>0,004 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>	0,064	<b>0,004 ↓</b>	<b>0,000 ↓</b>
24 (-CIS)	48 (-CIS)	0,422	0,703	0,778	0,928	0,390	<b>0,023 ↓</b>
	72 (-CIS)	0,089	0,878	0,330	0,810	0,256	<b>0,004 ↓</b>
48 (-CIS)	72 (-CIS)	0,251	0,597	0,465	0,880	0,736	0,089

### 3.3. Arı Zehrinin Genomik DNA Konsantrasyonlarına ve DNA Fragmentasyonuna Etkisi

Arı zehri ile 24 saat muamelenin ardından materyal ve metotta belirtildiği gibi hücrelerden total DNA izolasyonu yapıldı ve konsantrasyonları ölçülerek karşılaştırıldı (Bkz Bölüm 2.5.). HEPG2, MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücrelerinin konsantrasyonları sırasıyla Tablo 9A, B ve C’de verilmiştir. HEPG2 ve MDA-MB-231 hücrelerinde en yüksek iki dozda (50 ve 100 µg/mL) mikrolitre başına düşen DNA miktarı oldukça azalmışken, NIH/3T3 hücrelerinde sadece en yüksek (100 µg/mL) dozda konsantrasyon düşük tespit edilmiştir. DNA’ların saflık oranları beklenen aralıklardadır (Saf genomik DNA oranları 260/280=1,8-2, 260/230=2-2,2 olmalıdır).

Tablo 9. Arı zehri uygulaması sonrasında elde edilen DNA konsantrasyonları

## A ) HEPG2

Dozlar $\mu\text{g/ml}$	ng/ $\mu\text{l}$	260/280	260/230
kontrol	18.9	1.87	2.05
8	25.9	1.83	1.97
12	39.4	1.89	1.96
25	51.8	1.83	2.30
50	2.8	1.87	2.12
100	1.2	1.84	2.09

## B ) MDA-MB-231

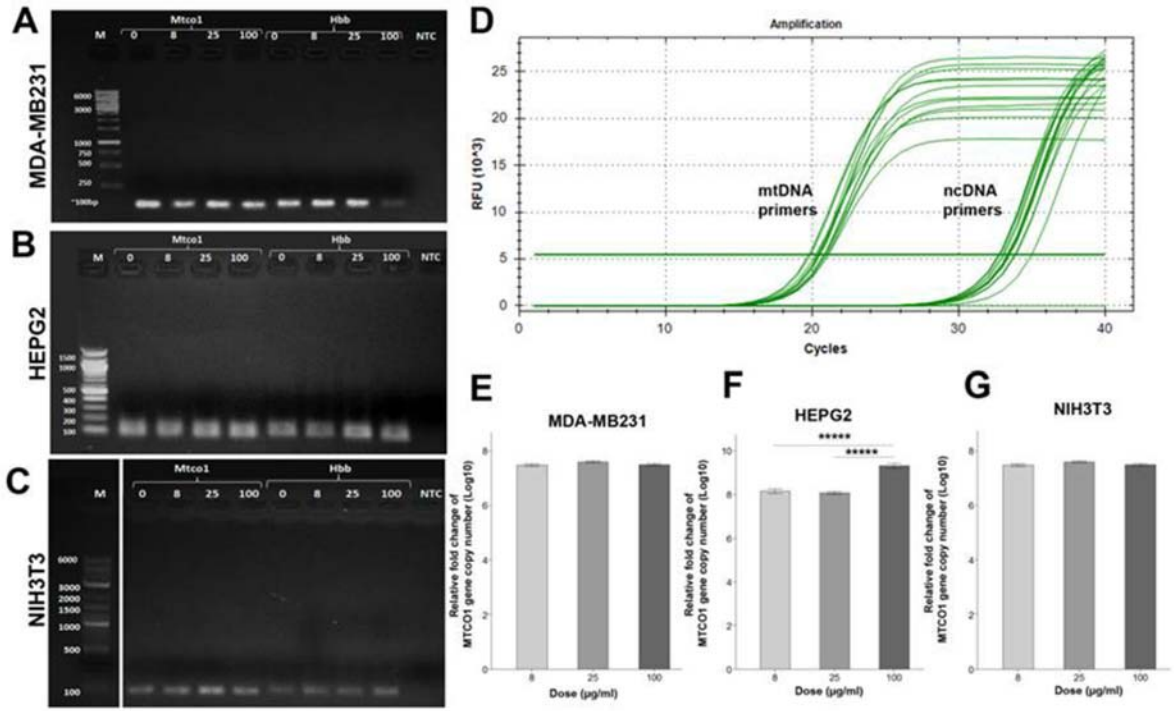
Dozlar $\mu\text{g/ml}$	ng/ $\mu\text{l}$	260/280	260/230
kontrol	107.9	1.85	2.43
8	28.3	1.83	2.27
12	56.9	1.76	2.03
25	20.9	1.79	2.16
50	2.2	1.80	2.32
100	4.2	1.73	2.52

## C ) NIH3T3

Dozlar $\mu\text{g/ml}$	ng/ $\mu\text{l}$	260/280	260/230
kontrol	156.6	1.63	2.51
8	230.3	1.66	2.56
12	361	1.64	2.62
25	302.6	1.47	2.41
50	186.7	1.73	2.67
100	27.6	1.86	2.39

### 3.4. QPCR Yöntemi ile Mitokondriyal DNA Kopya Sayısının Tespiti

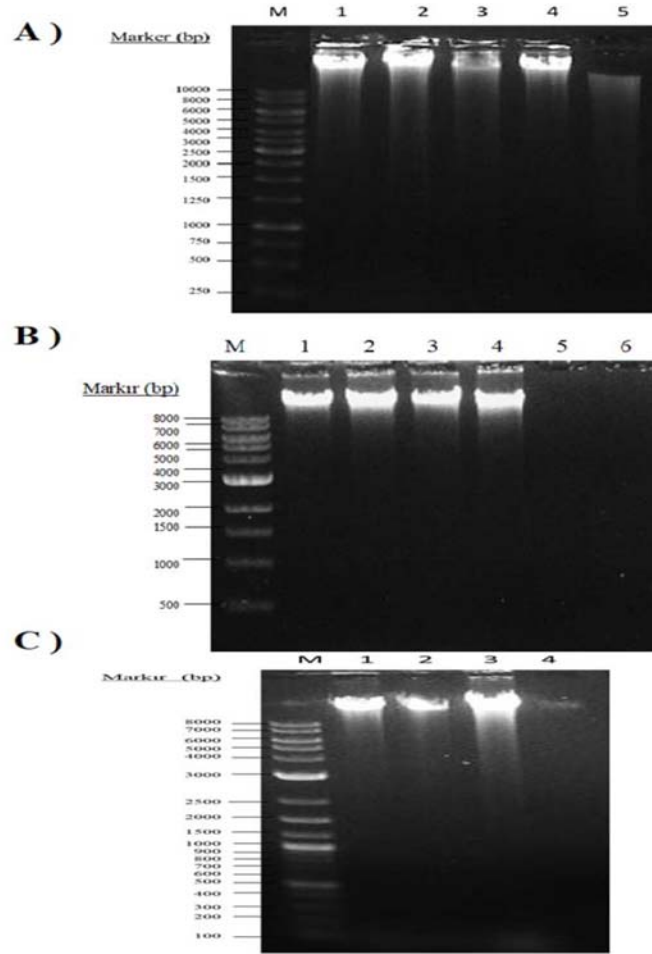
Materyal ve metotlar (Bölüm 2.6) bölümünde açıklandığı gibi mtDNA kopya sayısı varyasyonu (CNV)'nin belirlenmesi için QPCR yapıldı. QPCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek (Şekil 11 A-C) *MTCO1* ve *HBB* PCR ürünlerinin varlığı doğrulandı. QPCR reaksiyon grafiği, Şekil 11D'de gösterilmektedir. Arı zehri ile muamele edilmiş hücrelerin bağıl kopya sayısı varyasyonları,  $\log_{10} [2^{-\Delta\Delta C_t}]$  formülü kullanılarak hesaplandı (Şekil 11 E-G). Arı zehri, MDA-MB-231 hücrelerinde bağıl kopya sayısı varyasyonunda önemli bir değişikliğe sebep olmamasına rağmen ( $p>0.05$ ) (Şekil 11E), HEPG2 hücrelerinin 100  $\mu\text{g/mL}$  olan en yüksek dozunda mtDNA CNV'de yaklaşık 1,125 kat artışa neden olmuştur ( $p<0,0001$ ) (Şekil 11F). MDA-MB-231'e benzer şekilde, arı zehri ile muamele edilmiş NIH/3T3 hücrelerinin mtDNA CNV'sinde muamele edilmemiş kontrol hücrelerine kıyasla herhangi bir değişiklik olmamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 11G).



Şekil 11. Arı zehrinden sonra hücrelerdeki mitokondriyal DNA (mtDNA) kopya sayısının değişimi. A, B ve C sırasıyla MDA-MB231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinin QPCR reaksiyonlarının agaroz jel elektroforezi sonuçlarını göstermektedir. D, mtDNA ve ncDNA primerlerinin QPCR reaksiyonu için tipik olan amplifikasyon grafiğini göstermektedir. E, F ve G, sırasıyla MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 için hesaplanmış mtDNA bağıl kat değişimini göstermektedir. Sadece HEPG2 hücrelerinde en yüksek dozda anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p < 0,0001$ ).

### 3.5. DNA Fragmentasyonu

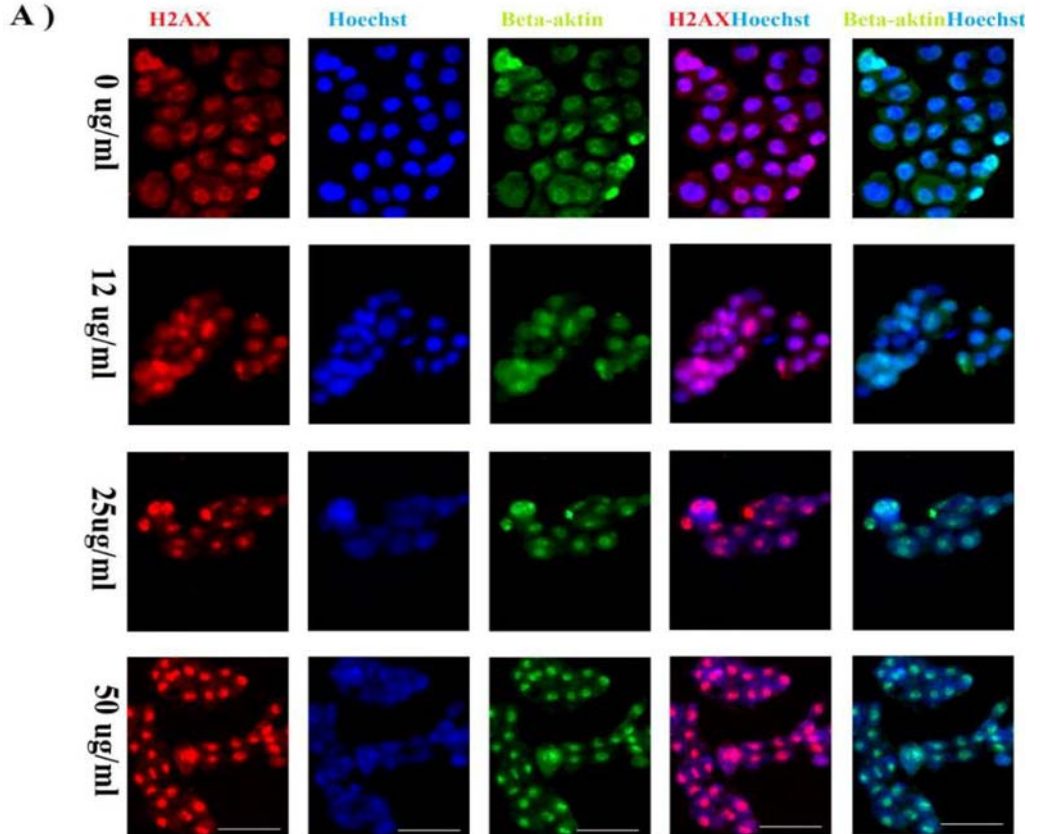
İzole edilen total DNA örneklerinden fragmentasyon analizi yapıldı. Sonuçlar UV transimülatör ile görüntülendi (Şekil 12). Sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinde arı zehri doz 100 µg/mL’de DNA fragmentasyonu görülürken, HEPG2 hücrelerinde 25 µg/mL’de ve MDA-MB-231 hücrelerinde ise en fazla DNA kırılması doz 50 ve 100 µg/mL’de bantlar smear şeklinde görülmüştür.



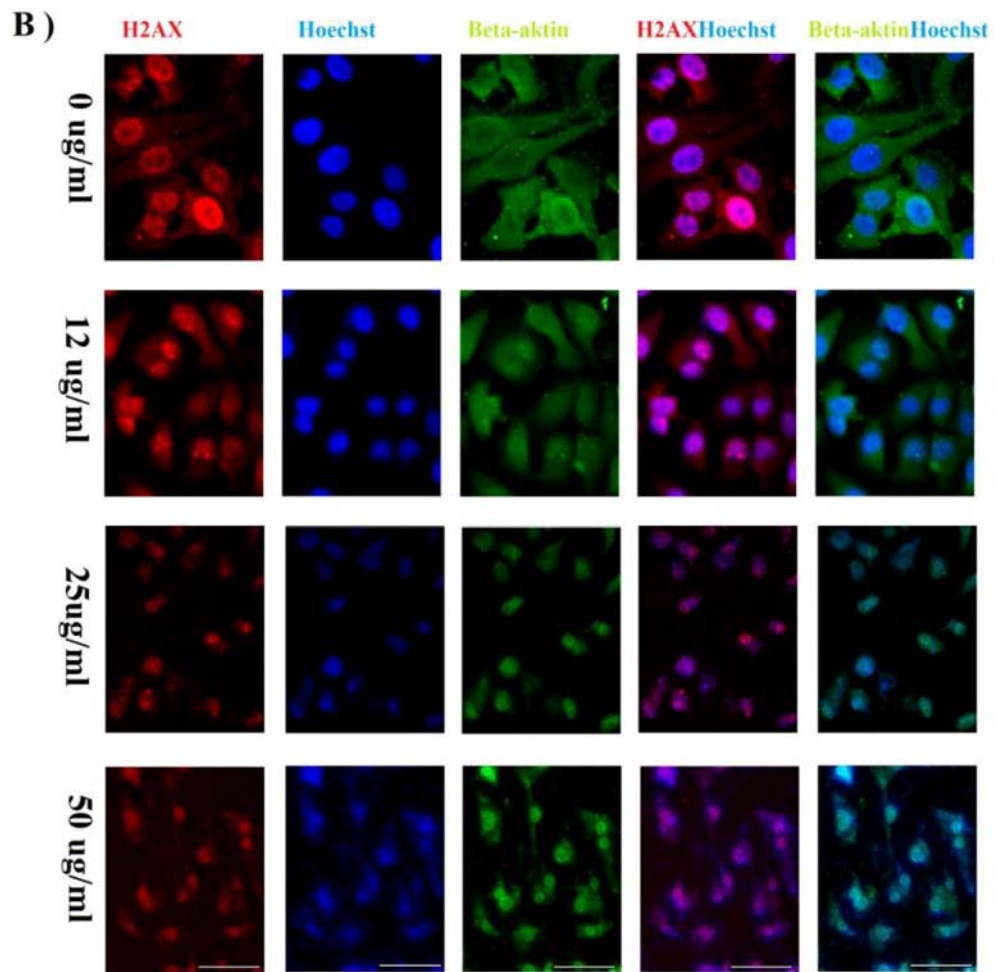
Şekil 12. Arı zehri muamelesinden sonra NIH/3T3 (A), MDA-MB-231 (B) ve HEPG2 (C) hücrelerinin DNA fragmentasyon analizi. (A) 100 bp marker (New England Biolabs, Kat No. N3200S), Dozlar; 1) Arı zehri verilmemiş kontrol hücreleri (0  $\mu\text{g/mL}$ ), 2) 12  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri, 3) 25  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri, 4) 50  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri, 5) 100  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri muamelesinden sonra izole edilen genomik DNA örnekleri. (B) 1 kp marker (New England Biolabs, Kat No. N3231S, MA, ABD), Dozlar 1) Arı zehri verilmemiş kontrol hücreleri (0  $\mu\text{g/mL}$ ), 2) 8  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri, 3) 12  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri, 4) 25  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri, 5) 50  $\mu\text{g/mL}$  ve 6) 100  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri muamelesinden sonra izole edilen genomik DNA örnekleri. (C) 100 bp marker (Thermo Scientific, Kat No. SM0311), Dozlar 1) Arı zehri verilmemiş kontrol hücreleri (0  $\mu\text{g/mL}$ ), 2) 8  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri, 3) 12  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri, 4) 25  $\mu\text{g/mL}$  arı zehri.

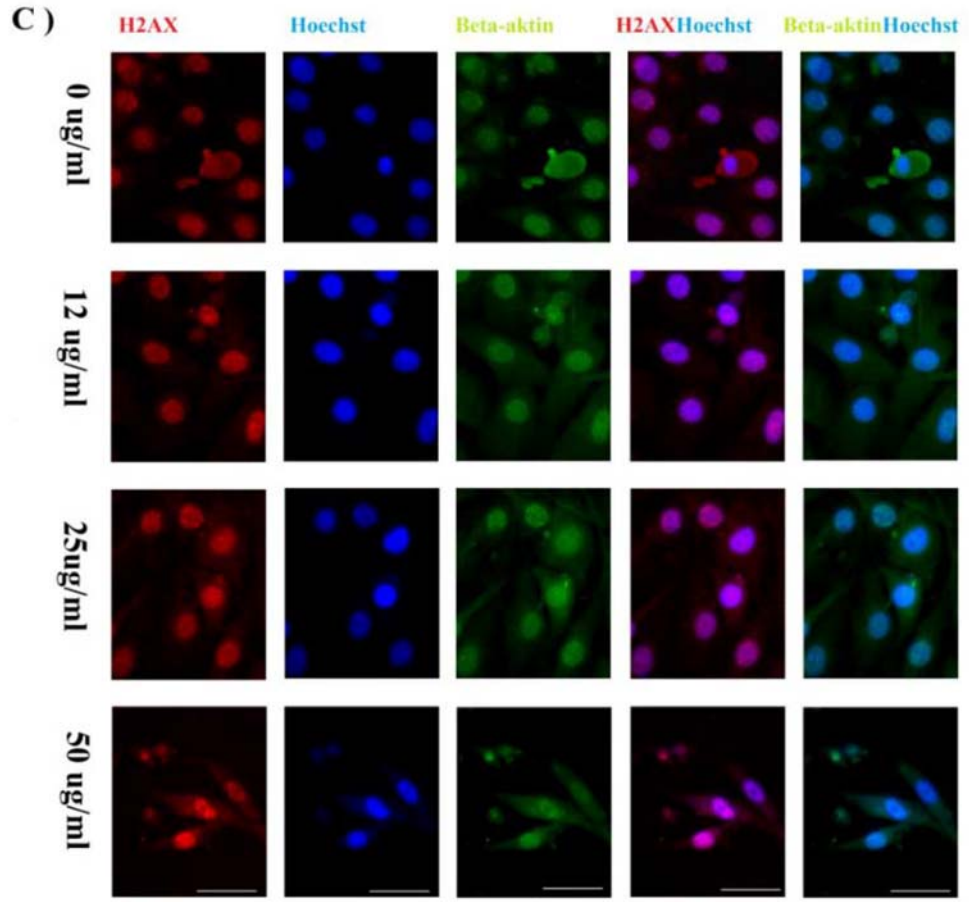
### 3.6. DNA Hasarı ve Hücre İskelet Proteininin Tespiti İçin İmmünboyama

NIH/3T3, MDA-MB-231 ve HEPG2 hücrelerinde Arı zehrinin genotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek için 24 saatlik muameleden sonra DNA hasarı markırı olan  $\gamma$ -H2AX için immünboyama yapılmıştır. Ayrıca hücre iskelet proteini olan  $\beta$ -aktin immünboyaması yapılmıştır (Şekil 13). HEPG2 hücrelerinde arı zehrinin dozu arttıkça  $\gamma$ -H2AX ışınması artarken (Şekil 13A), MDA-MB-231 hücrelerinde düşmüştür (Şekil 13B), sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinde ise  $\gamma$ -H2AX ışınması 50  $\mu$ g/mL'de artmıştır (Şekil 13C).  $\beta$ -aktin immünboyaması sonucunda ise, HEPG2 hücrelerinde genel olarak hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunan  $\beta$ -aktinin 25 ve 50  $\mu$ g/mL'de daha çok çekirdekte lokalize olduğu (Şekil 13A), MDA-MB-231 hücrelerinde genel olarak sitoplazmada olan  $\beta$ -aktinin HEPG2'de olduğu gibi 25 ve 50  $\mu$ g/mL'de daha çok çekirdekte lokalize olduğu tespit edilmiştir (Şekil 13B). Ancak NIH/3T3 hücrelerinde genel olarak daha çok çekirdekte bulunan  $\beta$ -aktin, artan arı zehri dozu ile birlikte daha çok sitoplazmada lokalize olmuş, aynı zamanda çekirdekte bulunan  $\beta$ -aktin ışınmasında da artış gözlenmiştir (Şekil 13C).









Şekil 13. Arı zehri muamelesinden sonra sağlıklı ve kanser hücrelerinin immünboyama görüntüleri: A) HEPG2, B) MDA-MB-231 ve C) NIH/3T3 hücrelerine ait  $\gamma$ -H2AX (kırmızı),  $\beta$ -aktin (yeşil) ve Hoechst (mavi) immünboyama;  $\gamma$ -H2AX/Hoechst ve  $\beta$ -aktin/Hoechst üst üste çakıştırılmış görüntüleridir. Ölçek aralığı 10 mikrondur.

#### 4. TARTIŞMA

Normal hücrelerle yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, arı zehrinin kanser hücrelerinin sitotoksitesisi üzerindeki seçici etkisini ortaya koymak için çok önemlidir. Zaten ideal kanser tedavisinde amaç sağlıklı olan hücelere minimum hasar vermek ya da hiç vermemektedir. Bu tezde arı zehrinin daha ziyade kanser hücrelerinin üzerine spesifik olarak etki ettiği tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarda örneğin 4,5 µg/mL arı zehri ile 24 saat inkübasyonun MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölümüne neden olduğu, ancak normal hücrelerin (periferik kan hücreleri) 12,5 µg/mL ile 72 saat inkübasyona kadar canlı kaldığı görülmüştür (Jung GB, 2018). Arı zehrinin meme kanseri üzerindeki etkisi de farelerle yapılan *in vivo* çalışmalar ile doğrulanmıştır (Orsolice vd., 2003). Arı zehri, glioblastoma hücrelerinde de apoptozu indüklemiştir, ancak normal fibroblastlarda hücre ölümünü etkilememiştir (Sisakht, 2017). Benzer şekilde, arı zehri normal kolon hücrelerinin canlılığını etkilememiş ama iki kolon kanseri hücre hattında yüksek oranda hücre ölümüne sebep olmuştur (Zheng vd., 2015). Arı zehrindeki bazı peptid gruplarının, kültürdeki normal hücrelerden ziyade kanser hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Slaninova vd., 2012). Bu çalışmalar, arı zehrinin kanser hücrelerinde sitotoksikite üzerinde spesifik ve seçici bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, arı zehrinin motor nöron hücrelerini, apoptoz indükleyici olarak görev yapan bir çeşit fare zehri olan Rotenon kimyasalından koruduğu da gösterilmiştir (Jung vd., 2015). Bütün bu çalışmalar kanser tedavisinde arı zehrinin değerli bir bileşik olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

Arı zehrinin çok farklı etki mekanizması vardır. Örneğin glioblastoma hücrelerinde hücre ölümüne matris metalloproteinaz-2 enziminin etkisini bastırarak neden olduğu gösterilmiştir (Sisakht, 2017). Ayrıca arı zehrinde bulunan fosfolipaz A2 ve B enzimlerinden (Doery ve Pearson, 1964; Sobotka vd., 1976) fosfolipaz A2'nin seçici olarak hasarlı membran yapısına sahip kanser hücrelerine etki ettiği, ancak intakt membranı olan normal hücelere nüfus edemediği gösterilmiştir (Putz vd., 2007). Arı zehri bileşeni olan ve litik peptid olarak da bilinen melittin zarın hidrofobik tabakasıyla bütünleşerek membranı hedefleyebilir (Leuschner ve Hansel, 2004). Arı zehri, yumurtalık ve meme kanserinde

yaygın bir kemoterapötik ajan olan sisplatin ile kombine bir şekilde kullanılmış ve sitotoksosite üzerinde sinerjistik bir etkisi olduğu bulunmuştur (Alizadehnohi vd., 2012; Shiassi Arani vd., 2019). Farklı eklem bacaklılardan elde edilen diğer zehirler de kanserde sitotoksositeyi indükleyebildikleri ve ayrıca anti-mikrobiyal aktiviteye sahip oldukları için umut verici adaylardır (Chaisakul vd., 2016).

İncelenen arı zehri örneği, Türkiye'nin Karadeniz bölgesindeki *Apis mellifera*'dan elde edildi. Önceki bir TUBİTAK projesinde (Proje no: 117Z747) SDS-PAGE elektroforez analizi kullanılarak karışımın arı zehri olduğu doğrulandı. Ayrıca LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi), arı zehri bileşenlerini hem kantitatif hem de kalitatif olarak ortaya çıkarmak için kullanılabilir. Gelecekteki yaklaşım, bu etkiyi gösteren belirli bir bileşik ve/veya bileşiklerini tanımlamak için arı zehrinin her bir bileşeninin sitotoksosite, mitokondriyal, genetik ve epigenetik değişiklikler açısından bireysel olarak araştırılmasına dayanabilir. Ancak bu tez çalışmasında elde edilen bulgulardaki farklılıkları ortaya çıkaran ana bileşiği/bileşiklerini tamamlamak zordur. Dolayısıyla bu tezde arı zehrinin bir bütün olarak değerlendirilmesi açısından bulgular sağlanmaktadır.

Mitokondriyal membran geçirgenliği, mitokondri fonksiyonunu anlamak için yaygın olarak kullanılan parametrelerden biridir. Kanser terapileri geliştirilirken moleküler hedeflerden biri mitokondriyal fonksiyonlara dayanmaktadır (Cui, 2017; Wen, 2013). Mitokondri hücrel metabolizma ve hücrelerdeki intrinsik apoptotik yolağın düzenlenmesi üzerinde fonksiyonlara sahiptir ve bir dizi kanserin mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lu vd., 2009). Melittinin, sitokrom c salınımına neden olan mitokondriyal membran geçirgenliğini azalttığı ve dolayısıyla mide kanserinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Kong vd., 2016). Mesane kanserinde arı zehri kaynaklı hücre ölümü için önerilen mekanizma, mitokondriyal membran geçirgenliğinin azalması ve kaspaz aktivitelerinin uyarılmasına dayanır (Ip, 2012). Ancak, mitokondriye ait bir diğer parametre olan mtDNA kopya sayısı üzerine, arı zehrinin nasıl etki ettiğini gösteren bir çalışma yoktur. Bu tezde, ilk kez arı zehrinin mitokondriyal DNA kopya sayısı varyasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. mtDNA, hücre içinde çok sayıda mitokondri içinde birçok kopya olarak bulunmaktadır. mtDNA'nın kopya sayısı hücre tipine ve hücrel faaliyetlere bağlıdır. mtDNA kopya sayısındaki değişimler kanserde sık görülen bulgulardan biridir ve yüksek kopya sayısının daha düşük solid kanser riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur

(Memon vd., 2017). Karaciğer kanseri hücreleri için azalan riskin, yüksek mtDNA kopya sayısı ile ilişkili iken meme kanserinde ise düşük sayıda mtDNA kopya sayısı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Hu vd., 2016). Bu çalışmada, arı zehri HEPG2 hücrelerinde mtDNA kopya sayısının artmasında etkili olurken MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücrelerinde bir etki göstermemiştir. Ayrıca HEPG2 hücreleri, her bir dozdaki MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücrelerine kıyasla daha fazla mtDNA kopya sayısına sahip bulunmuştur. Karaciğer hücrelerinin zaten normalde de yüksek enerji düzeylerinden dolayı fazla sayıda mitokondri içermeleri, kanserleşmiş karaciğer hücrelerinde tespit edilen bu farkı desteklemektedir. Buna karşılık, normal hücreler diğer iki hücreye göre daha az mtDNA kopya sayısı içermektedir.

Kanserin metastazında, doku bozulmasına yol açan hücrel morfogenezdeki kusurlara, kontrolsüz göç ve istilacı özelliklerin kazanılması ve genomik instabilite oluşumu da eşlik eder. Bu tür hücrel işlemlerin temelini oluşturan kilit proteinlerinden bazıları hücre iskelet proteinleridir (Hall, 2009). Örneğin bu proteinlerden aktin ve tübülün, sitoplazmik organelleri ve hücre içi bölümleri düzenleyebilen, hücre polaritesini belirleyen ve kasılma kuvveti yaratabilen çok yönlü, dinamik proteinlerdir. Hücre döngüsünde, bu iki protein, kromozomal ayrılmayı ve hücre bölünmesini harekete geçirir. Morfogenez sırasında, hücre şeklini ve polaritesini belirlerler ve sırasıyla kaderin ve integrin proteinleri ile etkileşimleri yoluyla stabil hücre-hücre ve hücre-matris bağlantılarını desteklerler (Eden vd., 2002). Ayrıca, hücre göçü sırasında hücre çeperine içten itme ve çekme kuvvetleri ile hücrenin hareketini sağlarlar. Bunlar, normal hücre davranışının bir parçası iken kanser seyrinde bu hücre iskelet proteinlerinin ve aktivitelerinin değiştiği gösterilmiştir (Fife vd., 2014). Şekil 13'de gösterildiği gibi  $\beta$ -aktin proteini sadece sitoplazmada değil çekirdekde de lokalizedir. Daha önceki çalışmalar  $\beta$ -aktin proteinlerinin sadece sitoplazmada bulunduğu dair işaretler göstermesine rağmen; son çalışmalar,  $\beta$ -aktinin çoklu çekirdek kompleksi arasındaki ilişkiyi göstermiştir ki bu çekirdekte  $\beta$ -aktin varlığını kanıtlar niteliktedir. Sitoplazmadaki  $\beta$ -aktin, hücre hareketi, iskeletinin oluşturulması ve hücre bölünmesine görev alırken, çekirdekte bulunan  $\beta$ -aktinin DNA hasarının, özellikle çift zincir kırıklarının tamirinin yapıldığı G2 kontrol noktasında görev aldığı gösterilmiştir (Schrank vd., 2018). Buna ek olarak  $\beta$ -aktinin; nükleer matriks birleşmesi, kromatinin yeniden modellenmesi, transkripsiyon ve mRNA işlenmesi gibi nükleer yapıdaki çeşitli yapısal ve işlevsel rollere sahip olduğu belirlenmiştir (Bohnsack vd., 2006). Kütle spektrometresi (Bohnsack vd., 2006) ve immünoreaktivite deneyleri (Hu vd., 2004)

$\beta$ -aktinin, heterojen nükleer ribonükleoproteinler (hnRNPler) ve RNA polimeraz kompleksleri ile bağlantılı nükleer bir izoformu olduğunu göstermektedir. Hatta  $\beta$ -aktinin farklı polimerizasyon durumlarının çekirdekte birlikte var olduğu gösterilmiştir (Schoenenberger vd., 2005). Floresan ile boyama çalışmaları, nükleer aktin havuzunun yaklaşık % 20 sinin çok dinamik polimerik bir popülasyonun özelliklerine sahip olduğunu ortaya koymuştur (McDonald vd., 2006). Arı zehri muamelesinden sonra  $\beta$ -aktin kanser hücrelerinde daha çok çekirdek formunda, sağlıklı hücrelerde ise tam tersi daha çok sitoplazmik formda tespit edilmiştir. Böylece, arı zehrinin kanser hücrelerinde  $\beta$ -aktin kromatin değişiklikleri ve mRNA işlemesine müdahale ederek etki gösterdiği, sağlıklı hücrelerde ise daha çok hücre hareketine etki ettiği düşünülebilir. Histon H2AX, ökaryotlarda C-terminalinde evrimsel olarak korunan H2A histon ailesinin 14 kDa lık bir üyesidir. Bu motif içindeki serin 139, çift sarmallı DNA hasarına ve apoptoza yanıt olarak hızla fosforile olarak  $\gamma$ -H2AX olarak bilinen bir form alır. Fosforilasyon, DNA hasarı meydana geldikten 1-3 dakika sonra maksimuma yakın seviyeye ulaşır ve her çift iplik DNA kırılması sırasında yüzlerce  $\gamma$ -H2AX molekülü açığa çıkar (Schmid vd., 2012).  $\gamma$ -H2AX immünboyaması ile çift sarmallı DNA kırılmalarını tespit edilebilmektedir (Hamer vd., 2003). Kanser hücrelerdeki DNA hasarı ve genomik instabilitenin biyobelirteci olarak fosforillenmiş H2AX'lerin ( $\gamma$ -H2AX) immün boyaması yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Ji vd., 2017; Nagelkerke ve Span, 2016; Redon vd., 2009). Bu tez kapsamında, arı zehrinin kanser ve normal hücrelerdeki DNA hasarını belirlemek için H2AX antikoru ile immün boyama yapılmıştır. Boyama sonucunda, HEPG2 hücrelerinde dozla birlikte  $\gamma$ -H2AX ışınması artarken, MDA-MB-231 hücrelerinde  $\gamma$ -H2AX ışınmasında düşüş gözlenmiştir. Sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinde yüksek dozda (50 $\mu$ g/mL) artmış  $\gamma$ -H2AX ışınması gözlenmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda genel olarak, arı zehrinin kanser hücrelerinde mtDNA kopya sayısının ve DNA hasarının artması ve beta aktin proteinin daha çok çekirdekte yer almasını indükleyerek sağlıklı hücelere göre farklı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak her iki kanser hücresinde tespit edilen bazı değişiklikler farklı olduğu için, arı zehrinin genel olarak kanser spesifik etki göstermesinin yanında, kanser tipine de spesifik etki gösterdiği düşünülebilir. Ayrıca arı zehrinin yine kanser seçici göstermiş olduğu sitotoksik etkinin, kemoterapi ajanına göre uzun vadede de daha seçici olduğu söylenebilir.

## 5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında; MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücre kültürlerine arı zehrinin etkili dozunun verilmesi, arı zehriden sonra hücrelerde QPCR yöntemi ile mitokondriyal DNA kopya sayısı tespit edilmesi; DNA izolasyonu; DNA hasarı, hücre iskelet proteininin immünboyama yoluyla incelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca arı zehri hücrelerden uzaklaştırıldıktan sonra hücre ölümünün devam edip etmediği tripan mavisi ile belirlenerek arı zehrinin seçiciliğinin kemoterapi ajanı sisplatin ile karşılaştırılması da hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir:

1. MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerine farklı dozlarda verilen arı zehri, düşük dozlarda (8 ve 12 µg/mL) seçici olarak kanserli hücreleri öldürmüştür. Arı zehrine kontrol olarak sisplatinin uygulanması sonucu ise kanserli hücreler ile sağlıklı hücreler benzer oranlarda ölmüştür. Sisplatinden sonra hesaplanan selektif indeksler arı zehrine göre oldukça düşüktür.
2. Arı zehri muamele edilen MDA-MB-231 ve HEPG2 hücrelerinde morfolojik olarak hücreler küçülmüş ve yüksek dozlarda hücre yoğunluğu azalmıştır. Sisplatin ile muamele edilen MDA-MB-231, HEPG2 ve NIH/3T3 hücrelerinde morfolojik olarak hücreler küçülmüş olup hem sağlıklı hem kanserli hücrelerin bütün dozlarında hücre yoğunluğu azalmıştır.
3. Arı zehrinin uzun vadedeki sitotoksik etkisine bakıldığında; arı zehri muamele edilip uzaklaştırıldıktan sonraki 72 saate kadar sağlıklı hücrelerin çoğalmaya devam etmesi ancak kanserli hücrelerin canlılık oranlarının azalması, arı zehrinin uzun vadede de seçici olduğunu göstermiştir.
4. Sisplatinin uzun vadedeki sitotoksik etkisine bakıldığında; kanser (MDA-MB-231 ve HEPG2) hücrelerinin tüm dozlarında 72 saate kadar hücre canlılığı azalmaya devam etmektedir. Ancak arı zehriden farklı olarak sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinin en düşük dozunda (8 µg /mL) bile hücre canlılığı azalmıştır.
5. Arı zehri ile muameleden sonra MDA-MB-231 ve HEPG2 kanserli hücrelerinden çok düşük miktarda (mikrolitre başına) genomik DNA elde edilirken sağlıklı hücre NIH/3T3 'ten daha yüksek miktarda genomik DNA elde edilmiştir. DNA fragmentasyon analizinde sağlıklı hücrelerin genomik DNA'sı doz 100 µg/mL'ye

kadar sağlam kalabilirken, kanserli hücreslerde genomik DNA kırılması daha düşük dozlardan başlamıştır (HEPG2 için doz 25 µg/mL, MDA-MB-231 için doz 8 µg/mL den itibaren).

6. Arı zehri, MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücrelerinde mitokondriyal DNA kopya sayısı varyasyonunda önemli bir değişikliğe sebep olmamasına rağmen HEPG2 hücrelerinin 100 µg/mL olan en yüksek dozunda mtDNA CNV'de artışa neden olmuştur.
7. Arı zehri muamelesinden sonra DNA hasarını belirlemek için γ-H2AX immünboyaması yapılmıştır. HEPG2 hücrelerinde arı zehrinin dozu arttıkça γ-H2AX ışması artarken, MDA-MB-231 hücrelerinde düşüş olmuştur, sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinde ise γ-H2AX ışması 50 µg/mL'de artmıştır.
8. Arı zehri muamelesinden sonra hücre iskelet proteini olan β-aktin immünboyaması da yapılmıştır. HEPG2 hücrelerinde genel olarak hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunan β-aktinin 25 ve 50 µg/mL'de daha çok çekirdekte lokalize olduğu, MDA-MB-231 hücrelerinde genel olarak sitoplazmada olan β-aktin'in HEPG2'de olduğu gibi 25 ve 50 µg/mL'de daha çok çekirdekte lokalize olduğu tespit edilmiştir. Ancak NIH/3T3 hücrelerinde genel olarak daha çok çekirdekte bulunan β-aktin, artan arı zehri dozu ile birlikte daha çok sitoplazmada lokalize olmuş, aynı zamanda çekirdekte bulunan β-aktin ışmasında da artış gözlenmiştir.



## 6. ÖNERİLER

Karsinogenez, hem genetik hem de epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenen karmaşık bir mekanizmadır. Kanser tedavisi için kimyasal bileşiklere göre doğal bileşikler daha çok tercih edilebilir ilaç adaylarıdır ve arı zehri bunlardan biridir. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen bulguların, gen ve yolak seviyesinde özelleştirilerek, arı zehrinin gösterdiği spesifik etkinin mekanizmasının aydınlatılmasına öncülük ettiği düşünülmektedir. Ayrıca arı zehri bileşenlerinin tek tek hücrelere muamele edilmesiyle, asıl etkenin veya etkenlerine olduğu tespit edilebilir. Böylece bu çalışmalar *in vivo* düzeye taşınarak, ilaç olma potansiyelinin net olarak belirlenmesi mümkün olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- Agarwal, M. K., Ruhul Amin, A. R. ve Agarwal, M. L., 2007. DNA replication licensing factor minichromosome maintenance deficient 5 rescues p53-mediated growth arrest, Cancer Res, 67,1, 116-121.
- Aggarwal, B. B., 2004. Nuclear factor-kappaB: the enemy within, Cancer Cell, 6,3, 203-208.
- Mahmoud A. vd., 2012. Studies on bee venom and its medical uses, International Journal of Advancements in Research and Technology, vol. 1, pp. 1–15.
- Alizadehnohi, M., Nabiyuni, M., Nazari, Z., Safaeinejad, Z. ve Irian, S., 2012. The synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on human ovarian cancer cell line A2780cp, J Venom Res, 3, 22-27.
- Appella, E. ve Anderson, C. W., 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses, Eur J Biochem, 268,10, 2764-2772.
- Ariga, T. ve Seki, T., 2006. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review, Biofactors, 26,2, 93-103.
- Badisa, R. B., Darling-Reed, S. F., Joseph, P., Cooperwood, J. S., Latinwo, L. M. ve Goodman, C. B., 2009. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells, Anticancer Res, 29,8, 2993-2996.
- Balaguer, F., Link, A., Lozano, J. J., Cuatrecasas, M., Nagasaka, T., Boland, C. R. ve Goel, A., 2010. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis, Cancer Res, 70,16, 6609-6618.
- Bode, A. M. ve Dong, Z., 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis, Nat Rev Cancer, 4,10, 793-805.
- Bohnsack, M. T., Stuken, T., Kuhn, C., Cordes, V. C. ve Gorlich, D., 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes, Nat Cell Biol, 8,3, 257-263.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. ve Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, CA Cancer J Clin, 68,6, 394-424.

- Carr, A. M., 2000. Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle, Science, 287,5459, 1765-1766.
- Chabner, B. A. ve Roberts, T. G., Jr., 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer, Nat Rev Cancer, 5,1, 65-72.
- Chaisakul, J., Hodgson, W. C., Kuruppu, S. ve Prasongsook, N., 2016. Effects of Animal Venoms and Toxins on Hallmarks of Cancer, J Cancer, 7,11, 1571-1578.
- Chandek, C. ve Mooi, W. J., 2010. Oncogene-induced cellular senescence, Adv Anat Pathol, 17,1, 42-48.
- Croce, C. M., 2008. Oncogenes and cancer, N Engl J Med, 358,5, 502-511.
- Cui QB, 2017. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach: recent updates.
- Dasari, S. ve Tchounwou, P. B., 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, Eur J Pharmacol, 740, 364-378.
- Desoize, B., 2002. Cancer and metals and metal compounds: part I--carcinogenesis.
- DeVita, V. T., Jr. ve Chu, E., 2008. A history of cancer chemotherapy, Cancer Res, 68,21, 8643-8653.
- Doery, H. M. ve Pearson, J. E., 1964. Phospholipase B in snake venoms and bee venom, Biochem J, 92,3, 599-602.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. ve Kirschner, M. W., 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck, Nature, 418,6899, 790-793.
- Einhorn LH., 2009. Treatment of testicular cancer: a new and improved model.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death, Toxicol Pathol, 35,4, 495-516.
- Enger, E. e. a., 2012. Concepts in Biology' 2007 Ed.2007 Edition. McGraw-Hill., p. 173. ISBN 978-0-07-126042-8.
- Fahraeus, R., Fischer, P., Krausz, E. ve Lane, D. P., 1999. New approaches to cancer therapies, J Pathol, 187,1, 138-146.
- Ferguson, L. R., Chen, H., Collins, A. R., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S., Malhotra, M., Meeker, A. K., Amedei, A., Amin, A., Ashraf, S. S., Aquilano, K., Azmi, A. S., Bhakta, D., Bilsland, A., Boosani, C. S., Chen, S., Ciriolo, M. R., Fujii, H., Guha, G., Halicka, D., Helferich, W. G., Keith, W. N., Mohammed, S. I., Nicolai, E., Yang, X., Honoki, K., Parslow, V. R., Prakash, S., Rezazadeh, S., Shackelford, R.

- E., Sidransky, D., Tran, P. T., Yang, E. S. ve Maxwell, C. A., 2015. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition, Semin Cancer Biol, 35 Suppl, S5-S24.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. ve Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, Int J Cancer, 136,5, E359-386.
- Fife, C. M., McCarroll, J. A. ve Kavallaris, M., 2014. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis, Br J Pharmacol, 171,24, 5507-5523.
- Goodsell, D. S., 2006. The molecular perspective: cisplatin, Oncologist, 11,3, 316-317.
- Graham, J. G., 2000. Plants used against cancer an extension of the work of Jonathan Hartwell.
- Gullett, N. P., Ruhul Amin, A. R., Bayraktar, S., Pezzuto, J. M., Shin, D. M., Khuri, F. R., Aggarwal, B. B., Surh, Y. J. ve Kucuk, O., 2010. Cancer prevention with natural compounds, Semin Oncol, 37,3, 258-281.
- Hall, A., 2009. The cytoskeleton and cancer, Cancer Metastasis Rev, 28,1-2, 5-14.
- Halsted, W. S., 1894. I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894, Ann Surg, 20,5, 497-555.
- Hamer, G., Roepers-Gajadien, H. L., van Duyn-Goedhart, A., Gademan, I. S., Kal, H. B., van Buul, P. P. ve de Rooij, D. G., 2003. DNA double-strand breaks and gamma-H2AX signaling in the testis, Biol Reprod, 68,2, 628-634.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation, Cell, 144,5, 646-674.
- Hastak, K., Agarwal, M. K., Mukhtar, H. ve Agarwal, M. L., 2005. Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate, FASEB J, 19,7, 789-791.
- Hastak, K., Gupta, S., Ahmad, N., Agarwal, M. K., Agarwal, M. L. ve Mukhtar, H., 2003. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells, Oncogene, 22,31, 4851-4859.
- Hejmadi, M., 2009. Introduction to cancer biology, book.
- Hodgson, S., 2008. Mechanisms of inherited cancer susceptibility, J Zhejiang Univ Sci B, 9,1, 1-4.

- Hong, S. J., Rim, G. S., Yang, H. I., Yin, C. S., Koh, H. G., Jang, M. H., Kim, C. J., Choe, B. K. ve Chung, J. H., 2005. Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, Toxicon, 46,1, 39-45.
- Hu, L., Yao, X. ve Shen, Y., 2016. Altered mitochondrial DNA copy number contributes to human cancer risk: evidence from an updated meta-analysis, Sci Rep, 6, 35859.
- Hu, P., Wu, S. ve Hernandez, N., 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription, Genes Dev, 18,24, 3010-3015.
- Huh, J. E., Baek, Y. H., Lee, M. H., Choi, D. Y., Park, D. S. ve Lee, J. D., 2010. Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumor-bearing mice, Cancer Lett, 292,1, 98-110.
- IARC., 1981. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans.
- Ip, S. W., Chu, Y. L., Yu, C. S., Chen, P. Y., Ho, H. C., Yang, J. S., Huang, H. Y., Chueh, F. S., Lai, T. Y. ve Chung, J. G., 2012. Bee venom induces apoptosis through intracellular Ca<sup>2+</sup> -modulated intrinsic death pathway in human bladder cancer cells, Int J Urol, 19,1, 61-70.
- Ip SW, C. Y., Yu CS et al. , 2012. Bee venom induces apoptosis through intracellular Ca<sup>2+</sup> modulated intrinsic death pathway in human bladder cancer cells.
- Ip, S. W., Wei, H. C., Lin, J. P., Kuo, H. M., Liu, K. C., Hsu, S. C., Yang, J. S., Mei, D., Chiu, T. H., Han, S. M. ve Chung, J. G., 2008. Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells, Anticancer Res, 28,2A, 833-842.
- Jang, M. H., Shin, M. C., Lim, S., Han, S. M., Park, H. J., Shin, I., Lee, J. S., Kim, K. A., Kim, E. H. ve Kim, C. J., 2003. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299, J Pharmacol Sci, 91,2, 95-104.
- Jeong, Y. J., et al., 2014. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells., Food and Chemical Toxicology, 68: p. 218-225,68: p. 218-225.
- Ji, J., Zhang, Y., Redon, C. E., Reinhold, W. C., Chen, A. P., Fogli, L. K., Holbeck, S. L., Parchment, R. E., Hollingshead, M., Tomaszewski, J. E., Dudon, Q., Pommier, Y., Doroshov, J. H. ve Bonner, W. M., 2017. Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay, PLoS One, 12,2, e0171582.

- Jo, M., Park, M. H., Kollipara, P. S., An, B. J., Song, H. S., Han, S. B., Kim, J. H., Song, M. J. ve Hong, J. T., 2012. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway, Toxicol Appl Pharmacol, 258,1, 72-81.
- Ju, W., Wang, X., Shi, H., Chen, W., Belinsky, S. A. ve Lin, Y., 2007. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells, Mol Pharmacol, 71,5, 1381-1388.
- Jung GB, 2018. Anti-cancer effect of bee venom on human MDA-MB-231 breast cancer cells using Raman spectroscopy.
- Jung, S. Y., Lee, K. W., Choi, S. M. ve Yang, E. J., 2015. Bee Venom Protects against Rotenone-Induced Cell Death in NSC34 Motor Neuron Cells, Toxins (Basel), 7,9, 3715-3726.
- Kasinski, A. L., Du, Y., Thomas, S. L., Zhao, J., Sun, S. Y., Khuri, F. R., Wang, C. Y., Shoji, M., Sun, A., Snyder, J. P., Liotta, D. ve Fu, H., 2008. Inhibition of IkappaB kinase-nuclear factor-kappaB signaling pathway by 3,5-bis(2-fluorobenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin, Mol Pharmacol, 74,3, 654-661.
- Kim, G. Y., Kim, J. H., Ahn, S. C., Lee, H. J., Moon, D. O., Lee, C. M. ve Park, Y. M., 2004. Lycopene suppresses the lipopolysaccharide-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB, Immunology, 113,2, 203-211.
- Kim, S. ve Kaang, B. K., 2017. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory, Exp Mol Med, 49,1, e281.
- Kinghorn, A., Farnsworth, N., Soejarto, D., Cordell, G., Swanson, S., Pezzuto, J., Wani, M., Wall, M., Oberlies, N., Kroll, D., Kramer, R., Rose, W., Vite, G., Fairchild, C., Peterson, R. ve Wild, R., 2008. Novel Strategies for the Discovery of Plant-Derived Anticancer Agents, Pharmaceutical Biology, 41,sup1, 53-67.
- Ko, L. J. ve Prives, C., 1996. p53: puzzle and paradigm, Genes Dev, 10,9, 1054-1072.
- Kong, G. M., Tao, W. H., Diao, Y. L., Fang, P. H., Wang, J. J., Bo, P. ve Qian, F., 2016. Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway, World J Gastroenterol, 22,11, 3186-3195.
- Kwong, L. N. ve Dove, W. F., 2009. APC and its modifiers in colon cancer, Adv Exp Med Biol, 656, 85-106.
- Lansky, E. P. ve Newman, R. A., 2007. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer, J Ethnopharmacol, 109,2, 177-206.

- Lariviere, W. R. ve Melzack, R., 1996. The bee venom test: a new tonic-pain test, Pain, 66,2-3, 271-277.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers, Nature, 396,6712, 643-649.
- Leuschner, C. ve Hansel, W., 2004. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments, Curr Pharm Des, 10,19, 2299-2310.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S. ve Johnson, J. M., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs, Nature, 433,7027, 769-773.
- Liu, X., Chen, D., Xie, L. ve 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, J Pharm Pharmacol, 54,8, 1083-1089.
- Lu, J., Sharma, L. K. ve Bai, Y., 2009. Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis, Cell Res, 19,7, 802-815.
- Malhotra, V. ve Perry, M. C., 2003. Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window, Cancer Biol Ther, 2,4 Suppl 1, S2-4.
- Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P. J., Bunz, F. ve Hwang, P. M., 2006. p53 regulates mitochondrial respiration, Science, 312,5780, 1650-1653.
- McDonald, D., Carrero, G., Andrin, C., de Vries, G. ve Hendzel, M. J., 2006. Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations, J Cell Biol, 172,4, 541-552.
- Memon, A. A., Zoller, B., Hedelius, A., Wang, X., Stenman, E., Sundquist, J. ve Sundquist, K., 2017. Quantification of mitochondrial DNA copy number in suspected cancer patients by a well optimized ddPCR method, Biomol Detect Quantif, 13, 32-39.
- Minagar, A., Ragheb, J. ve Kelley, R. E., 2003. The Edwin Smith surgical papyrus: description and analysis of the earliest case of aphasia, J Med Biogr, 11,2, 114-117.
- Moga, M. A., Dimienescu, O. G., Arvatescu, C. A., Ifteni, P. ve Ples, L., 2018. Anticancer Activity of Toxins from Bee and Snake Venom-An Overview on Ovarian Cancer, Molecules, 23,3.
- Moon, D. O., Park, S. Y., Heo, M. S., Kim, K. C., Park, C., Ko, W. S., Choi, Y. H. ve Kim, G. Y., 2006. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and

- caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt, Int Immunopharmacol, 6,12, 1796-1807.
- Nagelkerke, A. ve Span, P. N., 2016. Staining Against Phospho-H2AX (gamma-H2AX) as a Marker for DNA Damage and Genomic Instability in Cancer Tissues and Cells, Adv Exp Med Biol, 899, 1-10.
- Nichols, H. J. ve Walker, J. E., 1923. Experimental Observations on the Prophylaxis and Treatment of Syphilis, J Exp Med, 37,4, 525-542.
- Offit, K., 2011. Personalized medicine: new genomics, old lessons, Hum Genet, 130,3-14.
- Oršolic, N., 2012. Bee venom in cancer therapy., Cancer Metastasis Rev. , 31, 173–194.
- Orsolich, N., Knezevic, A., Sver, L., Terzic, S., Hackenberger, B. K. ve Basic, I., 2003. Influence of honey bee products on transplantable murine tumours, Vet Comp Oncol, 1,4, 216-226.
- Oun, R., Moussa, Y. E. ve Wheate, N. J., 2018. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists, Dalton Trans, 47,19, 6645-6653.
- Park, M. H., Choi, M. S., Kwak, D. H., Oh, K. W., Yoon, D. Y., Han, S. B., Song, H. S., Song, M. J. ve Hong, J. T., 2011. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF-kappaB, Prostate, 71,8, 801-812.
- Pelengaris, S. a. K. M., 2006. The Molecular Biology of Cancer book.
- Putz, T., Ramoner, R., Gander, H., Rahm, A., Bartsch, G., Bernardo, K., Ramsay, S. ve Thurnher, M., 2007. Bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-homologues cooperatively disrupt membrane integrity, abrogate signal transduction and inhibit proliferation of renal cancer cells, Cancer Immunol Immunother, 56,5, 627-640.
- Redon, C. E., Dickey, J. S., Bonner, W. M. ve Sedelnikova, O. A., 2009. gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin, Adv Space Res, 43,8, 1171-1178.
- Roukos, D. H., 2009. Genome-wide association studies: how predictable is a person's cancer risk?, Expert Rev Anticancer Ther, 9,4, 389-392.
- Rybak, L. P., Mukherjea, D., Jajoo, S. ve Ramkumar, V., 2009. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies, Tohoku J Exp Med, 219,3, 177-186.



- Schaue, D. ve McBride, W. H., 2015. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer, Nat Rev Clin Oncol, 12,9, 527-540.
- Schmid, T. E., Zlobinskaya, O. ve Multhoff, G., 2012. Differences in Phosphorylated Histone H2AX Foci Formation and Removal of Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation, Curr Genomics, 13,6, 418-425.
- Schmidt, F., Knobbe, C. B., Frank, B., Wolburg, H. ve Weller, M., 2008. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines, Oncol Rep, 19,4, 1061-1066.
- Schoenenberger, C. A., Buchmeier, S., Boerries, M., Sutterlin, R., Aebi, U. ve Jockusch, B. M., 2005. Conformation-specific antibodies reveal distinct actin structures in the nucleus and the cytoplasm, J Struct Biol, 152,3, 157-168.
- Schrank, B. R., Aparicio, T., Li, Y. Y., Chang, W., Chait, B. T., Gunderson, G. G., Gottesman, M. E. ve Gautier, J., 2018. Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair, Nature, 559,7712, 61-+.
- Schroth, W., Goetz, M. P., Hamann, U., Fasching, P. A., Schmidt, M., Winter, S., Fritz, P., Simon, W., Suman, V. J., Ames, M. M., Safgren, S. L., Kuffel, M. J., Ulmer, H. U., Bolander, J., Strick, R., Beckmann, M. W., Koelbl, H., Weinshilboum, R. M., Ingle, J. N., Eichelbaum, M., Schwab, M. ve Brauch, H., 2009. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen, JAMA, 302,13, 1429-1436.
- Shammas, M. A., Neri, P., Koley, H., Batchu, R. B., Bertheau, R. C., Munshi, V., Prabhala, R., Fulciniti, M., Tai, Y. T., Treon, S. P., Goyal, R. K., Anderson, K. C. ve Munshi, N. C., 2006. Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: biologic activity and therapeutic implications, Blood, 108,8, 2804-2810.
- Shankar, S., Siddiqui, I. ve Srivastava, R. K., 2007. Molecular mechanisms of resveratrol (3,4,5-trihydroxy-trans-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgen-insensitive prostate cancer cells, Mol Cell Biochem, 304,1-2, 273-285.
- Shankar, S. ve Srivastava, R. K., 2007. Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer, Int J Oncol, 30,4, 905-918.
- Sherr, C. J. ve Weber, J. D., 2000. The ARF/p53 pathway, Curr Opin Genet Dev, 10,1, 94-99.

- Shiassi Arani, F., Karimzadeh, L., Ghafouri, S. M. ve Nabiuni, M., 2019. Antimutagenic and Synergistic Cytotoxic Effect of Cisplatin and Honey Bee Venom on 4T1 Invasive Mammary Carcinoma Cell Line, Adv Pharmacol Sci, 2019, 7581318.
- Singh, B. N., Shankar, S. ve Srivastava, R. K., 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications, Biochem Pharmacol, 82,12, 1807-1821.
- Singh, S. ve Aggarwal, B. B., 1995. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected], J Biol Chem, 270,42, 24995-25000.
- Sisakht M, 2017. Bee venom induces apoptosis and suppresses matrix 824 metaloprotease-2 expression in human glioblastoma cells.
- Slaninova, J., MLsova, V., Kroupova, H., Alan, L., Tumova, T., Monincova, L., Borovickova, L., Fucik, V. ve Cerovsky, V., 2012. Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells, Peptides, 33,1, 18-26.
- Sobotka, A. K., Franklin, R. M., Adkinson, N. F., Jr., Valentine, M., Baer, H. ve Lichtenstein, L. M., 1976. Allergy to insect stings. II. Phospholipase A: the major allergen in honeybee venom, J Allergy Clin Immunol, 57,1, 29-40.
- Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. K. ve Hong, J. T., 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds, Pharmacol Ther, 115,2, 246-270.
- Song, J. I. ve Dumais, M. R., 1991. From yew to us: the curious development of taxol, JAMA, 266,9, 1281.
- Stricker, T., Catenacci, D. V. ve Seiwert, T. Y., 2011. Molecular profiling of cancer--the future of personalized cancer medicine: a primer on cancer biology and the tools necessary to bring molecular testing to the clinic, Semin Oncol, 38,2, 173-185.
- Subotic, S. W., S; Bachmann, A . , 2012. "Surgical treatment of localised renal cancer". European Urology Supplements, 11, 3,60-65.
- Thakur, V. S., Ruhul Amin, A. R., Paul, R. K., Gupta, K., Hastak, K., Agarwal, M. K., Jackson, M. W., Wald, D. N., Mukhtar, H. ve Agarwal, M. L., 2010. p53-Dependent p21-mediated growth arrest pre-empts and protects HCT116 cells from PUMA-mediated apoptosis induced by EGCG, Cancer Lett, 296,2, 225-232.
- The American Society of Health-System Pharmacists, 2016.
- Tian, B., Wang, Z., Zhao, Y., Wang, D., Li, Y., Ma, L., Li, X., Li, J., Xiao, N., Tian, J. ve Rodriguez, R., 2008. Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model, Cancer Lett, 264,2, 299-308.

- Tu, W. C., Wu, C. C., Hsieh, H. L., Chen, C. Y. ve Hsu, S. L., 2008. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells, Toxicon, 52,2, 318-329.
- Uddin, M. B., Lee, B. H., Nikapitiya, C., Kim, J. H., Kim, T. H., Lee, H. C., Kim, C. G., Lee, J. S. ve Kim, C. J., 2016. Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo, J Microbiol, 54,12, 853-866.
- Wang, X. J., vd., 2017. Melittin inhibits tumor growth and decreases resistance to gemcitabine by downregulating cholesterol pathway gene CLU in pancreatic ductal adenocarcinoma. , Cancer Letters, 399, p. 1-9.
- Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., El Obeid, D., Sabatier, J. M. ve Fajloun, Z., 2019. Bee Venom: Overview of Main Compounds and Bioactivities for Therapeutic Interests, Molecules, 24,16.
- Weinstein, I. B. ve Joe, A. K., 2006. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy, Nat Clin Pract Oncol, 3,8, 448-457.
- Weiss, R. B. ve Christian, M. C., 1993. New cisplatin analogues in development. A review, Drugs, 46,3, 360-377.
- Wen SJ, 2013. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach.
- World Health Organization, April 2015.
- Wyld, L., Audisio, R. A. ve Poston, G. J., 2015. The evolution of cancer surgery and future perspectives, Nat Rev Clin Oncol, 12,2, 115-124.
- Yang, Z. L., Ke, Y. Q., Xu, R. X. ve Peng, P., 2007. [Melittin inhibits proliferation and induces apoptosis of malignant human glioma cells], Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 27,11, 1775-1777.
- Yoon, J., Jeon, J. H., Lee, Y. W., Cho, C. K., Kwon, K. R., Shin, J. E., Sagar, S., Wong, R. ve Yoo, H. S., 2012. Sweet bee venom pharmacopuncture for chemotherapy-induced peripheral neuropathy, J Acupunct Meridian Stud, 5,4, 156-165.
- Zheng, J., Lee, H. L., Ham, Y. W., Song, H. S., Song, M. J. ve Hong, J. T., 2015. Anti-cancer effect of bee venom on colon cancer cell growth by activation of death receptors and inhibition of nuclear factor kappa B, Oncotarget, 6,42, 44437-44451.

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Bitlis 'in Tatvan ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Tatvan Yatılı İlköğretim Bölge Okulu 'nda, liseyi Tatvan Anadolu Lisesi 'nde tamamlamıştır. 2011 yılında İnönü Üniversitesi, Fen Fakültesi, %100 İngilizce eğitim veren Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans öğrenimine başlamış ve bu öğrenimini 2017 yılının Ağustos ayında bitirmiştir. Aynı yılın Eylül ayında başladığı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü bünyesindeki Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimine bir öğretim dönemi devam ettikten sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı 'na yatay geçiş ile transfer olmuştur. Yüksek lisans eğitimine hala Karadeniz Teknik Üniversitesi 'nde devam etmektedir. Arı zehrinin kanser hücreleri üzerindeki moleküler ve sitotoksik çalışmalarına devam etmektedir. Doğa, gezi ve sporla ilgilenmektedir. Yabancı dili İngilizce'dir.