

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ARI ZEHRİNİN METASTATİK MEME KANSERİNDE METASTAZ
BASKILAYICI AJAN OLABİLME POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nur Sena SİVRİ

HAZİRAN 2024

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ARI ZEHRİNİN METASTATİK MEME KANSERİNDE METASTAZ
BASKILAYICI AJAN OLABİLME POTANSİYALİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nur Sena SİVRİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21 / 05 / 2024

Tezin Savunma Tarihi : 07 / 06 / 2024

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Selcen ÇELİK UZUNER

Trabzon 2024

ÖNSÖZ

“Arı Zehrinin Metastatik Meme Kanserinde Metastaz Baskılayıcı Ajan Olabilme Potansiyelinin Değerlendirilmesi” isimli bu tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programında hazırlanmıştır. Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Tez çalışmam boyunca hiçbir desteğini ve bilgisini esirgemeyen, her zaman yanımda olduğunu hissettiren hocam Sayın Doç. Dr. Selcen ÇELİK UZUNER’e teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmam boyunca aralarında bulunmaktan büyük zevk aldığım Memeli Hücre Kültürü Laboratuvarında bulunan tüm hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma, Sinan TETİKOĞLU ve Elif AYAZOĞLU hocalarıma, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ndeki tüm değerli hocalarıma teker teker teşekkürü borç bilirim.

Moleküler Biyoloji ve Genetik serüvenine katıldığım 2017 yılından beri her zaman her kararında yanımda durarak beni destekleyen, ruhumu ve bedenimi büyüten sevgili annem Nuray SİVRİ, karakterimi ve varlığımı inşa eden sevgili babam Mustafa SİVRİ ve tüm sürecimde destekçi her kararında arkamda duran hayat arkadaşım Emre DEĞİRMENCİ’ye sonsuz teşekkür ve minnetimi sunarım

Bu tez çalışmasının bundan sonraki çalışmalara katkı sağlamasını temenni ederim.

Nur Sena SİVRİ

Trabzon 2024

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek lisans Tezi olarak sunduğum “Arı Zehrinin Metastatik Meme Kanseri Metastaz Baskılayıcı Ajan Olabilme Potansiyelinin Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Selcen ÇELİK UZUNER’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri 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. 07/06/2024

Nur Sena SİVRİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Arı Zehri ve Melittin	2
1.2. Melittin Anti-Kanser Etkisi	5
1.3. Tezin Amacı ve Hipotezi.....	6
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Hücre Kültürü.....	7
2.1.1. Hücrelerin Dondurulması ve Stoklanması	7
2.1.2. Hücrelerin Çözünmesi.....	7
2.1.3. Yara İyileşmesi (Wound Healing) Deneyi.....	7
2.2. Arı Zehri Muamelesi	8
2.3. Melittin Muamelesi	8
2.4. Sisplatin Muamelesi	9
2.5. SPSS Analizi	9
2.6. Belirlenen Konsantrasyonda Ajanların Hücre Kültürüne Muamelesi.....	9
2.7. Total RNA İzolasyonu.....	10
2.7.1. cDNA Sentezi	11
2.8. Primer Dizaynı	11
2.9. Gen Ekspresyon Analizi.....	12
2.10. Membran Potansiyelinin Belirlenmesi	13
3. BULGULAR.....	14
3.1. Yara İyileştirme (Wound Healing) Deneyleri	14
3.2. Yara Alanlarının Ölçülmesi ve SPSS Analizi	20
3.3. Total RNA İzolasyonu.....	31

3.4. Gen Ekspresyon Analizi.....	32
3.5. Membran Potansiyelinin Belirlenmesi	37
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	39
5. ÖNERİLER.....	42
6. KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	



ÖZET

ARI ZEHRİNİN METASTATİK MEME KANSERİNDE METASTAZ BASKILAYICI AJAN OLABİLME POTANSİYALİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nur Sena SİVRİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Selcen ÇELİK UZUNER
2024, 59 Sayfa

Arı zehri, birçok hastalığın tedavisinde kullanılma kapasitesi olan doğal bir bileşiktir. Örneğin, kanser tedavilerinde kullanılabilecek sitotoksik özelliği olduğu bilinmektedir. Ancak kanserin tedavi sürecinde sadece sitotoksitenin hedeflenmesi yetersiz kalmaktadır. Arı zehrinin farklı kanserlerde metastazı engelleme kapasite üzerine bilgi olmakla birlikte meme kanseri hücrelerinde arı zehrinin ve arı zehri bileşeni olan melittin peptitinin metastaz baskılayıcı fonksiyonu olan *BRMS1*, *KAI1/CD82*, *DRG1* genlerinin ifadesi üzerine etkisi açısından bir bulgu yoktur.

Bu tezde, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında arı zehri, melittin ve sisplatin muamelelerinden sonra üç anti-metastatik genin (*BRMS1*, *KAI1/CD82* ve *DRG1*) ve bu hücrede spesifik marker olan iki pro-metastatik genin (*EGFR* ve *WNT7B*) ekspresyon seviyelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Kontrol olarak normal meme dokusundan elde edilen MCF10A hücreleri kullanılmıştır. Her üç ajan için ilk önce yara iyileştirme deneyi yapılarak, her bir ajandan sonra MDA-MB-231 hücrelerinde açılan yaranın kapanmadığı en anlamlı şartlar istatistiksel analizler ile belirlenmiştir. Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi araştırma projesi tarafından (Proje kodu: FBA-2021-9803) desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: arı zehri, melittin, kanser, metastaz

Master Thesis

SUMMARY

EVALUATION OF THE POTENTIAL OF BEE VENOM AS A METASTASIS SUPPRESSOR AGENT IN METASTATIC BREAST CANCER

Nur Sena SİVRİ

Karadeniz Technical University
Department of Molecular Biology and Genetics
Advisor: Assoc. Dr. Selcen ÇELİK UZUNER
2024, 59 Pages

Bee venom is a natural compound that has the capacity to be used in the treatment of many diseases. For example, it is known to have cytotoxic properties that can be used in cancer treatments. However, targeting only cytotoxicity in the cancer treatment process is insufficient. Although there is information on the capacity of bee venom to prevent metastasis in different cancers, there is no evidence regarding the effect of bee venom and melittin peptide, a component of bee venom, on the expression of *BRMS1*, *KAI1/CD82*, *DRG1* genes, which have metastasis suppressor functions, in breast cancer cells.

In this thesis, we investigated the expression of three anti-metastatic genes (*BRMS1*, *KAI1/CD82* and *DRG1*) and two pro-metastatic genes (EGFR and WNT7B), which are specific markers in this cell, after bee venom, melittin and cisplatin treatments in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. It was aimed to determine the expression levels. MCF10A cells obtained from normal breast tissue were used as a control. First, a wound healing experiment was performed for all three agents, and the most significant conditions in which the wound opened in MDA-MB-231 cells did not close after each agent were determined by statistical analysis. This thesis study was supported by the Karadeniz Technical University research project (Project code: FBA-2021-9803).

Key Words: bee venom, melittin, cancer, metastasis

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Melittinin anti-inflamatuar etkisi (Lee ve Bae, 2016).....	5
Şekil 2. ABT 2X qPCR EVA-GREEN MASTER-MIX (with ROX) qPCR kitinde belirtilen qPCR döngü basamakları	13
Şekil 3. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MDA-MB-231 hücreleri üzerinde arı zehri ajanının 0,6,24,30, 48 ve 72. saatlerdeki arı zehri muamele dozuna (0, 1, 2, 4, 8 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü.....	15
Şekil 4. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MDA-MB-231 hücreleri üzerinde melittin ajanının 0,6,24,30, 48, 54 ve 72. saatlerdeki muamele dozuna (0; 0,5; 1; 1,5; 2 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü.....	16
Şekil 5. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MDA-MB231 hücreleri üzerinde sispaltin ajanının 0,6,24,30, 48 ve 72 saatlerdeki muamele dozuna (0, 1, 2, 4, 8 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü.....	17
Şekil 6. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MCF10A hücreleri üzerinde arı zehri ajanının 0,6,24,30 ve 48. saatlerdeki muamele dozuna (0, 1, 2, 4, 8 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü.....	18
Şekil 7. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MCF10A hücreleri üzerinde melittin ajanının 0,6,24,30 ve 48. saatlerdeki muamele dozuna (0; 0,5; 1; 1,5; 2 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü	19
Şekil 8. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MCF10A hücreleri üzerinde melittin ajanının 0,6,24,30 ve 48. saatlerdeki muamele dozuna (0, 1, 2, 4 ve 8 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü	20
Şekil 9. Yara oluşturulan hücreler üzerinde arı zehri (4 µg/ml) muamelesinden sonra A, 0.saat B, 24.saat sonra ImageJ programında alanların matematiksel ölçüm örneği.....	21
Şekil 10. MDA-MB-231 yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0, 1, 2 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarında arı zehri muamelesinin 0, 6, 24, 30, 48, 72 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği.....	22
Şekil 11. MDA-MB-231 yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0; 0,5; 1; 1,5 ve 2 µg/ml konsantrasyonlarında melittin muamelesinin 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği.....	23
Şekil 12. MDA-MB-231 yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0, 1, 2 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarında sispaltin muamelesinin 0, 6, 24, 48, 54, 72 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği.....	24

Şekil 13. MDA-MB231 hücre hattı; arı zehri, melittin ve sisplatin muamelesi sonucu SPSS analizi istatistiksel verileri.....	25
Şekil 14. MCF10A yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0, 1, 2, 4 ve 8 µg/ml konsantrasyonlarında arı zehri muamelesinin 0, 6, 24, 30, 48 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği.....	26
Şekil 15. MCF10A yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0; 0,5; 1; 1,5 ve 2 µg/ml konsantrasyonlarında melittin muamelesinin 0, 6, 24, 30, 48 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği.....	27
Şekil 16. MCF10A yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0, 1, 2, 4 ve 8 µg/ml konsantrasyonlarında sisplatin muamelesinin 0, 6, 24, 30 ve 48. saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği.....	28
Şekil 17. MCF10A hücre hattı; arı zehri, melittin ve sisplatin muamelesi sonucu SPSS analizi istatistiksel verileri.....	29
Şekil 18. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattının belirlenen konsantrasyon ve sürede kontrole kıyasla değişimi	31
Şekil 19. Wound healing analizi için hücrelerin ekildiği qPCR 96 well-plate düzeneği.....	33
Şekil 20. MDA-MB-231 hücre hattına arı zehri, melittin ve sisplatin muamelesinden sonra sırasıyla EGFR, CD82, DRG1, WNT7B, BRMS1 genlerinin ekspresyon seviyeleri qPCR sonuçları	35
Şekil 21. MCF10-A hücre hattına arı zehri, melittin ve sisplatin muamelesinden sonra sırasıyla EGFR, CD82, DRG1, WNT7B, BRMS1 genlerinin ekspresyon seviyeleri qPCR sonuçları.....	37
Şekil 22. Akım sitometrisi ile MDA-MB231 ve MCF10A hücrelerinin ajanlar muamelesi sonucu belirlenen mitokondriyal membran geçirgenliği grafikleri	38

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Ekspresyon seviyesi analiz edilen 5 gen için forward ve reverse primer tasarımları	12
Tablo 2. Her bir ajan muamelesi sonucunda istatistiksel analizlerde en anlamlı çıkan yaranın kapanmadığı (yani metastatik etkinin engellendiği) şartlar	30
Tablo 3. İzole edilen RNA'ların saflığının nanodrop sonuçları	32



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat
$\pm SE$	: Standart Hata
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
CO ₂	: Karbondioksit
BV	: Bee Venom (Arı Zehri)
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)
QPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction

1. GENEL BİLGİLER

Arı zehri dişi bal arısı olan *Apis mellifera*'nın karın boşluğundan salgılanan bez tarafından üretilir. Renksiz ve acı bir sıvı olan arı zehri içerisinde diğer hayvan zehir içeriklerine benzer şekilde protein, peptit ve enzim yapılarından oluşur, ancak bileşimi çok daha karmaşıktır. %80 su içeren arı zehri içerisinde; melittin ve izoformları, apamin, MCD (Mast Hücrelerini parçalayan peptid), sekapin, adolapin, PLA2 ve hiyolarinaz enzimleri bulunmaktadır. Tüm kompozitler içerisinde arı zehrinde diğerlerinden daha bol miktarda melittin ve fosfolipaz A2 (PLA2) bulunmaktadır.

Melittin kuru ağırlığın yaklaşık %60'ını oluşturan önemli klinik ve terapötik aktivitelere sahip bir peptittir. Terapötik etkilerinin yanı sıra arı zehrinin en toksik bileşimidir. Melittin amfipatik olduğu için suda çözünebilir durumdadır. Hidrofilik olan karboksil ucu litik etkiden sorumluyken hidrofobik amino terminali litik aktivite göstermez. Litik aktivitesi sayesinde fosfolipit gibi tabakalarda zar yüzeyine monomer olarak bağlanarak konsantrasyonuna bağlı kalıcı veya geçici gözenekler oluşturabilir (Lee vb., 2013).

Melittinden sonra arı zehrinin yaklaşık %12'sini oluşturan PLA2 enzimi biyolojik aktiviteleri daha fazla olan ikinci bileşiktir. Bununla beraber bu enzim, alerjik hastaların %57-97'sinde en çok alerjik hassasiyet oluşturan içeriktir. Arı zehri içerisinde daha az varlığa sahip olup yine de önemli biyolojik aktiviteler gösteren bileşenlerden 18 aa uzunluğunda nörotoksik bir bileşik olan apamin, Ca^{+2} ile aktive olan potasyum kanallarını bloke etme kapasitesine sahiptir. MCD, 22 aa içeren güçlü anti-inflamatuar aktiviteye sahipken serapin anti-fibrinolitik, anti-elastolitik (elastik doku parçalanmasını engelleyen) ve anti-mikrobiyal özellik göstermektedir. Hyalorinaz enzimi ise diğer tüm arı zehri faktörlerinin hücreye nüfuz etmesine yardımcı olan faktör olarak işlev göstermektedir. (Carpena vb., 2020).

Apiterapi, bir çok hastalığın tedavisinde bal arısı ürünlerinin en çok arı zehrinin kullanımına dayanan alternatif bir terapidir (Khalil vb., 2021). Bal arısı *Apis mellifera*'dan izole edilen arı zehri ağırlı bir tedavi yöntemi olarak antik çağlarda kullanılmaya başlanmıştır. MÖ 500. Yıllara dayanan Çince kaynaklı kitaplarda arı sokmasının tedavi etkilerine yer verildiği görülmektedir.

Antik Yunan doktoru olarak bilinen Hipokrat arı zehrini terapötik amaçlar için kullanmış ve iyileştirici özelliğini tam belirleyemediği için gizemli anlamına gelen ‘Arcanum’ olarak tanımlamıştır. Arı zehrinin modern apiterapide kullanımı Avusturyalı Doktor Philip Terc’in 1888’de yayımladığı ‘Arı sokmaları ve Romatizma Arasında Bağlantı Raporu’ sonuçları ile başlamıştır. Avrupa’da ilk ticari arı zehri preparatı 1928’de piyasaya sürülmüştür (Bogdanov, 2016).

1.1. Arı Zehri ve Melittin

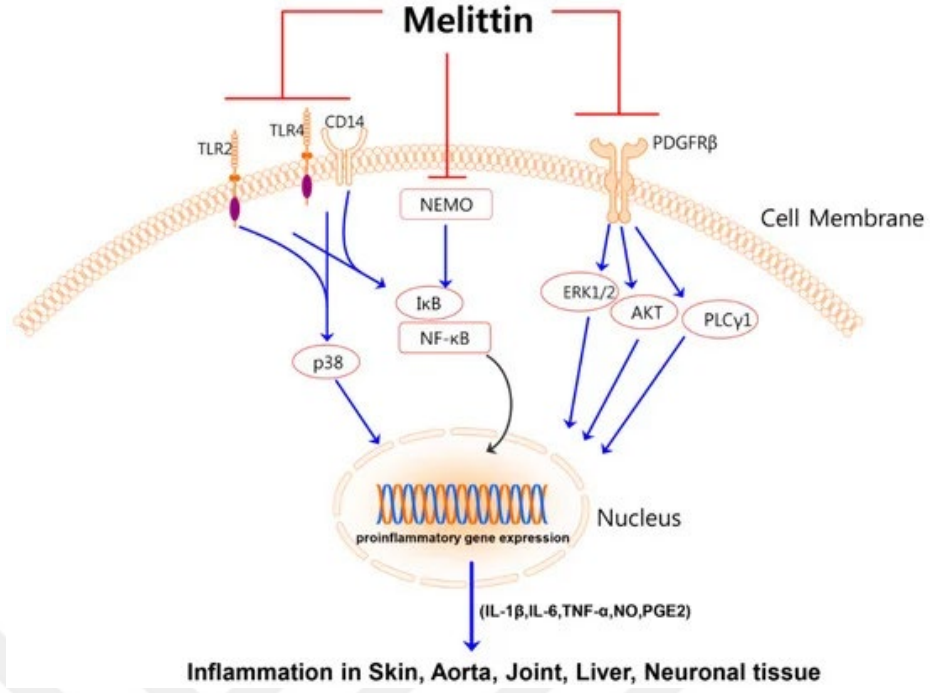
Günümüzde çoğu hastalık tedavisinde kullanılan farmasötik ilaçların hastalığı iyileştirmenin yanı sıra olumsuz birçok etkisi oluşmaktadır. Bu etkiler arasında ilaçların yan etkileri ve ilaç direnci en başta sayılabilir. Ayrıca ilaç olarak kullanılan sentetik kimyasal maddeler *in vivo* çalışmalarda sistemik olarak farklı etkiler yapabileceğinden *in vitro* çalışmalarla benzer sonuçlar vermeyebilir. Sentetik bileşiklere alternatif olarak doğal olarak bulunan maddelerin kullanımı gündeme gelmektedir. Alternatif veya tamamlayıcı tıp; sağlığın korunmasında inanç, teori, kültür, deneyim ve beceriye dayalı yöntemlerin kullanıldığı doğal bir tedavi türüdür. Akupunktur, homeopati, ozon tedavisi, oksijen tedavisi, mezoterapi gibi birçok alternatif tıp tedavilerinin yanı sıra sağlığın korunması ve iyileştirilmesinde apiterapide kullanılmaktadır.

Apiterapi, hastalıkların önlenmesi veya var olan hastalıkların tedavisi amacıyla arı ürünlerinin kullanımını kapsayan geniş bir terimdir. Bal, propolis, arı sütü ve arı zehri gibi birçok arı bileşeni apiterapide kullanılmaktadır (Weis vb., 2022). Arı zehri MÖ’den bugüne doğu geleneklerinde hastalık tedavisinde kullanılmaktadır. Bal arısı *Apis mellifera* tarafından üretilen arı zehri oda sıcaklığında kuruyan, suda çözünebilirken alkolde çözünemeyen şeffaf, kokusuz bir sıvıdır. Göz veya mukoza ile temas halinde tahrişe neden olan bazik yapıdadır. Zengin protein, enzim ve peptit içeriğine sahiptir (Ali, 2012). Arı zehri içerisinde %80 oranında su olmasının yanı sıra melittin, apamin, adolapin, mast hücrele degranülasyonu peptidi (MAD), fosfolipazlar, hiyalüronidaz ve birçok aktif amin formları bulunmaktadır. Arı zehri içerisinde bulunan bileşiklerden apamin nörotoksindir ve anti-inflamatuvar ve analjezik özellik sergilemektedir, kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi bulunur. Adolpin, analjezik etki

göstermektedir ve PLA2 aktivitesinin inhibisyonundan sorumludur (Shkenderov ve Koburova, 1982). MCD peptiti anti-inflamatuardır ve lokal bağışıklık sisteminin oluşturulmasında kullanılan histamin nörotransmitterinin salınımında destekleyicidir vb., 2003). Fosfolipazlar hücre zarlarını parçalayan enzimlerdir olup hücre pıhtılaşmasını engellerler ve kan basıncını düşürürler. Arı zehri içindeki bileşenlerin aktiviteleriyle birlikte ele alındığında başta romatoid artrit, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve birçok kanser türünün tedavisinde klinik olarak incelenmiştir.

Arı zehri içerisinde bol miktarda bulunan melittin, kuru arı zehri içerisinde %60 ağırlığa sahip, 26 amino asit uzunluğunda, 2846.5 Da moleküler ağırlıkta, katyonik, lineer bir a-sarmal büyük bir polipeptittir. Amfipatiktir ve suda çözünür özelliğe sahiptir. Arı sokması sonucu oluşan ağrı ve kaşıntı oluşumuna sebebiyet veren peptit olarak katkıda bulunan güçlü bir anti-inflamatuar ajandır ve aynı zamanda vücutta kortizol üretimini indüklemektedir. Anti-bakteriyel ve anti-fungal etkilerinin yanı sıra melittin kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi gösterir ve PLA2 aktivasyonunu destekler (Chen vb., 2016). Melittinin spesifik olmayan sitotoksik aktivitesi bulunmaktadır. Melittin de bulunan hidrofobik bölümün pozitif yükü ile anyon lipid zarlarına çekilir ve hidrofobik etkileşimler yoluyla lipid zarına girer. Lipid zarında gerçekleşen eklenme ile membran dalgalanmaları meydana gelir. Melittinin bazı fosfolipitleri dışarı çekerek konumlarını değiştirmekle birlikte deforme olmuş bölgeler oluşturur. Sonuçta melittin agregasyonu ile fosfolipit zar üzerinde gözenekler oluşmaktadır. Biyolojik zarlara monomer halde bağlanarak gözenek oluşumunu indükleyen melittin, konsantrasyonuna bağlı olarak zar üzerinde kalıcı veya geçici porlar oluşturmaktadır. Nanomolar seviyesindeki küçük konsantrasyonlardaki melittin atomik yapıda iyonların biyolojik zardan geçmesine izin veren geçici gözenekler oluşturmaktadır. Daha fazla konsantrasyonda melittin, glikoz veya daha büyük moleküllerin hücre zarından geçişine imkân sağlayan stabil gözenekleri meydana getirmektedir. Normal konsantrasyonun daha üstünde uygulanan melittin hücre zarını parçalayan deterjan görevi görebilmektedir (Lee vb., 2013).

1982 yılında Terwilliger ve ark. melittinin zarda por oluşturma aktivitesi hakkında “kama ve kenar” etkisini savunmuşlardır. Kama şeklindeki melittin lipid zinciri ile etkileşime girdiğinde membran yüzeyine paralel uzayabilir ve böylece lipid membran yapısını bozarak çözünen maddelerin membran bariyerinden geçmesine izin verir (kama etkisi). Alternatif olarak melittin monomeri lipid membranı kenarına sıralanabilir ve kenar etkisi ile transmembran gözenekleri oluşturabilir (Terwilliger vb., 1982). Zarda bulunan düşük konsantrasyondaki melittin zara paralel uzanarak lipid tabakanın sitoplazmaya dönük tarafın alanını hücre kısmına dönük alana göre arttırır. Melittin konsantrasyonu arttıkça iki yüzey arasındaki alan dengesizliği melittin tarafından stabilize edilmek için gözenek oluşumuyla sonuçlanır. Giderek artan melittin konsantrasyonuna paralel olarak oluşan gözenek boyutu da artmaktadır. Böylece gözenekler birleşene kadar artar ve zarın parçalanmasını takiben hücre parçalanmasıyla sonuçlanır. Bu aktivasyon sayesinde melittin peptiti anti- inflamatuvar, anti-kanser, anti-mikrobiyal, anti-fungal ve hemolitik aktivite gibi bazı ilginç biyolojik aktiviteleri gerçekleştirme kapasitesindedir. Arı zehrinin anti-inflamatuar etkisi bileşeni olan melittine bağlanabilir. Melittin’in ayrıca akne vulgaris, nöro-iltihaplanma, karaciğer iltihabi ve ateroskleroza karşı anti-inflamatuar etkisi bildirilmiştir. Melittin toll benzeri reseptör olan *TLR2*, *TLR4*, doğal immün sistemi bileşenini kodlayan insan geni *CD14* gibi sinyal yollarını baskılayarak yolları inhibe eder. Böylece *p38*, *ERK1* ve *ERK2*, *AKT* ve *PLC1*’in aktivasyonunu azaltır böylece çekirdekte üretilecek öncü inflamatuvar gen ekspresyonu azaltılmış olur (G. Lee & Bae, 2016).



Şekil 1. Melittinin anti-inflamatuar etkisi (Lee ve Bae, 2016)

Melittin sadece memeli canlılarda kanserde değil virüs enfeksiyonlarıyla mücadelede de alternatif bir yol olarak değerlendirilmektedir. Yakın zamanda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara göre melittinin viral zarflar ile arasında etkileşim olabileceği ve bu yolla hücreler ile etkileşimde olabileceği öne sürülmüştür (Memariani vd., 2020). Aynı zamanda melittinin zarfsız RNA virüslerinde mRNA ekspresyon seviyesini azalttığı ve melittin inoküle edilen virüslerin %50'sinde sitopatik etki oluşturduğu belirlenmiştir (Uddin vb., 2016).

1.2. Melittin Anti-Kanser Etkisi

Literatüre bakıldığında melittinin insan yumurtalık kanseri hücrelerinde, SKOV3 ve PA-1'de ölüm reseptörü ifadelerinin artırılması yoluyla hücre büyümesini inhibe edip etmediği araştırıldığında ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu ve STAT3 yolunun aktivatörlerinin inaktivasyonunu artırarak kanser hücrelerinin büyümesini inhibe edebilir (Jo vd, 2012) olduğu sonucuna varılmıştır.

Melittinin kanser hücrelerinin oluşmasını engelleme kapasitesi de incelenmiştir. Kanser hücrelerinin oluşumunu engelleyerek metastaz ve anjijogenezi de azaltmaktadır. Karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri (LSEC'ler), iç organlardaki kanser hücrelerinin

metastazı için ortak bir bölge olan karaciğerin immünolojik toleransından sorumludur. Böylece LSEC'ler kanser immünoterapisi için hedef bölge olarak kabul edilebilir. Xiang ve ark. 2019'da karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinde (LSEC'ler) metastazı önlemek için melittin peptitini nanopartiküller ile sarmalayarak hedef spesifik hale getirdikten sonra *in vivo* kapasitesini incelemiş, nanopartikül halde bulunan melittinin LSEC'leri hedeflediğini ve modüle ettiğini göstermişlerdir. LSEC'lerin aktivasyonu ile birlikte hücresel aktivite karaciğer metastazını inhibe eden ve karaciğer kanserinin ortaya çıkma olasılığını azaltan bir immünolojik yanıtla sonuçlanmaktadır (Yu vd, 2019).

1.3. Tezin Amacı ve Hipotezi

Bu tezin amacı arı zehri ve arı zehri içerisinde bulunan melittinin tek başına metastatik meme kanseri hücrelerinde metastaz baskılayıcı özelliğinin olup olmadığını belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda metastaz baskılayıcı gen olarak *BRMS1*, *KAI/CD82*, *DRG1* genleri; metastatik aktiviteyi destekleyen bir mekanizma olan hücre göçünü indükleyen *EGFR* geni ve çalışılan metastatik meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerinde spesifik olarak aktivitesi artan *WNT7B* onkogeni seçilmiştir. Tez çalışmasının temel amacı, arı zehri ve melittin ile ayrı ayrı muamele edilen metastatik meme kanseri hücresi (MDA-MB231) ve karşılaştırmalı olarak sağlıklı epitel hücrelerinde (MCF10A) *BRMS1*, *KAI/CD82*, *DRG1*, *EGFR* ve *WNT7B* genlerinin ekspresyon seviyelerinde değişim olup olmadığının belirlenmesidir. Bunun yanında en yaygın kullanılan kanser ilacı olan sisplatin ile karşılaştırmanın yapılması da hedeflenmiştir. Bu sayede çalışmada ilgili genlerin ekspresyon sonuçlarını iki hücre tipinde karşılaştırarak arı zehri ve melittinin kanser hücrelerindeki anti-metastatik fonksiyonunun belirlenen genlere spesifik olup olmadığını belirlemeye çalışmaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında metastatik meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 (ATCC kodu CRM-HTB-26) ve epitel sağlıklı hücre olan MCF-10A (ATCC kodu CRL-10317) hücreleri kullanılmıştır. MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri için %89 RPMI içeren medya kullanıldı. Medya içeriği %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin (PS) ile zenginleştirildi. Medya bileşenleri 0.22 por aralığına sahip olan filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi. Hücre kültürleri medya içeriğine eklenerek %5 CO₂ içeren 37 derece etüvde inkübe edildi. Hücre çoğalmasını takiben 5-7 gün arayla tripsin ile muamele edilerek steril bir tüp içerisine hücreler toplandı ve pasajlandı. Her iki hücre içinde 230xg 5 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Tez çalışması boyunca MDA-MB-231 hücreleri pasaj 10 ve MCF10A hücreleri için pasaj 14 hazırlanan stokları kullanıldı.

2.1.1. Hücrelerin Dondurulması ve Stoklanması

Hücrelerin her ikisi de %10 DMSO, %69 RPMI, %20 FBS ve %1 PS içeren kültür medyasına eklenerek aşamalı olarak donduruldu. 24 saat -80°C’de kaldıktan sonra -196°C’de azot tankına alınarak tez boyunca kullanılmak üzere stoklandı.

2.1.2. Hücrelerin Çözünmesi

-196°C’den çıkarılan hücreler 37 °C’deki su banyosunda kapakları su üstünde kalacak şekilde çözünene kadar yaklaşık 2 dakika bırakıldı. Çözünen hücreler temiz medya içerisine aktarılarak santrifüj aşaması ile DMSO’dan uzaklaştırıldı.

2.1.3. Yara İyileşmesi (Wound Healing) Deneyi

MDA-MB-231 ve MCF10-A hücreleri 6 oyuklu plaka içerisine her plakada 2 ml medya içerisinde totalde 200.000 hücre bulanacak şekilde ekildi ve hücrelerin tüm plaka yüzeyini kaplayana kadar çoğalmaları için %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edildi. Plaka

yüzeyini kaplayan hücreler üzerine steril 200 µl pipet ucu yardımıyla tek yönlü yara oluşturuldu ve ajanlarla muamele edildi.

2.2. Arı Zehri Muamelesi

Arı zehri önceki çalışmalarda kullanılmak üzere laboratuvarında bulunan Türkiye Karadeniz bölgesi (Zonguldak) bal arılarından elde edilmiş stoktur. Arı zehrinin MDA-MB-231 hücrelerindeki IC50 değeri önceki çalışma kapsamında 8 µg/ml olarak hesaplanmıştı (Çelik Uzuner vd. 2021). Bu durumda hücre hareketinin durduğu konsantrasyonları (ancak hücrelerin çoğunun ölmediği bir konsantrasyon olduğundan emin olmak için) kullanmak için doz maksimum 8 µg/ml olacak şekilde deneyler planlanmıştır. Kontrol hücreleri olarak seçilen MCF10A hücrelerinde de aynı şartlar kullanılmıştır. Bu bilgi kapsamında arı zehrinin MDA-MB-231 meme kanseri hücresi ve MCF10A sağlıklı epitel hücresi üzerinde etkisinin belirlenmesi amacıyla en yüksek doz 8 µg/ml olacak şekilde 8, 4, 2, 1 ve 0 µg/ml arı zehri içeren besiyerleri kullanılmıştır. Yara oluşturulan hücrelerdeki yara açıklıkları ışık mikroskobu altında 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 96 saat boyunca (herhangi bir konsantrasyon grubunda yara açıklığı kapanana kadar) mikroskop görüntüleri çekilerek yara alanları ImageJ programında hesaplanmıştır.

2.3. Melittin Muamelesi

Önceki çalışmalarımızda melittin deneyleri olmadığı için melittinin hücre hareketini engelleme kapasitesini belirlemeden önce IC50 değeri hesaplamak için Karadeniz Teknik Üniversitesi desteği ile gerçekleştirilen bir başka BAP projesi kapsamında (Proje Kodu: FYL-2019-8116) Sinan Tetikoğlu tarafından MTT sitotoksosite deneyi gerçekleştirmiştir. Sitotoksosite deney sonuçlarına göre Melittinin IC50 değeri MDA-MB-231 hücrelerinde 8.45 µg/uL olarak belirlenmiştir (arı zehrine benzer şekilde). Böylece hem MDA-MB-231 hücrelerinde hem de kontrol olan MCF10A hücrelerinde yara iyileşmesi deneyinin gerçekleştirilmesi amacıyla 2 µg/ml en yüksek doz olacak şekilde son konsantrasyonu 2, 1,5, 1, 0,5 ve 0 µg/ml melittin içeren besiyerleri kullanılmıştır. Yara oluşturulan hücrelerdeki yara açıklıkları ışık mikroskobu altında 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 96 saat boyunca (herhangi bir konsantrasyon grubunda yara açıklığı kapanana kadar) mikroskop görüntüleri çekilerek yara alanları ImageJ programında hesaplanmıştır.

2.4. Sisplatin Muamelesi

Sisplatinin MDA-MB-231 üzerindeki sitotoksik etkisi Sinan Tetikoğlu'nun yüksek lisans tezi kapsamında MTT testi ile analiz edilmiş, IC50 değeri 12 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu doz, arı zehri ve melittinin IC50 değerlerine yakın olduğu için, sisplatin muamelesi hem MDA-MB-231 hem de MCF10A hücreleri üzerinde yine en yüksek 8 µg/ml olacak şekilde son konsantrasyonu 8, 4, 2, 1 ve 0 µg/ml sisplatin içeren besiyerleri kullanılmıştır. Yara oluşturulan hücrelerdeki yara açıklıkları ışık mikroskobu altında 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 96 saat boyunca (herhangi bir konsantrasyon grubunda yara açıklığı kapanan kadar) fotoğraflanarak yara alanları ImageJ programında matematiksel olarak ölçülmüştür.

2.5. SPSS Analizi

ImageJ programı ile yara alanları belirlendikten sonra alan, doz ve zaman sonuçları excel dosyasında birleştirildi. SPSS programı ile UNIANOVA testi uygulandı. İstatistiksel olarak MDA-MB-231 hücresi için anti-metastatik etkinin en çok olduğu (oluşturulan yaraların muamele edilmemiş hücrelerle karşılaştırıldığında kapatılmadığı) doz ve zaman belirlendi. Kontrol grubu olarak belirlenen MCF10A hücre grubuna da MDA-MB-231 için belirlenen dozlar (arı zehri için 8, 4, 2, 1 µg/ml; melittin için 2, 1,5, 1, 0,5 µg/ml ve sisplatin için 8, 4, 2, 1 µg/ml konsantrasyonları) uygulandı. Tüm deneyler en az üç bağımsız tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.6. Belirlenen Konsantrasyonda Ajanların Hücre Kültürüne Muamelesi

Her iki hücre tipi içinde 60*15 petrilere ekim yapıldıktan sonra hücrelerin konfluent olması beklendi. Her ajan için 4 grup oluşturuldu ve bu gruplar 2 kontrol grubu 2 ajan muamelesi grubu olarak belirlendi. Deney grupları şu şekildedir:

1. Grup: yara oluşturulmuş ve ajan içeren medyalı;
2. Grup: yara oluşturulmamış ve ajan içeren medyalı;
3. Grup: yara oluşturulmuş ve ajan içermeyen medyalı;
4. Grup: yara oluşturulmamış ve ajan içermeyen medyalı.

Yara oluşturulan ve oluşturulmayan petriden izole edilecek cDNA ile gerçekleştirilecek qPCR’da belirlenen genlerin ekspresyon seviyelerinde farklılık oluşturup oluşturmayaçağının tespiti için ajan gruplarında birer petride yara oluşturulurken birer petride yara oluşturulmadı ve belirlenen konsantrasyonda ajanla muamele edildi. Kontrol grubunda ise herhangi bir ajan içermeyen medyalar eklendi ve gruplar SPSS analiz sonucuna göre belirlenen süre kadar %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı. Ardından hücreler tripsin ile muamele edilerek kaldırıldıktan sonra aynı hücre kültüründen RNA (cDNA sentezi ile gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi analizi için) izolasyonu yapılabilmesi için peletler ikiye bölünerek -20 derecede muhafaza edildi.

2.7. Total RNA İzolasyonu

Tez kapsamında belirlenen genlerin ekspresyon seviyesinin tespiti için total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. -20 derece bulunan peletler HİBRİGEN markasının ‘Genel RNA İzolasyon Kiti’ (Katalog numarası MG-RNA-01) kullanıldı. Kit içerisinde HY tamponu, RY1, RY2, DEPC uygulanmış su kitleri hazır bulunmaktadır.

Petrilere ekim yapılarak belirli doz ve sürede ajanlarla inkübe edilen hücreler RNA izolasyonu için tripsin ile muamele edilerek petri yüzeyinden kaldırıldı. Medya içerisinde süspanse halde bulunan hücreler santrifüj gerçekleştirilerek falkon tüpüne toplandı ve kirli medya uzaklaştırıldı. zerine HT tamponu eklenerek vortekslenen hücrelerin parçalanması ve RNA açığa çıkması sağlandı. Tekrar santrifüj yapılan hücrelerde gözle belirlenebilen 3 faz farkı ortaya çıkmaktadır. En üstte bulunan faz RNA içermektedir ve pipet yardımıyla RNaz içermeyen ependorflara geçirilir. Sođuk EtOH ile muamele edilen hücreler filtreli ependorflar alınarak santrifüj edilir ve filtenin altında kalan sıvı uzaklaştırılır. Filtre zerine RY1 tamponu eklenerek tekrar santrifüje bırakılır ve alt sıvı atılır. Filtre zerine RY2 tamponu eklenerek tekrar santrifüj edilir ve alt sıvı tekrar atılır. Filtre membranında bulunan RNA’lar zerine DEPC su ile muamele edilerek santrifüj gerçekleştirildiğinde filtreden tüpe akan sıvıda RNA’lar bulunmaktadır. Elde edilen RNA rneklerinin konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile ölçülerek RNA saflık miktarı A230/260 ve A260/280 değerleri belirlendi. -20 derecede muhafaza edildi.

2.7.1. cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA örnekleri çift zincirli cDNA'ya çevrilmek üzere 'A.B.T.TM cDNA Synthesis Kitwith RNase Inh. (High Capacity) Kiti' (Katalog numarası C03-01-05) kullanıldı. -20 derecede muhafaza edilen RNA örneklerinden cDNA elde edebilmek için kit içerisinde bulunan reaksiyon tamponu, dNTP mix, reverse transkriptaz, RNaz inhibitörleri ve random heksamerler RNA örneği ile PCR tüpünde birleştirildi. Ardından 25 °C'de 10 dakika; 37 °C'de 120 dakika; 85 °C'de 5 dakika adımlarını içeren PCR döngüsü hazırlanarak PCR cihazına yerleştirildi ve tek zincirli RNA örneklerinden çift zincir cDNA örnekleri elde edildi.

2.8. Primer Dizaynı

Her bir gen için forward ve reverse primer çiftleri 'Primer3' çevrimiçi aracı kullanılarak yaklaşık 20 baz olacak şekilde ve annealing sıcaklığı 59-60 derece olacak şekilde tasarlandı. Anti-metastatik genler BRMS1, DRG1 ve KAI1/CD82 genleri ve pro-metastatik olan EGFR ve WNT7B genlerinin primer tasarımı Primer3 çevrimiçi aracı kullanılarak yaklaşık 20 baz ve annealing sıcaklığı 59-60°C olacak şekilde Tablo 1'de belirtildiği dizilimlerle sentezletirildi. Primerler toz halde bulunmaktadır protokolünde belirtilen şekilde distile su ile çözüldükten sonra stok primerler 100 pM konsantrasyonda oluşturulmuştur. Kullanılacak qPCR protokolüne uygun olacak şekilde stok primerlerden 10pM seyreltik primer tüpleri distile su ile elde edildi. Böylece her QPCR döngüsü için primerler tek kullanımlık olarak -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 1. Ekspresyon seviyesi analiz edilen 5 gen için forward ve reverse primer tasarımları

Gene	Forward primer	Reverse primer	Tm
BRMS1 mRNA: NM_001024957.2	ATGGTGGGATGACAAACTGC	ACGATGTATGGGCCAGAAAC	Forward: 60.8 °C Reverse: 59.8°C
KAI1/CD82 mRNA: NM_001024844.2	TGAAAGTAGGGGGCTTTCTG	GTGGGGAGCATTTTTCTCTG	Forward: 59.3 °C Reverse: 59.7°C
DRG1 mRNA: NM_004147.4	ACAAAGGTGCCAAGATCCAG	TGCAATGACTTGACGACCTC	Forward: 60.1 °C Reverse: 59.8°C
EGFR mRNA: NM_001346897.2	TAACAAGCTCACGCAGTTGG	AAATTCCCAAGGACCACCTC	Forward: 60.0 °C Reverse: 60.2°C
WNT7B mRNA: NM_058238.3	CCTGGATCATGCACAGAAAC	TAGGCCAGGAATCTTGTTGC	Forward: 59.1 °C Reverse: 60.2°C

2.9. Gen Ekspresyon Analizi

cDNA eldesinden sonra deney gidişatına uygun olacağı düşünülerek sadece yara oluşturulan kontrol ve ajan grubu örneklerden gen ekspresyon seviyesine bakıldı. Belirlenen genlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi için cDNA örneklerinden gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ABT 2X qPCR EVA-GREEN MASTER-MIX (with ROX) (Katalog numarası Q02-02-02) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kit içerisinde belirtilen protokole uygun olarak bileşenler ve PCR döngüsü hazırlandı. Template olarak kullanılan cDNA örneklerine hazır alınan forward ve reverse primerleri eklendi. Ardından Şekil 2’de belirtilen kitin PCR reaksiyonu BIO-RAD CFX CONNECT qPCR cihazında kurularak başlatıldı.

PCR Step	Temp (°C)	Time	Cycle
Initial Denaturation	95	300 sec.	1
Denature	95	10 - 30 sec.	25 - 40
Anneal	55 - 68	10 - 60 sec.	
Melting Curve	65 - 95	2 - 5 sec. / step	1

Şekil 2. ABT 2X qPCR EVA-GREEN MASTER-MIX (with ROX) qPCR kitinde belirtilen qPCR döngü basamakları

2.10. Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

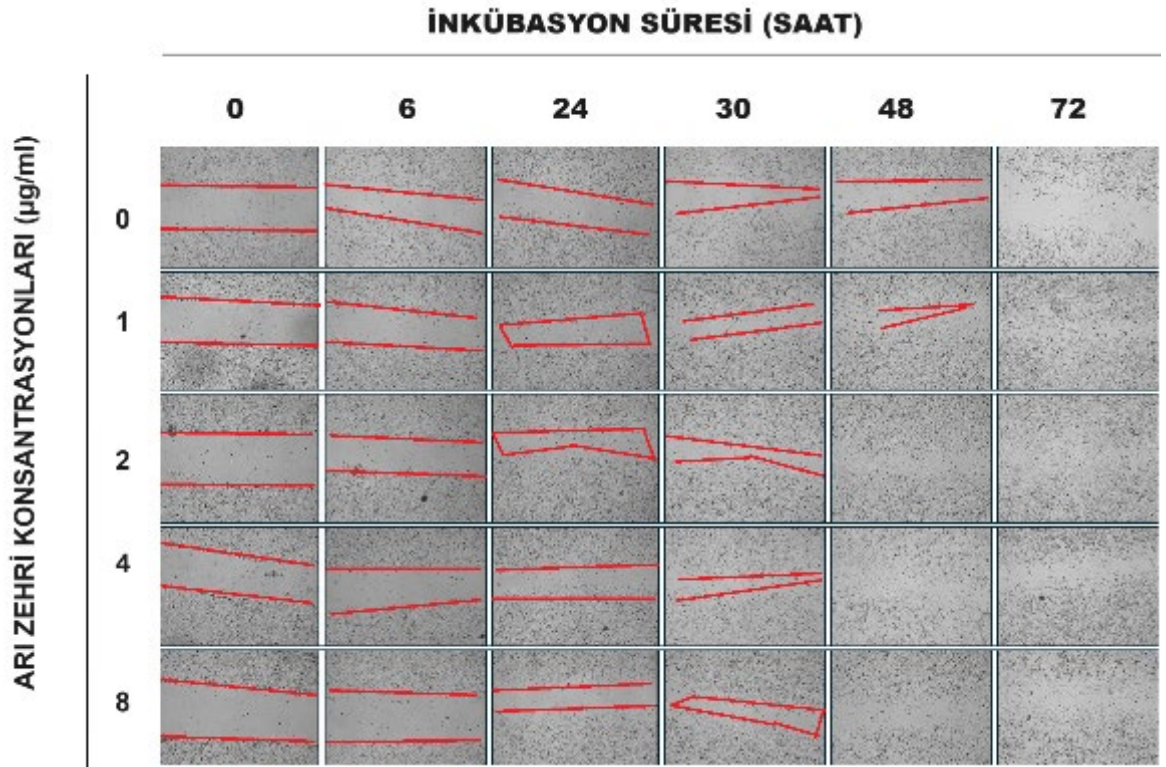
Melittin muamelesinin anti metastatik potansiyelini ile mitokondriyal membran profili arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek için wound healing ile seçilen doz ve sürelerde, hücrelerde yara oluşturularak ve oluşturmada melittin muamele edildi. Kontrol grubu sadece medya içeren hücrelerken bir de kemoterapötik ajan olan sisplatin muamelesinin membran ilişkisindeki etkisini göstermek amacıyla yara oluşturulan ve yara oluşturulmayan hücrelere sisplatin içeren medyalarla muamele edilen gruplar oluşturuldu. Mitotracker Red boyası ile membran potansiyeli belirlendi. Yara iyileşmesi sonuçları göz önüne alınarak 1 µg/ml konsantrasyon melittin ve 4 µg/ml konsantrasyonda sisplatin içeren medyalar hazırlandı. Hücreler flaska ekildikten ve konfluent olduktan sonra bir her ajan için bir gruba yara oluşturulup diğer grup yara oluşturulmadan ajanlar ve ajan içermeyen medya (kontrol grubu) ile muamele edilerek belirlenen süre olan 24 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi. 24 saat sonunda hücreler flasklardan toplanarak Mitotracker boya içeren medya ile boyandı. Protokol tamamlandıktan sonra membran potansiyelinin belirlenmesi amacıyla akım sitometrisi cihazında, FL3 kanalında örnekler okutuldu. Elde edilen floresan yoğunluğu değerleri analiz edildi.

3. BULGULAR

3.1. Yara İyileştirme (Wound Healing) Deneyleri

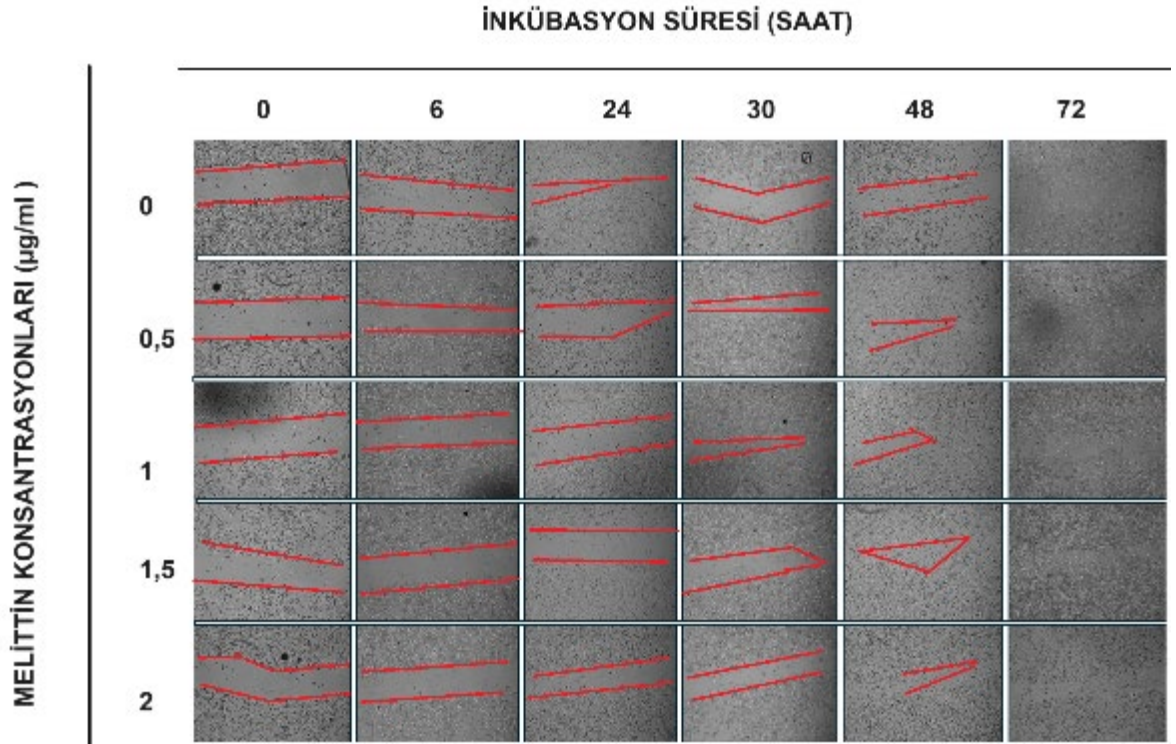
MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücresinin ajanlarla muamelesinden sonra anti-metastatik etkisinin belirlenmesi için meme kanseri hücresi MDA-MB-231 ve normal meme hücresi MCF10A flasklara ekildi ve konfluent olduktan sonra steril 100µl lik pipet ucu ve bir cetvel yardımıyla yara oluşturuldu. Bu sayede arı zehri, melitin ve sisplatin ajanları muamelesinden sonra yaranın kapanma doz ve sürelerinin belirlenme deney düzeneği oluşturulmuştur. Her 3 ajan içinde ayrı ayrı yara oluşturulduktan sonra ajanlarla muamele edilerek herhangi bir grupta açıklık kapanan kadar 0, 6, 24, 30, 48, 54 ve 72. saatlerinde ışık mikroskobu ile görüntülendi. MDA-MB-231 hücresinde ajanların metastatik etkilerinin yara iyileştirme deneyi arı zehri, melittin ve sisplatin ajanlarının mikroskop görüntüsü sırasıyla Şekil 3, 4 ve 5’ de gösterilmiştir.

Metastatik meme kanseri hücresi MDA-MB-231, yara oluşturulduktan sonra kontrol grubu (0 µg/ml), son konsantrasyonu 1, 2, 4 ve 8 µg/ml arı zehri bulunan medyalar ile muamele edildikten sonra 0, 6, 24, 30, 48 ve 72. saatlerde yara açıklığı ışık mikroskobu ile gözlemlendi. 48. saat ve sonrasında kontrol grubunda hücrelerin metastaz yaparak yaranın kapandığı, yaranın kontrol grubuna kıyasla kapanmadığı en verimli sürenin ise 24.saat olduğu belirlenmiştir. 24.saatte konsantrasyonlara bakıldığında 8 µg/ml arı zehri muamelesinden sonra hücre proliferasyonunda bozulmalar olduğu; kontrole oranla *in vitro* metastasın yavaş olduğu gözlenmiştir. Böylece yara açıklığının fazla olduğu aynı zamanda hücre proliferasyonunda bozulma olmayan doz 4 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3).



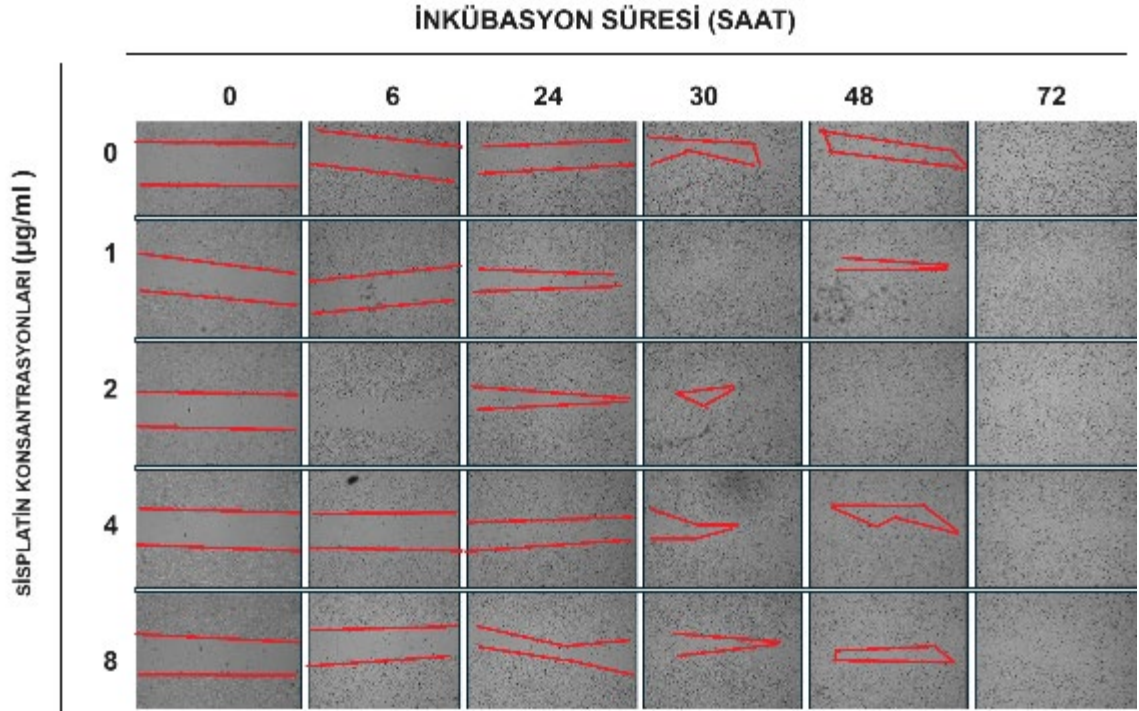
Şekil 3. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MDA-MB-231 hücreleri üzerinde arı zehri ajanının 0,6,24,30, 48 ve 72. saatlerdeki arı zehri muamele dozuna (0, 1, 2, 4, 8 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü

MDA-MB-231 hücrelerine arı zehri bileşeni olan melittin muamelesinin *in vitro* anti-metastatik etkisini belirlemek amacıyla konfluent haldeki hücrelere yara oluşturulmuş (hücre bulunmayan alan) ve sırasıyla kontrol grubu (0 µg/ml), son konsantrasyonu 0,5; 1; 1,5 ve 2 µg/ml melittin bulunan medyalar ile muamele edildikten sonra 0, 6, 24, 30, 48, 54 ve 72.saatlerde yara açıklığı ışık mikroskobu ile takip edildi. Melittin hücre proliferasyonunu arı zehrine oranla çok daha düşük konsantrasyonlarda değiştirmeye başladığı gözlemlendi. 30.saat ve sonrasında hücre ölümü başladığı gözlemlenmiş ve en verimli etkinin 24.saatte olduğu belirlendi. 24.saatte bakıldığında 1 ve 2 µg/ml dozların kontrole oranla yara açıklığını koruduğunu ancak 1 µg/ml doz melittin ile muamele edilen hücrelerin proliferasyonunun 2 µg/ml konsantrasyon melittin içeren medya ile 24 saat muamele edilen hücrelere göre daha uygun olduğu gözlemlenmiş ve bu sebeple MDA-MB-231 hücrelerinde melittin muamelesi yara kapanma deneyi için 24 saatte 1 µg/ml doz melittin muamelesi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).



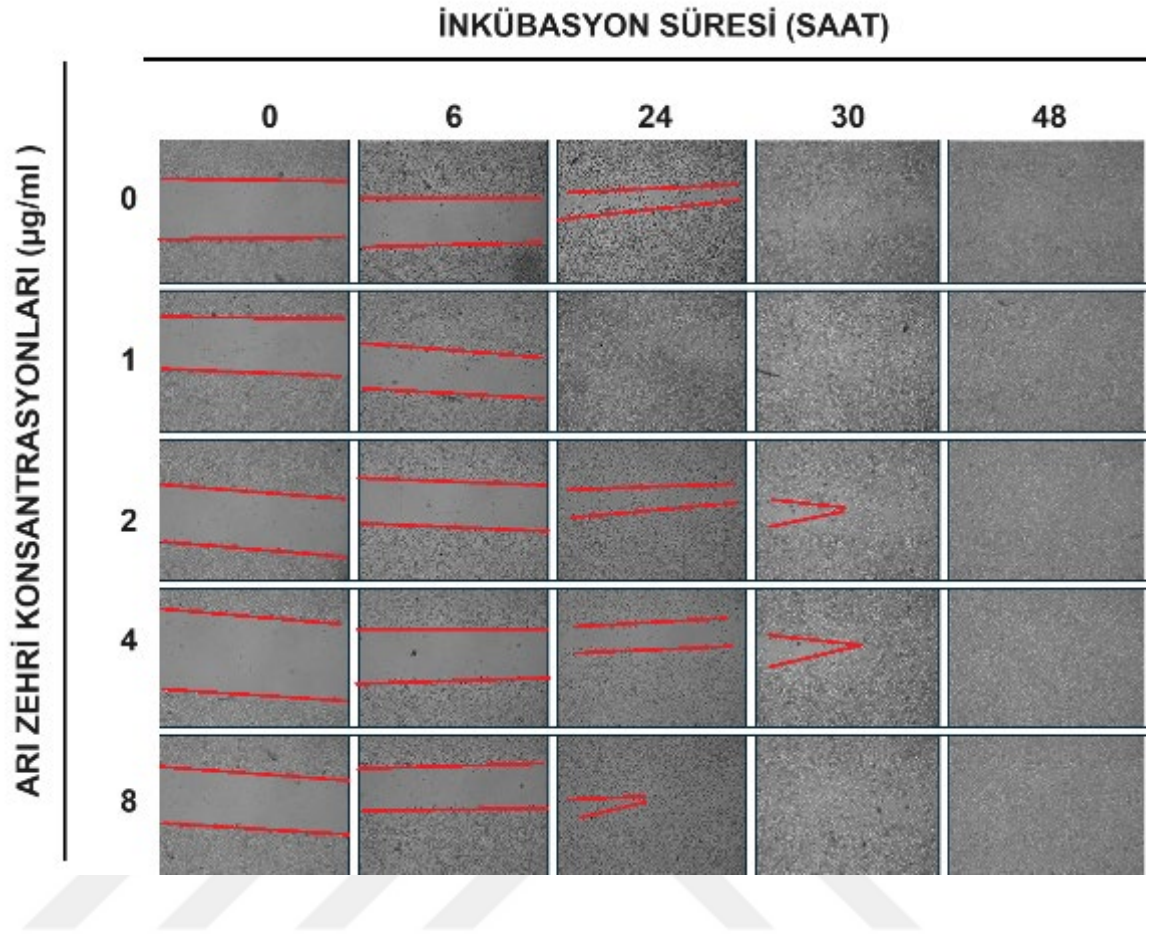
Şekil 4. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MDA-MB-231 hücreleri üzerinde melittin ajanının 0,6,24,30, 48, 54 ve 72. saatlerdeki muamele dozuna (0; 0,5; 1; 1,5; 2 $\mu\text{g/ml}$) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü

MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücrelerine bir kemoterapik ajan olan sisplatinin anti-metastatik etkisini belirlemek amacıyla, kontrol grubu (0 $\mu\text{g/ml}$), son konsantrasyonu 1, 2, 4 ve 8 $\mu\text{g/ml}$ sisplatin bulunan medyalar ile muamele edildikten sonra 0, 6, 24, 30, 48, 54 ve 72. saatlerde yara açıklığı ışık mikroskobu ile belirlendi. Sisplatin ile muamele edilen hücrelerde 48. saatten itibaren kontrol grubunda yara açıklığının kapandı sayılabilecek kadar az olduğu tespit edildiği için en doğru karşılaştırmanın 24. saatte gerçekleştirilebileceği belirlenmiştir. 24. saatte muamele edilen sisplatin dozlarına bakıldığında 8 $\mu\text{g/ml}$ sisplatin içeren medya ile muamele hücrelerin bulunduğu plate sisplatin konsantrasyonunun yüksekliği sebebiyle hücrelerin öldüğü bu sebeple yüzeyden kalkarak medyaya karıştığı gözlemlenmiş, 4 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda sisplatin içeren medyanın bulunduğu hücrelerin canlılığını ve aynı zamanda yara açıklığını koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5).



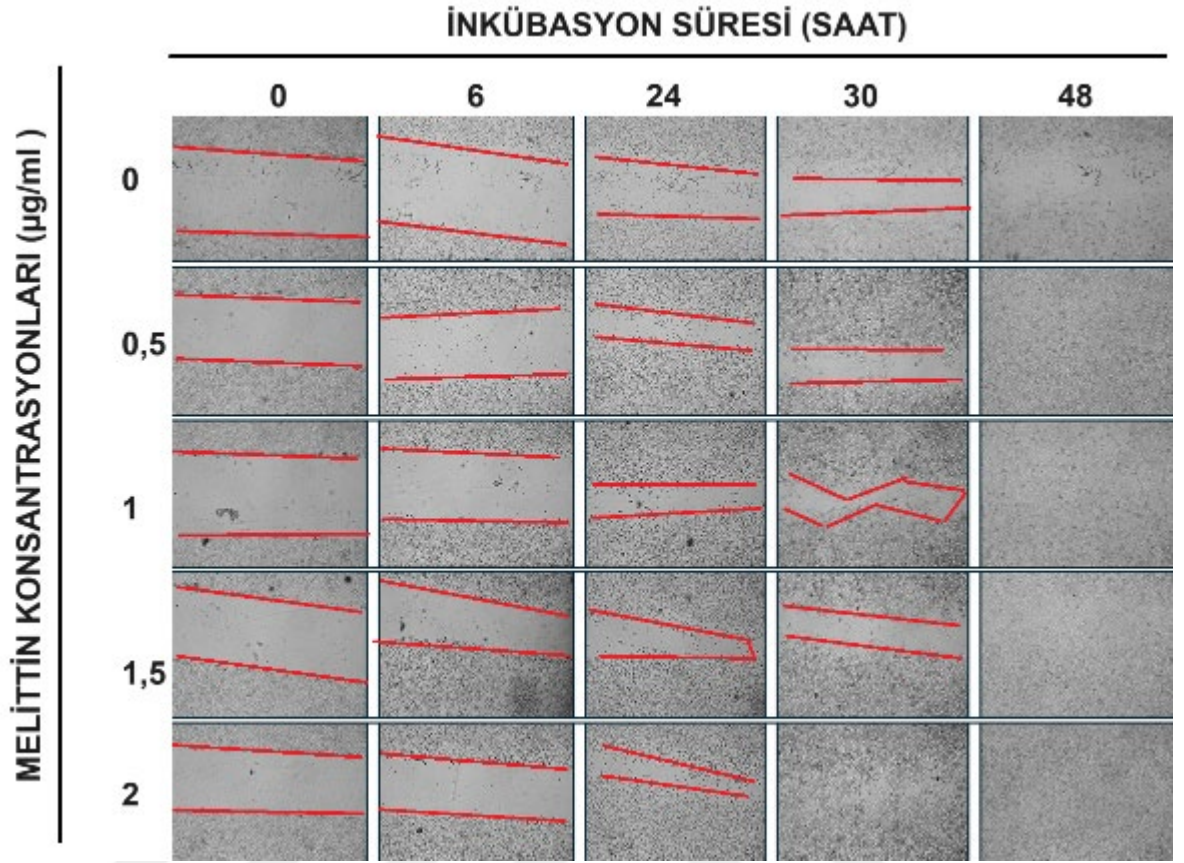
Şekil 5. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MDA-MB231 hücreleri üzerinde sisplatin ajanının 0,6,24,30, 48 ve 72 saatlerdeki muamele dozuna (0, 1, 2, 4, 8 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü

MCF10A sağlıklı epitel hücrelerine MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan dozlarda; arı zehri için 1, 2, 4 ve 8 µg/ml; melittin için; 0, 0.5, 1, 1.5 ve 2 µg/ml; kemoterapi ajanı olan sisplatin için 0, 1, 2, 4, ve 8 µg/ml konsantrasyonları uygulanmış ve yara açıldıktan sonra muamele sonrası ile yara kapanma oranları sırası ile Şekil 6, 7 ve 8'de gösterilmektedir. MCF10A hücrelerine yara açıldıktan sonra uygulanan arı zehri konsantrasyonlarına bakıldığında 48.saatte hücrelerin ölmeye başlayarak petriden kalkıp medyaya karıştığı gözlemlenmiştir. 30.saatte kıyaslamalar yapılabilir olsada MDA-MB-231 hücresi için belirlenen 24.saate bakıldığında MCF10A hücresinde arı zehri muamelesinin 24.saatinde yara açıklığının kontrole oranla daha belirgin kaldığı 4 µg/ml dozu olarak belirlenmiştir (Şekil 6).



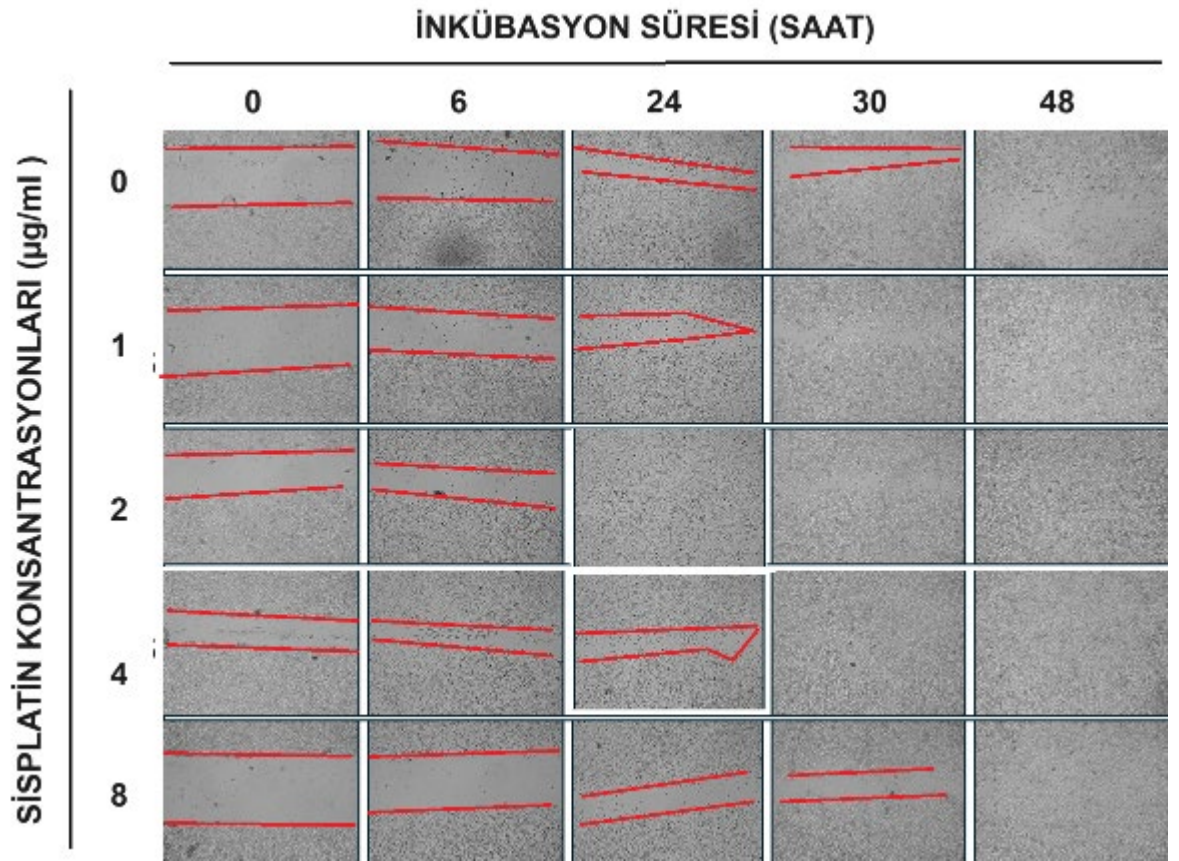
Şekil 6. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MCF10A hücreleri üzerinde arı zehri ajanının 0,6,24,30 ve 48. saatlerdeki muamele dozuna (0, 1, 2, 4, 8 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü

MCF10A hücrelerine yara oluşturulduktan sonra melittin ajanının 48.saat muamelesi sonrasında sadece 2 µg/ml yara açıklığı kalmış ancak hücre ölümleri başladığı için uygun konsantrasyon olduğu belirlenmemiştir. 30.saatte 2 µg/ml konsantrasyondaki melittin kontrole oranla çok daha artan bir yara açıklığına sahip olduğu gözlemlendi. Bunun hücre ölümünün artması ve bu sebeple yüzeyden kalkması sonucunda olduğu düşünülmektedir. 24.saatte bakıldığında hücrelerin tüm dozlarda canlılığı devam etmektedir. Hücre proliferasyonun bozulmadığı ve kontrole oranla yara açıklığının en fazla kaldığı 0.5 µg/ml konsantrasyonda medya ile muamele edilmiş hücrelerin bulunduğu petri olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MCF10A hücreleri üzerinde melittin ajanının 0,6,24,30 ve 48. saatlerdeki muamele dozuna (0; 0,5; 1; 1,5; 2 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü

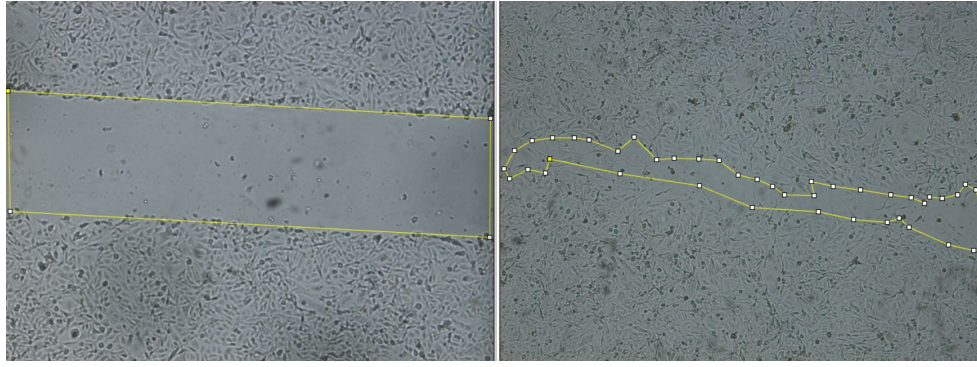
MCF10A hücrelerine muamele edilen sisplatin ajanına bakıldığında hücre proliferasyonunun değişmediği ve kontrole oranla yara açıklığının en belirgin olduğu 24.saate 4 µg/ml konsantrasyonda muamele edilen sisplatin ile olduğu belirlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Plate içerisinde konfluent halde yara oluşturulmuş MCF10A hücreleri üzerinde melittin ajanının 0,6,24,30 ve 48. saatlerdeki muamele dozuna (0, 1, 2, 4 ve 8 µg/ml) bağlı değişimin ışık mikroskobu ile görünümü

3.2. Yara Alanlarının Ölçülmesi ve SPSS Analizi

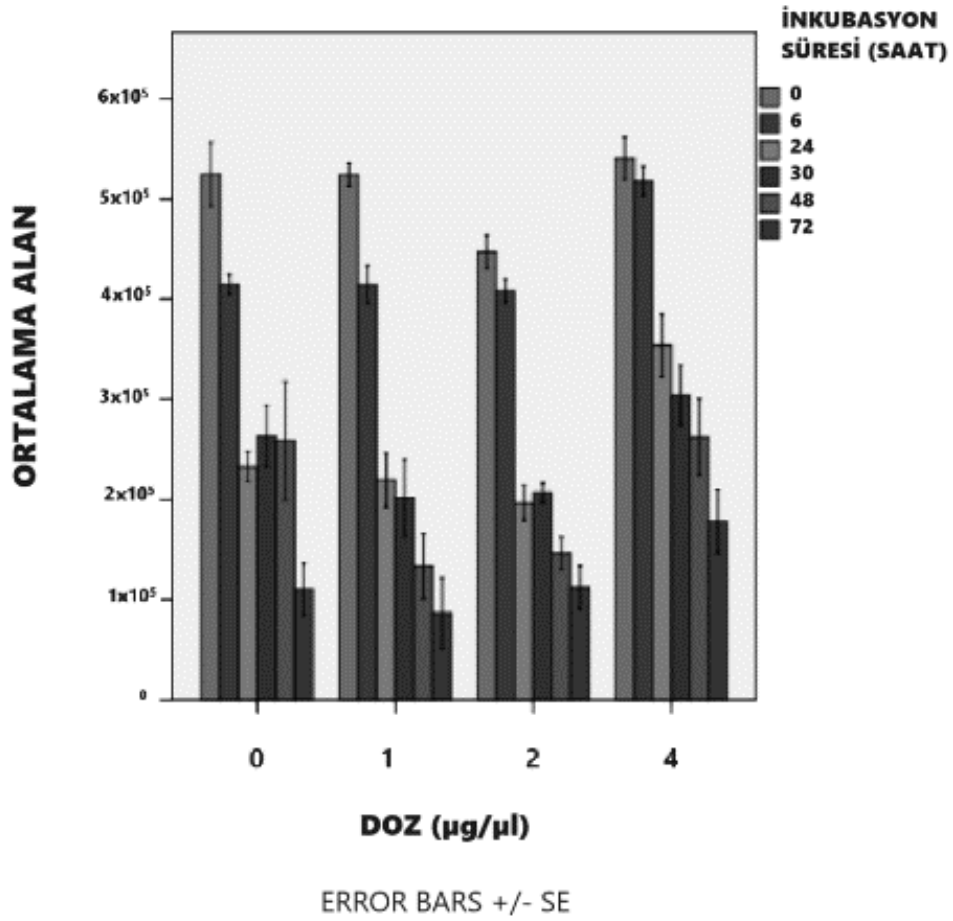
MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücresi ve sağlıklı epitel MCF10A hücresi için 60*15 petri kültürü sonrasında yara oluşturularak arı zehri, melittin ve sisplatin ajanları ve hiçbir ajan içermeyen medya bulunan kontrol grupları oluşturuldu. Ajan muamelesi sonrasında yara alanlarında oluşan değişimleri ImageJ programı ile hücre olmayan alanların çizilmesiyle birlikte ölçüldü, hücreler inkübasyon süresinde çoğalarak boş alanlara metastaz yapmaya başladıkça ölçülen alanın daha düşük olması beklendi (Şekil 9). Böylece ajan muamele edilerek hücrelere verilen medyaların hücre çoğalması ve göçünde etkisinin belirlenmesine yardımcı oldu, veriler Excel dosyasında kaydedildi.



File Edit Font Results					
	Area	Mean	Min	Max	
1	459548	135.860	41	243	
2	111837	120.675	34	177	

Şekil 9. Yara oluşturulan hücreler üzerinde arı zehri (4 µg/ml) muamelesinden sonra A, 0.saat B, 24.saat sonra ImageJ programında alanların matematiksel ölçüm örneği

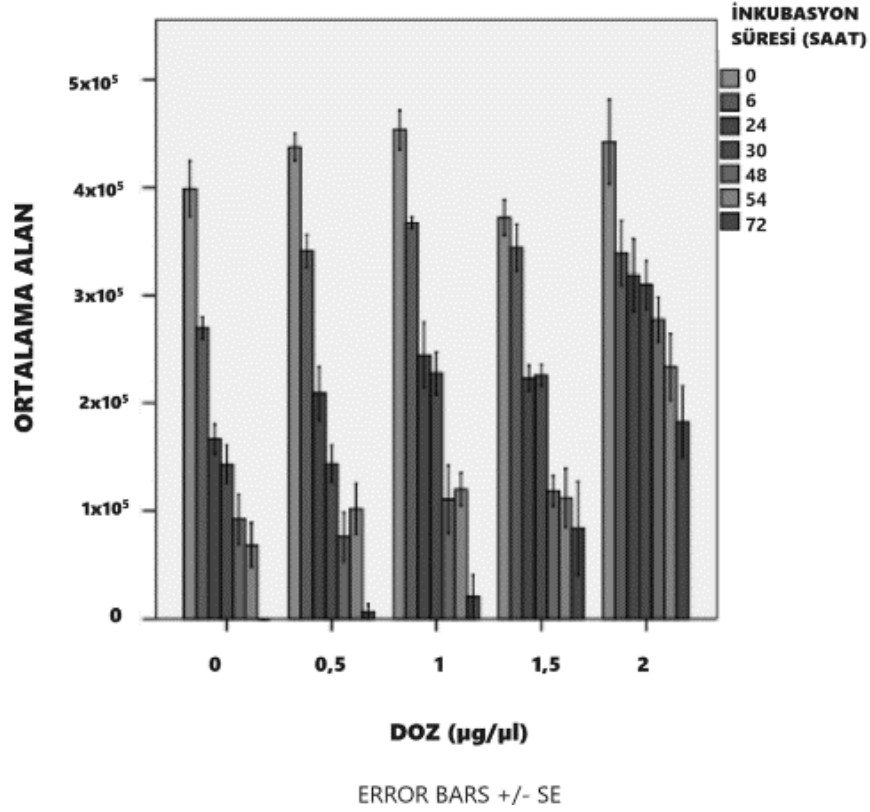
Her iki hücre ve ajan grubunun 3 tekrar sonucunda ImageJ programı ile belirlenerek ölçülen yara alanları Excel dosyasında toplandıktan sonra SPSS programı ile istatistiksel analiz gerçekleştirildi. 3 tekrar sonucu ortalamaya göre kontrol grubunu kıyaslayarak arı zehri, melittin ve sisplatin ajanı içeren medyalar ile muamele edilen hücrelerin, petri yüzeyinde açılan hücre boşluklarını kontrol grubuna nazaran daha az kapatması beklenmekteydi. Şekil 10'da belirtilen MDA-MB231 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda arı zehri muamelesinin farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen yara açıklığı alanlarının SPSS analizine göre sonuç grafikleri verilmektedir. SPSS analizlerine göre meme kanseri olan MDA-MB-231 hücreleri için bakıldığında arı zehri ile muamele edilen hücrelerin kontrole oranla hücresiz alanın daha fazla kaldığı, 4 µg/ml konsantrasyon arı zehri olduğu; 24.saatten sonra yara açıklığının arttığı ancak beklenen sonuç doğrultusunda değil hücrelerin giderek ölmeye başlayarak yüzeyden kalkması ve medyaya karışması sonucunda gerçekleştiği belirlenmiştir. Sonuç olarak arı zehri SPSS verilerine bakıldığında 4 µg/ml konsantrasyon 24.saatte hücrelerin canlılığını koruduğu ve kontrol ile kıyaslandığında açılan yara alanının hücre göçü ile dolmadığı belirlenmiştir.



Şekil 10. MDA-MB-231 yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0, 1, 2 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarında arı zehri muamelesinin 0, 6, 24, 30, 48, 72 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği

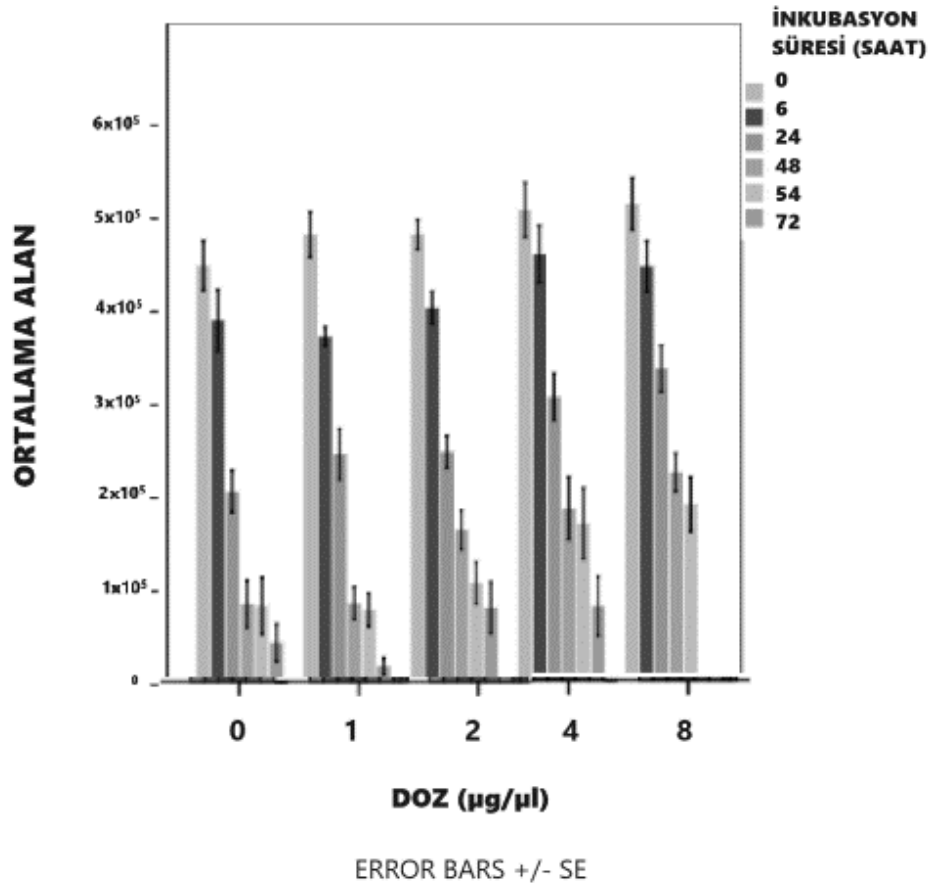
MDA-MB-231 hücreleri arı zehrinin bileşeni olan melittin ile muamele edildiğinde ise hücrelerin daha hızlı ve düşük konsantrasyonlarda dahil ölmeye başladığı gözlemlenmiş olup, 24.saatten sonra hücrelerin ölmeye başladığı için yara alanlarının daha fazla açılarak yüksek alan çıktığı belirlenmiştir. 24.saatte hücrelerin canlılığını koruduğu belirlenmiş ve kontrol grubuna göre yara açıklığı kıyaslandığında 1 µg/ml dozda melittin muamele edilen hücrelerin daha yavaş yara alanını kapattığı Şekil 11’de belirtilen SPSS analizleri sonucu oluşturulan grafik ile belirlenmiştir. MDA-MB231 hücre hattına farklı dozlarda muamele

edilen melittin ajanının 24.saatten canlılığını ve oluşturulan yara açıklığını koruduğu en uygun dozun 1 $\mu\text{g/ml}$ olduğu belirlenmiştir.



Şekil 11. MDA-MB-231 yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0; 0,5; 1; 1,5 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında melittin muamelesinin 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği

Kemoterapi ajanı olan sisplatin MDA-MB-231 hücreleri ile muamele edildiğinde ise; son konsantrasyonu 8 $\mu\text{g/ml}$ sisplatin içeren medya ile muamele edildiklerinden 24.saat sonrasında hücrelerin ölmeye başlayarak yüzeye kalktığı gözlemlenmiş olup, 24.saatte diğer konsantrasyonların aksine 4 $\mu\text{g/ml}$ sisplatin muamelesinin kontrol grubuyla kıyaslandığında hücrelerin daha yavaş çoğaldığı ve yara açıklığını kapatmadığı mikroskop görüntülerinde görsel olarak belirlenmiş olup Şekil12’de belirtilen SPSS analizi sonuçlarının grafiği ile desteklenmiştir.



Şekil 12. MDA-MB-231 yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0, 1, 2 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarında sisplatin muamelesinin 0, 6, 24, 48, 54, 72 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği

MDA-MB-231 hücre hattına muamele edilen ajanların SPSS analizi istatistiksel verilerinin sonuçları Şekil 13’de gösterilmektedir. SPSS istatistiksel sonuçları seçilen doz konsantrasyonları ve muamele sürelerinin doğrulamaktadır.

Bee venom - MDA-MB-231 cells

Multiple Comparisons
Dependent Variable: area
LSD

(I) dose	(J) dose	Sig.
,00	1,00	,702
	2,00	,348
	4,00	,001 *
1,00	,00	,702
	2,00	,548
	4,00	,000 *
2,00	,00	,348
	1,00	,548
	4,00	,000 *
4,00	,00	,001 *
	1,00	,000 *
	2,00	,000 *

Melittin - MDA-MB-231 cells

Multiple Comparisons
Dependent Variable: area
LSD

(I) dose	(J) dose	Sig.
,00	,50	,234
	1,00	,035 *
	1,50	,118
	2,00	,000 *
,50	,00	,234
	1,00	,321
	1,50	,692
	2,00	,004 *
1,00	,00	,035 *
	,50	,321
	1,50	,545
	2,00	,043 *
1,50	,00	,118
	,50	,692
	1,00	,545
	2,00	,011 *
2,00	,00	,000 *
	,50	,004 *
	1,00	,043 *
	1,50	,011 *

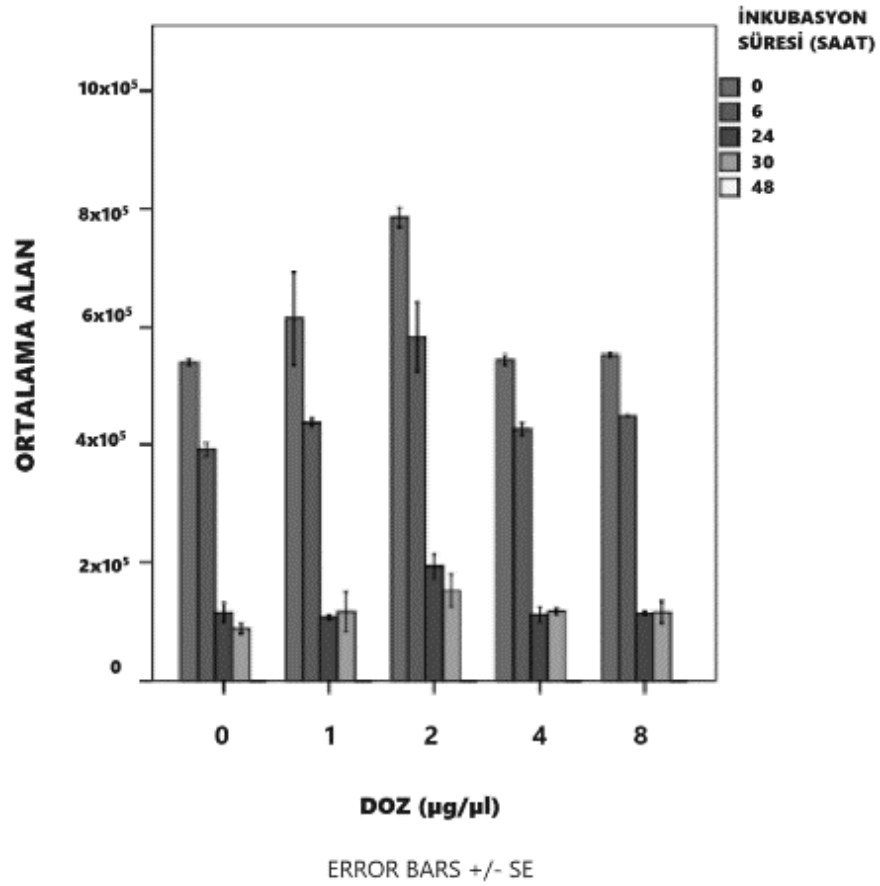
Cisplatin - MDA-MB-231 cells

Multiple Comparisons
Dependent Variable: area
LSD

(I) dose	(J) dose	Sig.
,00	1,00	,242
	2,00	,214
	4,00	,004 *
	8,00	,000 *
1,00	,00	,242
	2,00	,939
	4,00	,075
	8,00	,009 *
2,00	,00	,214
	1,00	,939
	4,00	,088
	8,00	,011 *
4,00	,00	,004 *
	1,00	,075
	2,00	,088
	8,00	,370
8,00	,00	,000 *
	1,00	,009 *
	2,00	,011 *
	4,00	,370

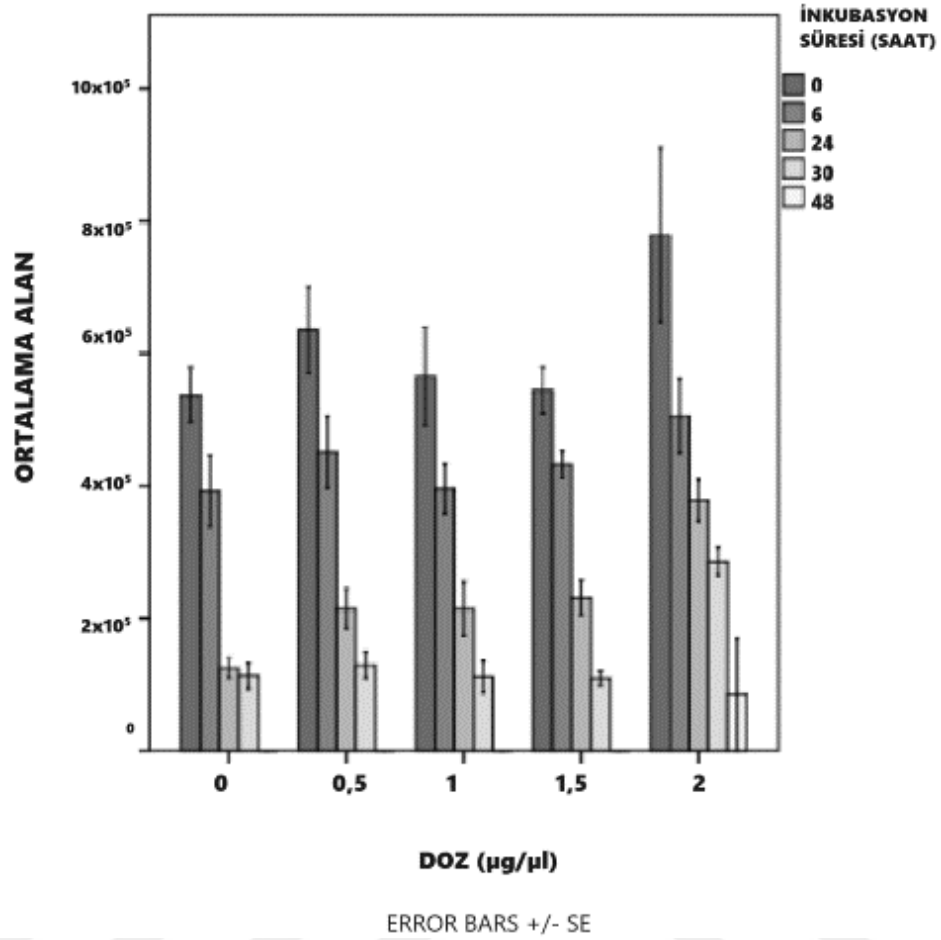
Şekil 13. MDA-MB231 hücre hattı; arı zehri, melittin ve sisplatin muamelesi sonucu SPSS analizi istatistiksel verileri

Sağlıklı hücre grubu olarak kullanılan MCF10A hücrelerine arı zehri içeren medya ile muamele edildiklerinde 30.saatten sonra kontrol grubu dahil tüm gruplarda yara kapandığı gözlemlenmiştir. 24.saate bakıldığında 4 µg/ml arı zehri muamelesinin diğer konsantrasyonlara oranla yara açıklığının değişmediği, düşük konsantrasyonların muamele edildiği hücrelerde hücre çoğalmaları kontrole paralel şekilde devam etmektedir. 8 µg/ml konsantrasyon 24.saatte hücre proliferasyonunda farklılıklar gözlemlenmeye başladığı için en sağlıklı sonuçların 24.saatte 4 µg/ml arı zehri olarak belirlenmiş aynı zamanda Şekil 14’de belirtilen SPSS grafiği ile desteklenmiştir.



Şekil 14. MCF10A yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0, 1, 2, 4 ve 8 µg/ml konsantrasyonlarında arı zehri muamelesinin 0, 6, 24, 30, 48 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği

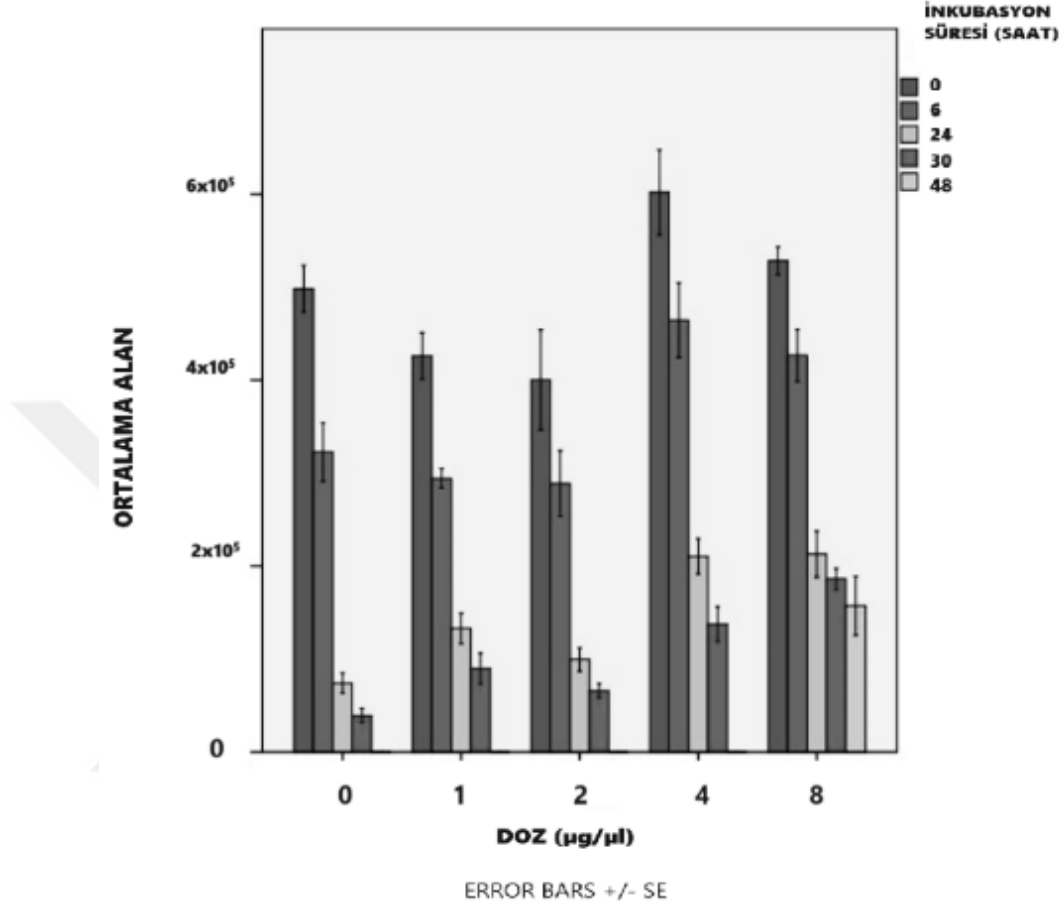
Sağlıklı hücrelerin 2,4 ve 8 µg/ml melittin ile muamelesinde hücrelerin öldüğünü bu sebeple daha düşük dozlarda (son konsantrasyonu 0; 0.5; 1 ve 1.5 µg/ml melittin içeren medyalar ile muamelesi) muamele edilmiştir. MDA-MB231 hücreleri 1 µg/ml melittin ile muamele edilmişti, MCF10A hücre hattının da 1 µg/ml melittin ile 24saat muamele edildiğinde hücrelerde yara açıklığı kontrole göre korunduğu Şekil 15'deki SPSS analizi grafiğine göre belirlenmiştir.



Şekil 15. MCF10A yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0; 0,5; 1; 1,5 ve 2 µg/ml konsantrasyonlarında melittin muamelesinin 0, 6, 24, 30, 48 saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği.

Kemoterapik ajanların kanserli hücrelerin büyümesi ve çoğalmasını engellediği bilinirken aynı anda sağlıklı hücrelerinde kemoterapik ajanlardan zarar gördüğü bilinmektedir. Bu bilgi doğrultusunda sağlıklı hücreler sisplatin ile muamele edildiğinde 48.saatte hücrelerin öldüğü ve 24.saate bakıldığında konsantrasyon arttıkça sağlıklı hücrelerin ölerak yüzeyden kalktığı gözlemlenmiş ve bu sebeple alan artması Şekil13’de belirtilen SPSS analizi sonuç grafiği ile doğrulanmıştır. Şekil 16’da belirtilen grafiğe bakıldığında 24.saatte hücrelerin çoğalarak kontrol grubunda yara alanını giderek kapattığı sırasıyla 1 µg/ml ve 2 µg/ml dozlarında kontrole göre daha yavaş ancak yine çoğalarak yarayı kapatmaya başladığı gözlemlenmiş; 24.saatte 4 µg/ml sisplatine bakıldığında

hücrelerin proliferasyonunda değişim olmadığı aynı zamanda kontrol grubuna kıyasla daha yavaş çoğalarak yara kapanmasının en az olduğu doz olarak belirlenmiştir.



Şekil 16. MCF10A yara oluşturulmuş kültür hücrelerine 0, 1, 2, 4 ve 8 µg/ml konsantrasyonlarında sispilin muamelesinin 0, 6, 24, 30 ve 48. saatlere göre yara alanlarının değişim grafiği

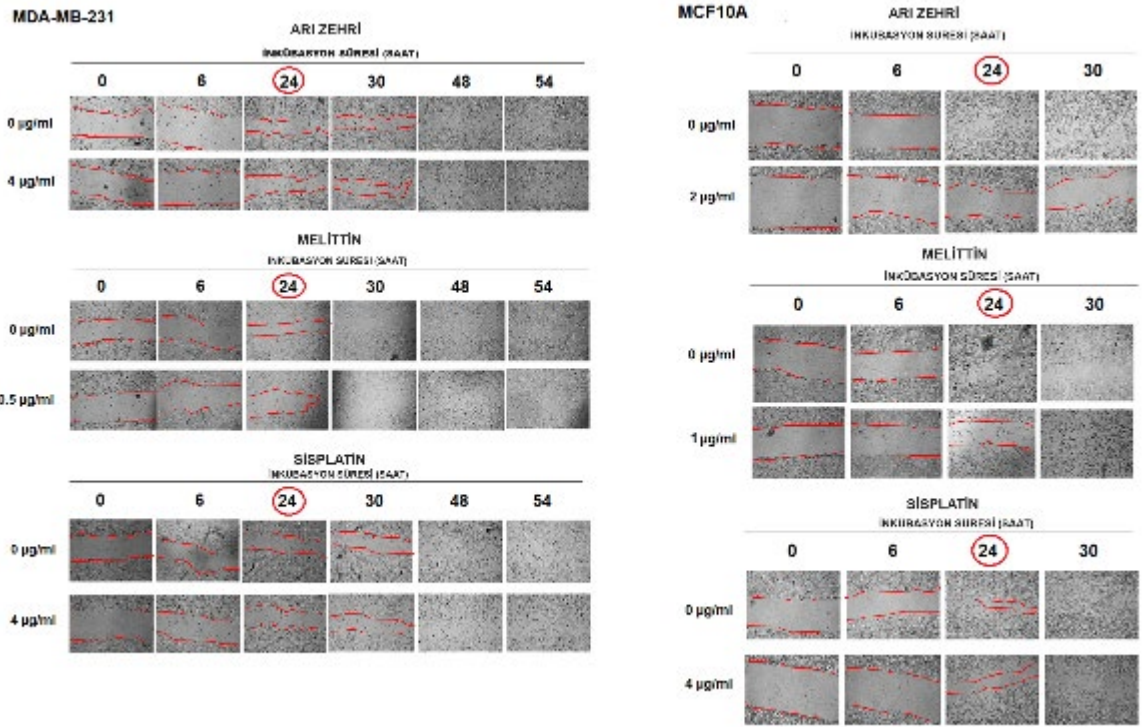
Bee Venom - MCF10A cells			Melittin - MCF10A cells			Cisplatin - MCF10A cells		
Multiple Comparisons			Multiple Comparisons			Multiple Comparisons		
Dependent Variable: AREA			Dependent Variable: AREA			Dependent Variable: area		
LSD			LSD			LSD		
(I) DOSE	(J) DOSE	Sig.	(I) DOSE	(J) DOSE	Sig.	(I) dose	(J) dose	Sig.
,00	1,00	,685	,00	,50	,040	,00	1,00	,023
	2,00	,002		1,00	,040		2,00	,314
	4,00	,859		1,50	,017		4,00	,000
	8,00	,929		2,00	,000		8,00	,000
1,00	,00	,685	,50	,00	,040	1,00	,00	,023
	2,00	,001		1,00	1,000		2,00	,184
	4,00	,819		1,50	,706		4,00	,003
	8,00	,751		2,00	,000		8,00	,003
2,00	,00	,002	1,00	,00	,040	2,00	,00	,314
	1,00	,001		,50	1,000		1,00	,184
	4,00	,002		1,50	,706		4,00	,000
	8,00	,002		2,00	,000		8,00	,000
4,00	,00	,859	1,50	,00	,017	4,00	,00	,000
	1,00	,819		,50	,706		1,00	,003
	2,00	,002		1,00	,706		2,00	,000
	8,00	,930		2,00	,001		8,00	,925
8,00	,00	,929	2,00	,00	,000	8,00	,00	,000
	1,00	,751		,50	,000		1,00	,003
	2,00	,002		1,00	,000		2,00	,000
	4,00	,930		1,50	,001		4,00	,925

Şekil 17. MCF10A hücre hattı; arı zehri, melittin ve sisplatin muamelesi sonucu SPSS analizi istatistiksel verileri

Sonuç olarak muamele edilen ajanların belirlenen genlerin ekspresyon seviyesindeki etkisinin inceleneceği istatistiksel olarak en anlamlı doz ve inkübasyon saatleri belirlenmiş (MDA-MB231 hücre hattı istatistiksel analiz sonuçları için Şekil 13, MCF10-a hücre hattı istatistiksel analiz sonuçları için Şekil 17 bakınız) ve **Tablo 2**'de bu şartlar özetlenmiştir. Buna göre Şekil 18'de belirtildiği gibi her ajan için belirlenen doz ve inkübasyon süresi uygulanarak RNA izolasyonlarına geçilmiş ve genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir.

Tablo 2. Her bir ajan muamelesi sonucunda istatistiksel analizlerde en anlamlı çıkan yaranın kapanmadığı (yani metastatik etkinin engellendiği) şartlar

HÜCRE	Her bir ajan muamelesi için RNA izole edilen şartlar		
	Arı zehri	Melittin	Sisplatin
MDA-MB-231	4 µg/ml – 24 saat (Şekil 9)	0.5 µg/ml – 24 saat (Şekil 10)	4 µg/ml – 24 saat (Şekil 11)
MCF10A	2 µg/ml – 24 saat (Şekil 13)	1 µg/ml – 24 saat (Şekil 14)	4 µg/ml – 24 saat (Şekil 15)



Şekil 18. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattının belirlenen konsantrasyon ve sürede kontrole kıyasla değişimi

3.3. Total RNA İzolasyonu

Tez kapsamında belirlenen genlerin ekspresyon seviyesinin tespiti için total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Yara iyileştirme deneyi sonucunda SPSS verilerine göre belirlenen konsantrasyonda arı zehri, melittin ve sisplatin ajanları ile her iki hücrede yine SPSS verilerine göre belirlenen süre kadar 37°C inkübatörde muamele edildi. Belirlenen süre inkübe edildikten sonra hücreler flask tabanından kaldırılarak medyadan uzaklaştırıldı. Pelet halinde -20°C’de muhafaza edildi. -20°C bulunan peletler HİBRİGEN markasının ‘Genel RNA İzolasyon Kiti’ (Katalog numarası MG-RNA-01) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örnekleri konsantrasyonu NanoDrop cihazı ile ölçülerek RNA saflık miktarı belirlendi (Tablo 3). RNA ekstraksiyonlarında saflık ölçüsü olarak belirlenen A260/280 değerinin yaklaşık 2.0 olarak ölçülen RNA’ların ekstraksiyon esnasında kullanılan reaktiflerle kontamine olmadığını ölçüsüdür. A230/260 oranı trizol, fenol gibi istenmeyen organik yapıların varlığını belirtmek için kullanılır ve genel olarak

kabul edilebilir oranı 2.0- 2.2 arasındadır. İzole edilen tüm RNA'ların saflık aralığında olduğu Tablo 3'de gösterilmektedir.

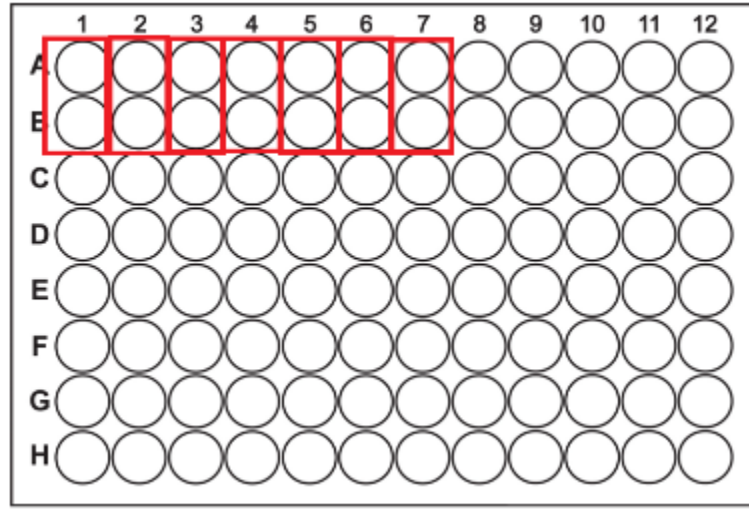
Tablo 3. İzole edilen RNA'ların saflığının nanodrop sonuçları

MDA-MB-231	260/230	260/280
KONTROL YARA OLUŞTURULAN GRUP	2.0	1.57
4 µg/ml ARI ZEHRİ YARA OLUŞTURULAN GRUP	2.04	1.39
0,5 µg/ml MELİTTİN YARA OLUŞTURULAN GRUP	2.03	1.83
4 µg/ml SİSPLATİN YARA OLUŞTURULAN GRUP	1.94	0.74
MCF10A	260/230	260/280
KONTROL YARA OLUŞTURULAN GRUP	2.03	1.57
4 µg/ml ARI ZEHRİ YARA OLUŞTURULAN GRUP	2.05	0.91
1 µg/ml MELİTTİN YARA OLUŞTURULAN GRUP	2.01	1.85
4 µg/ml SİSPLATİN YARA OLUŞTURULAN GRUP	2.02	1.12

3.4. Gen Ekspresyon Analizi

Yara oluşturularak ajan muamele edilen MDA-231 ve MCF10-A hücre peletleri için *BRMS1*, *DRG1*, *KAI/CD82*, *EGFR*, *WNT7B* genleri için **Tablo 1**'de tasarlanan primerler kullanıldı ve ajanlar ile muamele edilen hücrelerden elde edilen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuyla kıyaslanarak karşılaştırıldı. Deney düzeneği yara oluşturulduktan sonra medya ve ajanların muamelesi ile hücrelerin toplanması, RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilen örneklerin seçilen genler ve kontrol genini deney içi 2 tekrar oluşturacak şekilde düzenlenmiştir. Gen ekspresyonu için A.B.T.TM 2X qPCR EVA-Green MasterMix (with ROX) (Cat no: Q02-02-01) kiti kullanıldı. cDNA sentezi gerçekleştirilen hücreler qPCR analizi için kitte belirtilen bileşenlerin birleşimi ile Şekil 19'da belirtilen örnek qPCR 96-well plate yerleştirildi.

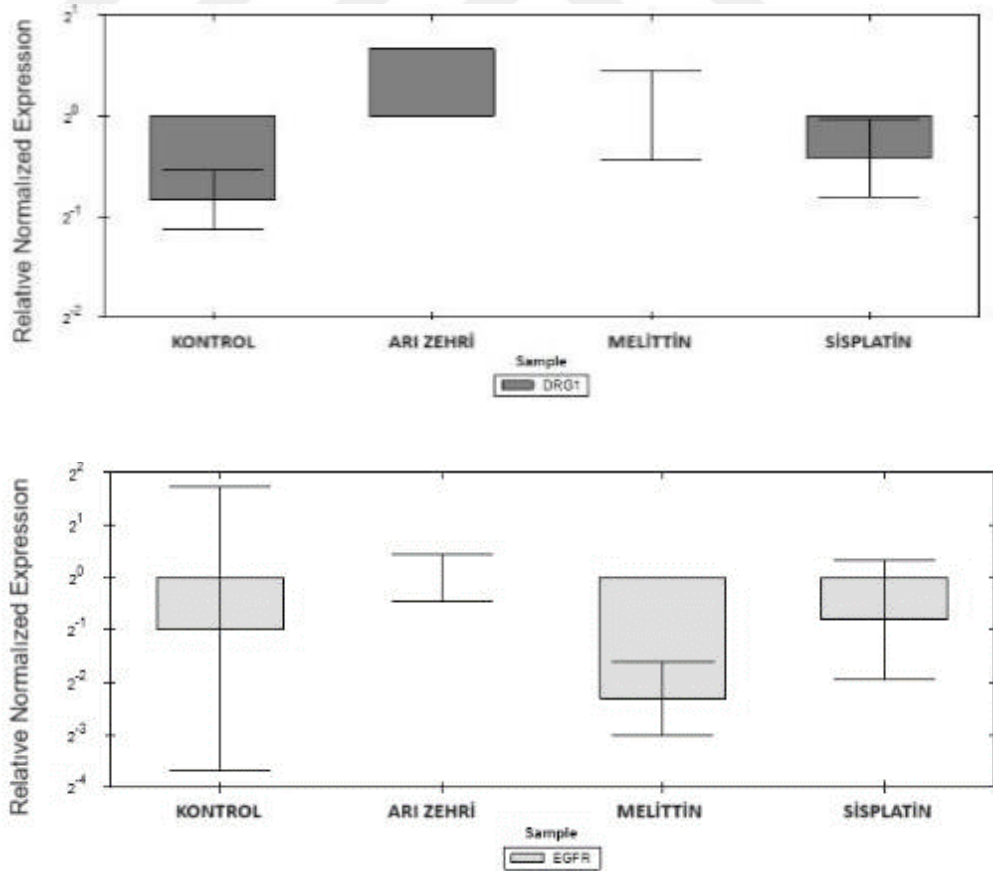
Örnek plate gösterildiği gibi her örnek için iki tekrar (A ve B sırası) yapılmıştır. 1: kontrol yara oluşturulan EGFR geni, 2: kontrol yara oluşturulan B-Aktin geni, 3: yara oluşturulmuş BV muamelesi EGFR geni, 4: yara oluşturulmuş BV muamelesi B-Aktin geni, 5: yara oluşturulmuş melittin muamelesi EGFR geni, 6: yara oluşturulmuş melittin muamelesi B-Aktin geni, 7: yara oluşturulmuş sisplatin EGFR geni, 8: yara oluşturulmuş sisplatin B-Aktin geni şeklinde organize edilmiştir.

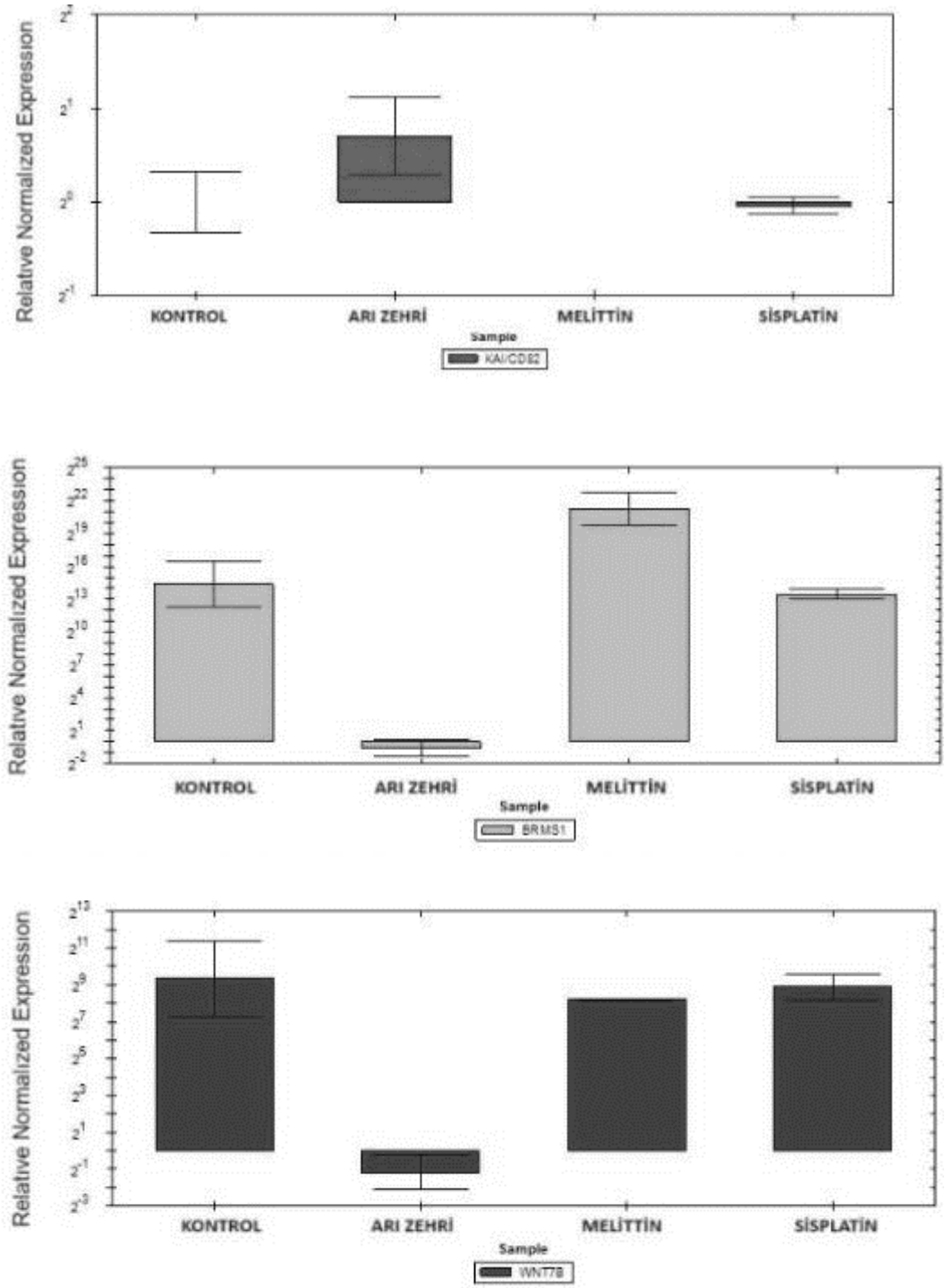


Şekil 19. Wound healing analizi için hücrelerin ekildiği qPCR 96 well-plate düzeneği

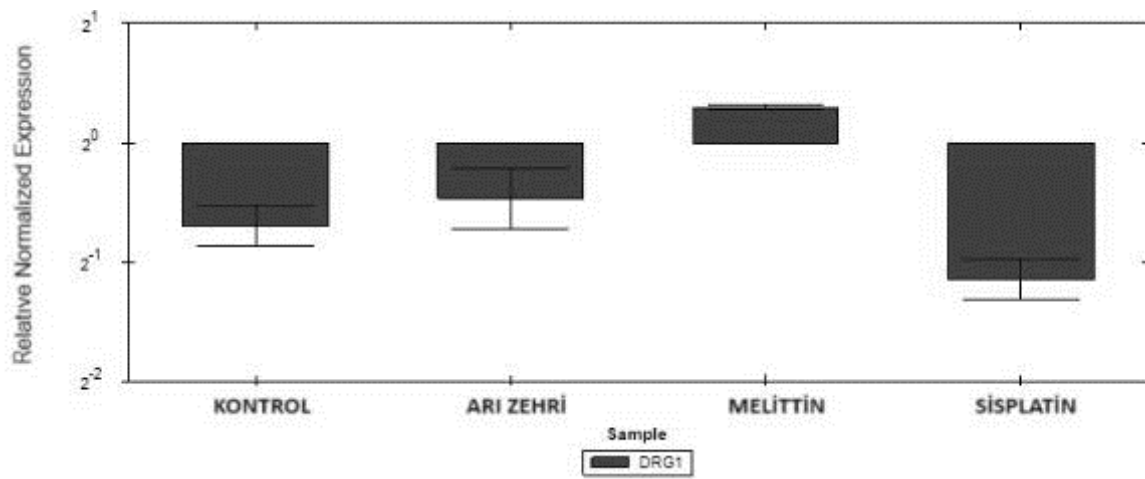
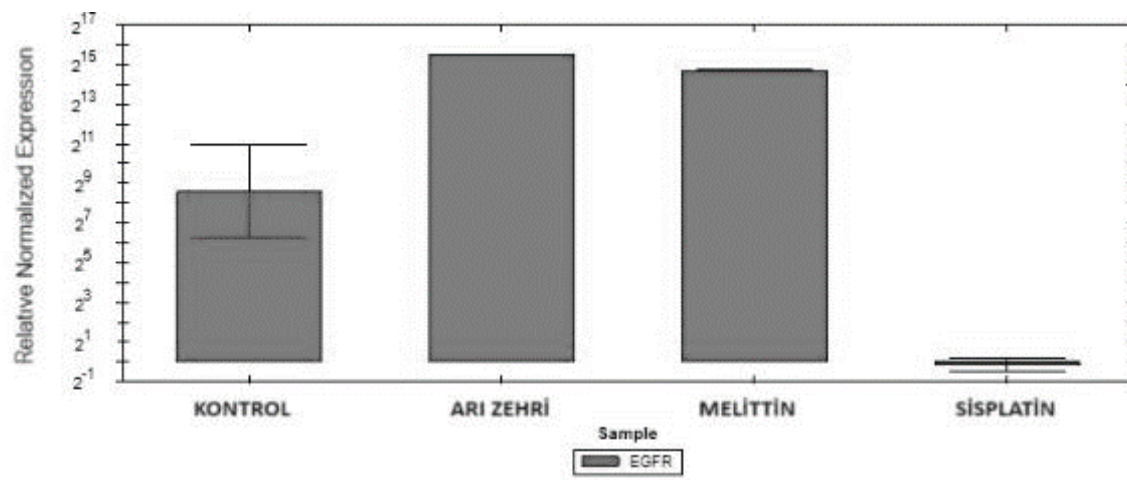
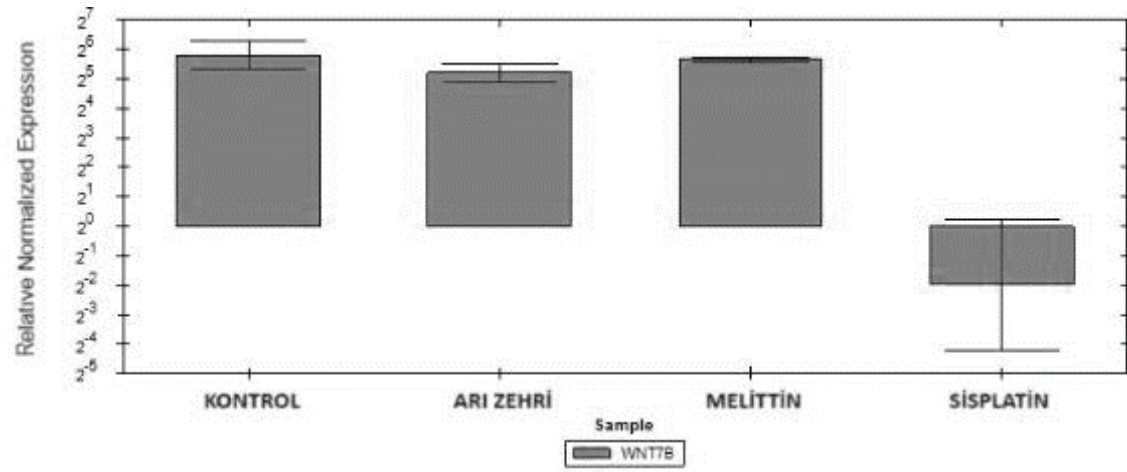
qPCR analizi değerlendirildiğinde Şekil 20’de belirtilen grafiklere göre MDA-MB-231 hücresinden anti-metastatik genlere sırasıyla bakıldığında *BRMS1* geni için melittin ve sisplatin muamele edilen örneklerin sonuçlarında gen ekspresyon seviyesi kontrole göre düşmüş arı zehri ile muamele edilen hücrelerin qPCR analiz sonuçları elde edilememiştir, *DRG1* geni için melittin muamele edilen hücrelerde gen ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla artarken sisplatin muamelesi sonucu hücrelerde ekspresyon seviyesi düştüğü belirlenmiştir. *KAI/CD82* geni ekspresyon seviyeleri arı zehri muamelesi ile düşerken melittin ve sisplatin muamelesi sonucu gen ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla anlamlı bir değişim olmamıştır. Pro-metastatik genlerden biri olan *EGFR* geni ekspresyon seviyesi kemoterapi ajan olan sisplatin muamelesinden sonra kontrole kıyasla düşük eksprese olmaktadır. *WNT7B* genine bakıldığında yine kemoterapi ajanı olan sisplatin muamelesinin hücrelerde gen ekspresyon seviyesini düşürdüğü, apiterapi ajanlarının kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık sergilemediği gözlemlenmektedir.

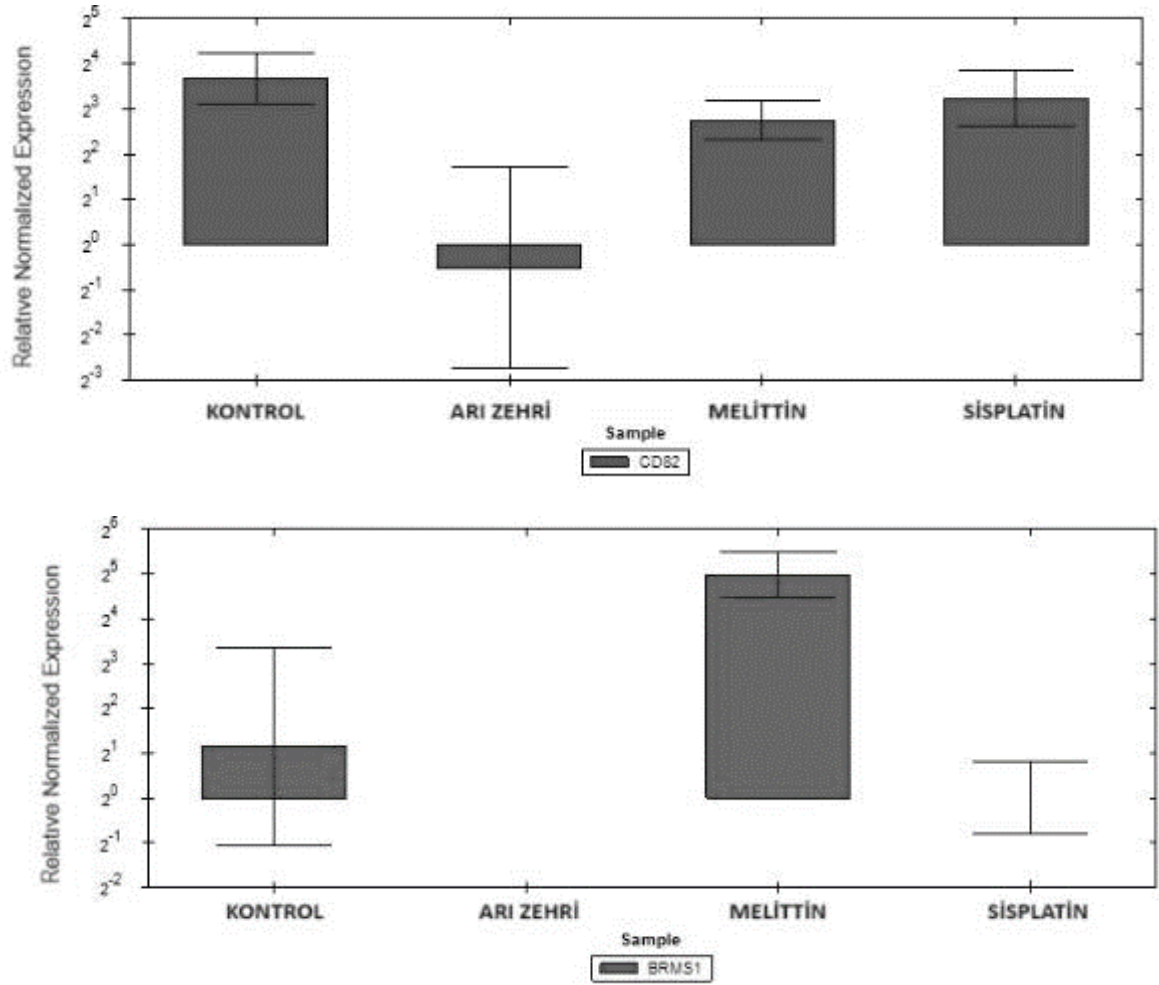
Sağlıklı hücre olarak seçilen kontrol grubu MCF10A hücrelerinin qPCR analizi sonuçları Şekil 21'e bakılarak sırasıyla değerlendirildiğinde; *BRMS1* geni arı zehri muamelesinden sonra kontrole kıyasla düşük ekspresyon seviyesine sahipken melittin ve sisplatinin ajanlarının muamelesinde ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. *DRG1* genine bakıldığında ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir düşüş gözlemlenirken arı zehri muamelesi sonucunda ekspresyon seviyesi artmış, kemoterapötik ajan olan sisplatin muamelesinden sonra ekspresyon seviyesinde kontrol hücrelerinden anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. *KAI/CD82* genine bakıldığında melittin ekspresyon sonuçları elde edilemediği gibi arı zehri melittin muamelesi sonucunda ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Pro-metastatik genlere bakıldığında *EGFR* gen ekspresyon seviyesi melittin ve sisplatin muamelesiyle birlikte düşmektedir. *WNT7B* geninde ise arı zehri muamelesi sonucu ekspresyon seviyesi düşerken sisplatin ve melittin muamelesinden sonra ekspresyon seviyesinin kontrolle paralel olduğu gözlemlenmiştir.





Şekil 20. MDA-MB-231 hücre hattına arı zehri, melittin ve sisplatin muamelesinden sonra sırasıyla EGFR, CD82, DRG1, WNT7B, BRMS1 genlerinin ekspresyon seviyeleri qPCR sonuçları



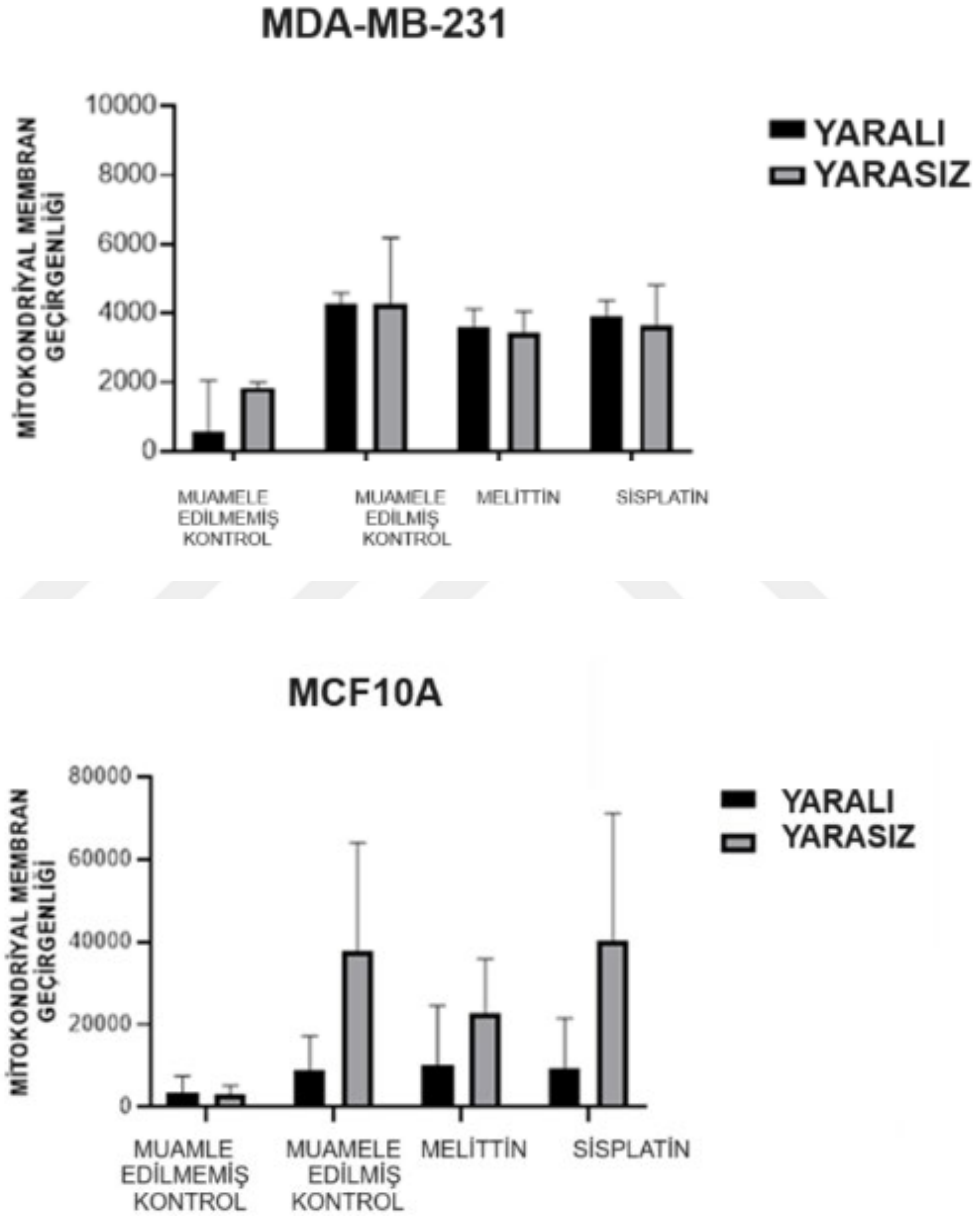


Şekil 21. MCF10-A hücre hattına arı zehri, melittin ve sisplatin muamelesinden sonra sırasıyla EGFR, CD82, DRG1, WNT7B, BRMS1 genlerinin ekspresyon seviyeleri qPCR sonuçları

3.5. Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

Deney düzeneği 2.2’de belirtildiği şekilde oluşturulduktan sonra melittin ve sisplatin verilen hücrelerin mitokondriyal membran potansiyeli akım sitometrisi cihazı kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçları grafik halinde Şekil 21’de gösterilmektedir. MDA-MB-231 hücre hattının ajan muameleleri sonucuna bakıldığında yara oluşturularak ve yara oluşturulmadan ajanlarla muamele edilen hücrelerin mitokondriyal membran geçirgenliği arasında anlamlı bir farklılık olmadığı, MitoTracker Red boyası ile muamele edilmemiş kontrol grubu ile körlleme yapıldıktan sonra yine boya ile muamele edilmiş kontrol, melittin ve sisplatin gruplarında mitokondriyal membran geçirgenliğinin kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmektedir. MCF10A sağlıklı hücrelerin membran geçirgenliği

yara oluşturulmayan hücrelerde oluşturulanlara göre daha yüksek olduğu, sisplatin muamelesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermediği ancak melittin muamelesinin kontrole kıyasla membran geçirgenliğinin azaldığı gözlemlenmektedir.



Şekil 22. Akım sitometrisi ile MDA-MB231 ve MCF10A hücrelerinin ajanlar muamelesi sonucu belirlenen mitokondriyal membran geçirgenliği grafikleri

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Tezin amacı arı zehrinin ve içerisinde çok miktarda bulunan melittin bileşeninin meme kanseri üzerinde anti-metastatik etkisinin belirlenmesi yönündedir. Metastazda ve pro-onkogenik genlerin ekspresyon seviyelerinin ajanların etkisiyle değişim göstermesi beklenmektedir. Sisplatin bir kemoterapi ajandır ve arı zehri ve melittinin anti-metastatik genlerin ekspresyon seviyelerini artırırken pro-onkogenlerin ekspresyon seviyelerinde düşüş olması beklenmektedir.

Bu tezde, arı zehri, arı zehri bileşeni olan melittin ve kemoterapi kanser tedavisinde kullanılan sisplatin ajanları petri üzerine ekilen ve yüzey alanı boyunca yerleşen meme kanseri hücrelerinde yara oluşturularak çeşitli dozlarda ayrı ayrı muamele edilmiş ve sağlıklı epitel hücreleri de aynı şekilde işlemlere tabi tutulmuştur. Böylece her iki hücrede üç ajanın ayrı ayrı *in vitro* anti-metastatik etki gösterdiği şartlarda birbirleriyle hücresel ilişkisi bulunan proteinleri kodlayan *EGFR*, *WNT7B*, *BRMS1*, *DRG1* ve *CD82* genlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar kısaca şöyle özetlenebilir;

1. Yara deneyleri yapılırken ajan muamelesinde, melittin ajanının arı zehri ajanına oranla daha toksik olduğu, yaklaşık 48 saat sonra arı zehri ile muamele edilen hücrelerin proliferasyonunda değişim gözlemlenmezken arı zehri bileşeni olan melittin ile muamele edilen hücrelerin proliferasyonundaki değişim ışık mikroskobu altında gözlemlenmiştir.
2. Her iki hücre içinde aynı ajanların aynı konsantrasyonları muamele edildiğinde alınan son uçlara göre MDA-MB-231 hücreleri yaklaşık 54 saat sonrasında hücre proliferasyonlarında değişimler başlarken sağlıklı epitel hücre olan MCF10A hücre hattında 30.saatten sonra hücre proliferasyonlarında değişimler gözlemlenmiş bu yüzden kontrol grupları tamamen kapanmadan deney sonlandırılmıştır.
3. Metastaz baskılayıcı genlerden biri olan *BRMS1* (meme kanseri metastazı baskılayıcı gen-1) MDA-MB-231 hücrelerine muamele edilen melittin ve sisplatin sonucunda muamele edilmeyen hücredeki ekspresyon seviyesine göre artış göstermiş, arı zehri muamelesinden sonra gen ekspresyon seviyesi belirlenememiştir. Sağlıklı epitel hücre olan MCF10A hücrelerine ajanlarla muamele edildikten sonra *BRMS1* geni

- ekspresyon seviyesi kontrole göre melittin muamelesinden sonra artarken arı zehri ve sisplatin muamelesinden sonra azalmıştır.
4. *BRMS-1* geninin up-regülatörü olan *EGFR* geni onkogenik aktiviteye sahiptir. *EGFR* gen ekspresyonu MDA-MB-231 hücrelerinde kontrole kıyasla arı zehri ve melittin muamelesi sonrasında artarken sisplatin muamelesi sonucunda azalmıştır. MCF10A hücre hattında ise arı zehri ve sisplatin sonucu artmış melittin sonucu azalmıştır.
 5. *EGFR* genini baskılayan *CD82* geni metastaz baskılayıcı bir gendir. *CD82* gen ekspresyon seviyesi düşük kanserli hücrede kanserin agresif ve metastatik tipini belirteci olarak bilinmektedir. MDA hücresinde tüm ajan muamelelerinden sonra ekspresyon seviyesi düşmektedir böylece *EGFR* genindeki ajan sonrası artışlar desteklenmektedir. MCF10A hücre hattında *CD82* geni ajanlarla muamele sonrasında artmaktadır, melittin muamelesi sonucu gen ekspresyon seviyesi belirlenememiştir. *EGFR* genindeki arı zehri ve sisplatin muamelesinden sonraki artış *CD82* geni ekspresyon seviyesindeki düşüşten tetiklendiği yorumlanabilmektedir.
 6. *DRG1* geni metastaz baskılayıcı fonksiyonu olduğu bilinmektedir. *DRG1* geninin arı zehri melittin ve muamelesinden sonra MDA-MB-231 hücre hattında gen ekspresyon seviyesinde artış tespit edilmiş ancak sisplatin muamelesinden sonra gen ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla düşmüştür. MCF10A hücre hattında tüm ajanların muamelesinden sonra *DRG1* gen ekspresyon seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir.
 7. MDA-MB-231 meme kanseri hücresinde *WNT7B* geninin yüksek onkogenik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Her iki hücre hattında da arı zehri, melittin ve sisplatinle muamele edildikten sonra *WNT7B* gen ekspresyon seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir.
 8. Genlerin birbirleriyle ilişkileri hücresel düzeyde tam olarak belirlenemediği için her ajanın genlerde oluşturduğu etkiler sonucunda genlerin birbirlerine olan etkileri göz ardı edilememektedir. Onkogenik aktivitesi olduğu bilinen genlerin bazı ajan muamelesi sonucunda beklenmedik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebi her deneyi ekonomik sebepler altında birden fazla tekrarlanarak doğruluğunun kesinleştirilememesi olduğu gibi gen yollarının birbirleri ile olan bilinmeyen etkileşimlerinden de kaynaklandığı düşünülebilmektedir. Çalışmaların daha kapsamlı ve doğru sonuçlara götürülebilmesi için deneylerinden birçok kez

tekrarlanarak sonuçlar karşılaştırılmalıdır. Aynı zamanda hücre içerisinde çalışılacak genler dışında etkileyebileceği bilinen genler susturularak sadece çalışılacak genlerin birbiri ile ilişkileri ajanlarla muamelesi sonucunda gözlemlenmelidir.

9. Sonuçlara bakıldığında gen ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesinde kemoterapötik ajan olan sisplatin sonuçlarının arı zehri etken maddesi olan melittin sonuçlarına eş olduğu, genel olarak aynı sonuçları verdiği gözlemlenmiştir.
10. Ajan muamelelerinin mitokondriyal membran geçirgenliği ile ilişkisine bakıldığında kanser hücresi olarak seçilen MDA-MB-231 hücre hattında ajanla muamele edilmemiş hücrelerin membran geçirgenlik potansiyelinin ajanlarla muamele edilenlerden daha fazla olduğu; MCF10A sağlıklı hücrelere bakıldığında melittin muamelesinin kontrol ve sisplatine kıyasla daha düşük membran geçirgenliğine sahip olduğu gözlemlenmektedir. Mitokondriyal membran geçirgenliği apoptoz ile ilişkilendirildiğinde ajanların kanserli hücrelerin geçirgenliğini düşürerek apoptoza götürmediği buna paralel olarak sağlıklı hücrelerinde membran geçirgenliğini düşürerek olası apoptoz ihtimalini engelleyebileceği düşünülmektedir.

5. ÖNERİLER

Yüksek lisans tezi olan bu çalışmada, Arı zehri ve bileşeni melittinin metastatik meme kanseri hücrelerinde metastaz baskılayıcı özelliğinin araştırılması yapılmıştır. Bu tez konusu ile çalışma yapmak isteyen araştırmacılara ve uygulayıcılara iletmek istenen öneriler aşağıdaki gibi belirtilmiştir:

- Seçilen genlerin çeşitliliği artırılarak başka genlerin ekspresyon seviyelerinde arı zehri ve melittin muamelesi ile değişim olup olmadığı belirlenebilir.
- Belirlenen genlerin metilasyon spesifik PCR'ları gerçekleştirilerek arı zehri melittinin epigenetik yönü belirlenebilir.
- Meme kanseri dışında başka kanser hücre grupları seçilerek ajanların diğer kanser hücrelerinde etkisi araştırılabilir. Diğer genler ile ilişkileri değerlendirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Alhmoud, J. F., Woolley, J. F., Al Moustafa, A.-E., & Malki, M. I. (2020). DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers*, 12(4), 1050. <https://doi.org/10.3390/cancers12041050>
- Ali, M. (2012). Studies on bee venom and its medical uses. *Int J Adv Res Technol*, 1(2), 69-83.
- Bogdanov, S. (2016). Biological and therapeutic properties of bee venom. *Bee Product Science*.
- Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez, A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications. *Nutrients*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/nu12113360>
- Chen, J., Guan, S.-M., Sun, W., & Fu, H. (2016). Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom. *Neuroscience Bulletin*, 32(3), 265-272. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0024-y>
- Jo, M., Park, M. H., Kollipara, P. S., An, B. J., Song, H. S., Han, S. B., Kim, J. H., Song, M. J., & Hong, J. T. (2012). Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(1), 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.009>
- Khalil, A., Elesawy, B. H., Ali, T. M., & Ahmed, O. M. (2021). Bee Venom: From Venom to Drug. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16), 4941. <https://doi.org/10.3390/molecules26164941>
- King, T. P., Jim, S. Y., & Wittkowski, K. M. (2003). Inflammatory Role of Two Venom Components of Yellow Jackets (*Vespula vulgaris*): A Mast Cell Degranulating Peptide Mastoparan and Phospholipase A1. *International Archives of Allergy and Immunology*, 131(1), 25-32. <https://doi.org/10.1159/000070431>
- Lee, G., & Bae, H. (2016). Anti-Inflammatory Applications of Melittin, a Major Component of Bee Venom: Detailed Mechanism of Action and Adverse Effects. *Molecules*, 21(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/molecules21050616>

- Lee, M.-T., Sun, T.-L., Hung, W.-C., & Huang, H. W. (2013). Process of inducing pores in membranes by melittin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14243-14248. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307010110>
- Memariani, H., Memariani, M., Moravvej, H., & Shahidi-Dadras, M. (2020). Melittin: A venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(1), 5-17. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03674-0>
- Shkenderov, S., & Koburova, K. (1982). Adolapin—A newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon*, 20(1), 317-321. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90234-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90234-3)
- Terwilliger, T. C., Weissman, L., & Eisenberg, D. (1982). The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophysical Journal*, 37(1), 353-361. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(82\)84683-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(82)84683-3)
- Uddin, M. B., Lee, B.-H., Nikapitiya, C., Kim, J.-H., Kim, T.-H., Lee, H.-C., Kim, C. G., Lee, J.-S., & Kim, C.-J. (2016). Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. *Journal of Microbiology*, 54(12), 853-866. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6376-1>
- Weis, W. A., Ripari, N., Conte, F. L., Honorio, M. da S., Sartori, A. A., Matucci, R. H., & Sforcin, J. M. (2022). An overview about apitherapy and its clinical applications. *Phytomedicine Plus*, 2(2), 100239. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100239>
- Yu, X., Chen, L., Liu, J., Dai, B., Xu, G., Shen, G., Luo, Q., & Zhang, Z. (2019). Immune modulation of liver sinusoidal endothelial cells by melittin nanoparticles suppresses liver metastasis. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08538-x>
- Ali, M., 2012. Studies on bee venom and its medical uses. *Int J Adv Res Technol* 1, 69–83.
- Bogdanov, S., 2016. Biological and therapeutic properties of bee venom. *Bee Prod. Sci.*
- Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez, A., Simal-Gandara, J., 2020. Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications. *Nutrients* 12, 3360. <https://doi.org/10.3390/nu12113360>
- Chen, J., Guan, S.-M., Sun, W., Fu, H., 2016. Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom. *Neurosci. Bull.* 32, 265–272. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0024-y>
- Cooper, G.M., 2000. The Development and Causes of Cancer. *Cell Mol. Approach* 2nd Ed.
- Jo, M., Park, M.H., Kollipara, P.S., An, B.J., Song, H.S., Han, S.B., Kim, J.H., Song, M.J., 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, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.009>
- Khalil, A., Elesawy, B.H., Ali, T.M., Ahmed, O.M., 2021. Bee Venom: From Venom to Drug. *Mol. Basel Switz.* 26, 4941. <https://doi.org/10.3390/molecules26164941>
- King, T.P., Jim, S.Y., Wittkowski, K.M., 2003. Inflammatory Role of Two Venom Components of Yellow Jackets (*Vespula vulgaris*): A Mast Cell Degranulating Peptide Mastoparan and Phospholipase A1. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131, 25–32. <https://doi.org/10.1159/000070431>
- Lee, G., Bae, H., 2016. Anti-Inflammatory Applications of Melittin, a Major Component of Bee Venom: Detailed Mechanism of Action and Adverse Effects. *Molecules* 21, 616. <https://doi.org/10.3390/molecules21050616>
- Lee, M.-T., Sun, T.-L., Hung, W.-C., Huang, H.W., 2013. Process of inducing pores in membranes by melittin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 14243–14248. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307010110>
- Memariani, H., Memariani, M., Moravvej, H., Shahidi-Dadras, M., 2020. Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 39, 5–17. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03674-0>
- Mir Hassani, Z., Nabiuni, M., Parivar, K., Abdirad, S., Karimzadeh, L., 2021. Melittin inhibits the expression of key genes involved in tumor microenvironment formation by suppressing HIF-1 α signaling in breast cancer cells. *Med. Oncol.* 38, 77. <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01526-6>
- Shkenderov, S., Koburova, K., 1982. Adolapin - A newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon* 20, 317–321. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90234-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90234-3)
- Terwilliger, T.C., Weissman, L., Eisenberg, D., 1982. The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophys. J.* 37, 353–361. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(82\)84683-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(82)84683-3)
- Uddin, M.B., Lee, B.-H., Nikapitiya, C., Kim, J.-H., Kim, T.-H., Lee, H.-C., Kim, C.G., Lee, J.-S., Kim, C.-J., 2016. Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. *J. Microbiol.* 54, 853–866. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6376-1>
- Uzuner, S.Ç., Birinci, E., Tetikoğlu, S., Birinci, C., Kolaylı, S., 2021. Distinct Epigenetic Reprogramming, Mitochondrial Patterns, Cellular Morphology, and Cytotoxicity after Bee Venom Treatment. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 16, 377–392. <https://doi.org/10.2174/1574892816666210422125058>

- Weis, W.A., Ripari, N., Conte, F.L., Honorio, M. da S., Sartori, A.A., Matucci, R.H., Sforcin, J.M., 2022. An overview about apitherapy and its clinical applications. *Phytomedicine Plus* 2, 100239. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100239>
- Yu, X., Chen, L., Liu, J., Dai, B., Xu, G., Shen, G., Luo, Q., Zhang, Z., 2019. Immune modulation of liver sinusoidal endothelial cells by melittin nanoparticles suppresses liver metastasis. *Nat. Commun.* 10, 574. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08538-x>



ÖZGEÇMİŞ

Nur Sena SİVRİ, İlköğrenimini 24 Kasım İlköğretim Okulu'nda bitirdikten sonra 2017 yılında Gebze Anibal Anadolu Lisesi'nde lise eğitimini tamamladı. 2017 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne başlayarak 2021 yılında mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında tezli yüksek lisansa başladı.

