

**BAL ARISI VENOMUNUN ADİPOZ DOKU KÖKENLİ
MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİ**

**EFFECTS of HONEY BEE VENOM on ADIPOSE TISSUE-
DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS**

MELİS SESLİ

PROF. DR. MEHMET ALİ ONUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

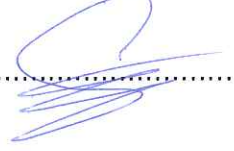
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

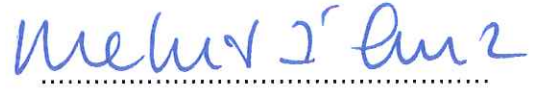
2018

MELİS SESLİ 'nin hazırladığı “**Bal Arısı Venomunun Adipoz Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücreler Üzerine Etkileri**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

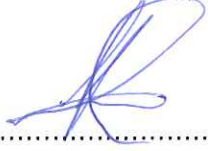
Prof. Dr. Ergi Deniz ÖZSOY
Başkan



Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR
Danışman



Prof. Dr. Kadriye SORKUN
Üye



Prof. Dr. Nuran DİRİL
Üye



Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN
Üye



Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Annem Sevtap ATAY, anneannem Cemile Türkan ATAY, dayım Serkan ATAY ve
teyzem Sedef BALIKCIOĞLU'na

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

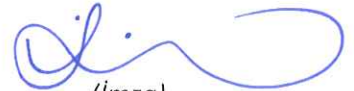
- ☒ **Tezimin/Raporumun 07.06.2018 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım taktirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

07 / 06 / 2018


(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

MEHMET SEZGİ

ETİK

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

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

beyan ederim.

07/06/2018

MELİS SESLİ

ÖZET

BAL ARISI VENOMUNUN ADİPOZ DOKU KÖKENLİ MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

Melis SESLİ

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Haziran 2018, 55 sayfa

Bu yüksek lisans tezi kapsamında, kompleks yapıda bir bileşik olan bal arısı (*Apis mellifera*) venomunun adipoz doku kökenli mezenşimal kök hücreler (MKH) üzerine etkileri araştırılmıştır.

İlk aşamada, laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarımız kapsamında izole edilerek dondurulmuş olan adipoz doku kökenli MKH'ler, standart kültür koşullarında kültüre alınarak, bu hücreler üzerine belirli venom konsantrasyonları uygulanmıştır. Venomun, hücreler üzerindeki konsantrasyona ve zamana bağlı sitotoksik etkisi 4, 24, 48 ve 72. saatlerde MTT hücre canlılık analizi ile ölçülmüştür. Analiz sonuçlarına göre, bir sonraki deney aşamasında hücrelere uygulanacak doz 50 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, venomun adipoz doku kökenli MKH'ler üzerindeki adipojenik farklılaştırma potansiyeli incelenmiştir. Bu amaç ile pozitif ve negatif kontrol grupları ve arı venomu uygulanan deney grubu oluşturulmuş ve venom uygulanan grup, 21 gün boyunca 50 mg/ml venom konsantrasyonu ile muamele edilmiştir. Ardından 7, 14 ve 21. günlerde Oil Red O boyaması yapılarak hücrelerin içerisindeki nötral lipid damlacıkları gösterilmiştir. Negatif kontrol grubundaki hücrelerde beklenildiği üzere herhangi bir adipojenik farklılaşma görülmezken, pozitif kontrol grubundaki hücrelerde dördüncü günden itibaren lipid damlacıkları görülmeye başlanmıştır. Venom uygulanan gruptaki hücreler, pozitif

kontrol grubundaki hücreler ile morfolojik olarak karşılaştırıldığında ise venom uygulanan hücrelerin henüz hipertrofi göstermeyip, kök hücre morfolojilerini korudukları görülmüş; ancak hücrelerdeki granüler yapıdaki lipid damlacıklarının oluşumu Oil Red O boyaması ile gösterilebilmiştir.

Elde edilen tüm bu sonuçlardan yola çıkarak literatürde ilk kez, herhangi bir adipojenik besiyeri kullanılmaksızın, arı venomunun adipoz doku kökenli MKH'leri adipojenik yönde uyardığı ve hücrelerde adipojenezi başlattığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Apis mellifera*, bal arısı venomu, adipoz doku kökenli MKH'ler, sitotoksiste, adipojenik farklılaşma potansiyeli, Oil Red O



ABSTRACT

EFFECTS of HONEY BEE VENOM on ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

Melis SESLİ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

June 2018, 55 pages

Within the scope of this master thesis, effects of complex compound, honey bee (*Apis mellifera*) venom, on adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (MSCs) were investigated.

In the first stage, adipose tissue-derived MSCs which were isolated and freezed previously in our studies, were cultured in standard medium conditions and treated with certain concentrations of venom. Dose and time-dependent cytotoxicity of the venom was measured at 4, 24, 48 and 72 h with MTT cell viability analysis. According to these results, 50 mg/ml venom concentration was determined to be applied on cells in the upcoming experimental stage.

In the second stage of the study, adipogenic differentiation effect of the venom on adipose tissue-derived MSCs were investigated. For this purpose, positive and negative control groups and venom-applied experimental group were created and the venom group was treated with 50 mg/ml venom concentration during 21 days. Then, Oil Red O staining was performed on 7, 14 and 21 days to observe the neutral lipid droplets inside the cells. When the cells of the negative control group showed no adipogenic differentiation as expected, the cells of the positive control group had lipid droplets observed starting from day four. When two groups (positive control group and venom-applied group) were compared morphologically, it is observed

that venom-applied cells showed no hypertrophy and maintained their stem cell morphologies; however, the formation of granular lipid droplets inside the cells was shown by Oil Red O staining.

Considering all of these results, for the first time in the literature, it is shown that the honey bee venom led adipose tissue-derived MSCs into adipogenic lineage and induced adipogenesis in these cells without using an adipogenic media.

Keywords: *Apis mellifera*, honey bee venom, adipose tissue-derived MSCs, cytotoxicity, adipogenic differentiation potential, Oil Red O



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, FHD-2016-11684 proje numarası ile Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir. Çalışmaya olan desteklerinden dolayı Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca örnek aldığım, öğrencisi olarak beni kabul ederek beni onurlandıran, bilgisiyle ve tecrübesiyle bana yol gösteren, çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen, anlayışı ve sabrı ile bilim insanı olma yolunda bana ışık tutan değerli danışman hocam **Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR'a** saygılarımı ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sadece bu çalışmada değil, tek bir soru işaretim olduğunda dahi her zaman bana sabırla yardım eden ve değerli vakitlerini benimle paylaşarak yanımda olan **Dr. Esin AKBAY ÇETİN** ve **Dr. Handan SEVİM'e**; bilgileriyle beni aydınlatan değerli hocam **Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR** ve **Araş. Gör. Özbeyen ATALAY'a**; neşesi, dostluğu ve yardımlarıyla yanımda olan **Merve SAYIN'a** sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunmaktan onur duyarım.

Bilimsel düşüncenin ne anlama geldiğini bana öğreten ve üzerimde sayısız emeği olan değerli hocalarım **Prof. Dr. Şayeste DEMİREZEN**, **Dr. Güler Hanife Tanır DÖNMEZ** ve **Uzm. Remma Pamir GÜLSOY'a** şükranlarımı sunarım.

Yan yana olamasak da, kalplerimizin her daim birlikte attığı, bana güç veren değerli dostum **Görkem Nil KESİKBAŞ'a**; tez çalışmam boyunca akademik yazılımlara erişebilmem adına sunduğu kaynaklardan öte, sevgisi, saygısı ve anlayışı ile yanımda olan **Ali DANACI'ya** sonsuz teşekkür ederim.

Ve son olarak bu günlere gelmemin en değerli sebebi ailem... Sizlere layık bir evlat olabilmek için her konuda sonsuz emek vermeye devam edeceğimden hiç şüphenez olmasın. Kalbimin attığı her an kadar sizlere teşekkür ederim. Minnettarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER	viii
ÇİZELGELER	ix
EKLER.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Apis mellifera</i> (Bal Arısı)	2
2.2. Bal Arısının Biyolojisi	3
2.2.1. Venom Aparatı	4
2.3. Bal Arısı Venomu	6
2.3.1. Arı Venomunun Bileşenleri.....	7
2.4. Kök Hücreler ve Genel Özellikleri	9
2.5. Mezenşimal Kök Hücreler (MKH)	10
2.5.1. MKH'lerin Kaynakları ve Farklı Doku Kökenli MKH'ler	11
2.6. Adipoz Doku Kökenli MKH'ler	13
2.6.1. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin Adipojenik Farklılaşması	14
2.7. Bal Arısı Venomu ile Yapılan Hücre Kültürü Çalışmaları	16
2.8. Farklı Canlı Türlerine Ait Venomun MKH Farklılaşması Üzerine Etkileri	17
2.9. Bal Arısı Venomunun MKH Farklılaşmasındaki Roller.....	18
2.10. Tez Çalışmasının Amacı.....	19
2.11. Tez Çalışma Planı	20
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	22
3.1. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü.....	22
3.2. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin Karakterizasyonu	23
3.2.1. Akış Sitometri Analizi ile Karakterizasyon	23
3.2.2. İmmünfloresan Boyama ile Karakterizasyon.....	24
3.3. Bal Arısı Venomunun Eldesi ve HPLC Analizi ile Karakterizasyonu.....	24
3.4. Arı Venomunun Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi	25

3.5. Arı Venomunun Adipoz Doku Kökenli MKH'ler Üzerinde Adipojenik Farklılaştırma Potansiyelinin İncelenmesi.....	26
3.5.1. Adipojenez Seviyesinin Skorlanması	27
3.5.2. Oil Red O Boyaması	27
3.6. İstatistiksel Analizler	27
4. BULGULAR	28
4.1. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü.....	28
4.2. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin Karakterizasyonu	28
4.2.1. Akış Sitometri Analizi ile Karakterizasyon	29
4.2.2. İmmünfloresan Boyama ile Karakterizasyon.....	30
4.4. Arı Venomunun Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi.....	32
4.5. Arı Venomunun Adipoz Doku Kökenli MKH'ler Üzerinde Adipojenik Farklılaştırma Potansiyelinin İncelenmesi.....	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	43
6. KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Bal Arısının (<i>Apis mellifera</i>) Genel Görünümü	2
Şekil 2.2. Venom Aparatının Yapısı. Venom Kesesi, Venomun Pompalanmasını Sağlayan Kas Grubu ve Yapısında Çengeller Bulunan Lansetler [9].....	5
Şekil 2.3. Arı Venomunun Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi Sonucu Elde Edilen Protein Fraksiyonu [13]..	7
Şekil 2.4. MKH Kaynakları, Pozitif ve Negatif Yüzey Belirteçleri ve Farklılaşma Özellikleri [27].....	13
Şekil 2.5. Preadipositlerin Adipositlere Farklılaşması [31].....	15
Şekil 3.1. Hücre Kültürü Çalışmalarının Yapıldığı Çalışma Kabini.	23
Şekil 3.2. Çalışmalarda Kullanılan Arı Venomunun HPLC Analizi Sonuçları (New Technology Laboratory, Gürcistan).....	25
Şekil 4.1. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin P/3'deki Morfolojisi.....	28
Şekil 4.2. Sıçan Adipoz Doku Kökenli MKH'lerinin Akış Sitometri Analizi Sonuçları	30
Şekil 4.3. P/3'deki MKH'lerin (A) CD13, (B) CD29 Yüzey Antijenlerine Ait Floresan Boyama Görüntüleri.	31
Şekil 4.4. Arı Venomunun Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin Hücre Canlılığına Olan Etkisinin Zamana ve Konsantrasyona Bağlı Değişimi	33
Şekil 4.5. MKH'lerin Adipojenez Seviyeleri.....	38
Şekil 4.6. Negatif Kontrol Grubu. Adipojenik Farklılaşma Göstermeyen MKH'ler ve Hematoksilen ile Boyanan Çekirdekleri.....	39
Şekil 4.7. Adipojenik Besiyeri ile Uyarılan Pozitif Kontrol Grubundaki Hücrelerde, Dördüncü Günden İtibaren Morfolojik Olarak Görülmeye Başlanan Nötral Lipid Damlacıkları.	40
Şekil 4.8. Pozitif Kontrol Grubu. Adipojenik Farklılaşma Göstermiş Olan ve Nötral Lipid Damlacıkları Oil Red O ile Boyanmış MKH'ler. (A) 7. Gün, (B) 14. Gün, (C) 21. Gün.....	41
Şekil 4.9. Venom Uygulanan Deney Grubu. Adipojenik Farklılaşma Göstermiş Olan ve Nötral Lipid Damlacıkları Oil Red O ile Boyanmış MKH'ler. (A) 7. Gün, (B) 14. Gün, (C) 21. Gün.....	42

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Arı Ailesindeki Bireyler ve Özellikleri.....	3
Çizelge 4.1. Çalışmamızda Kullanılan Parametreler ve Değerleri.....	32
Çizelge 4.2. 50 mg/ml Venom Konsantrasyonu ile Diğer Konsantrasyonlar Arasında Gözlemlenen, Saatlere Göre P Anlamlılık Düzeyleri.....	34
Çizelge 4.3. Arı Venomunun Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin Hücre Canlılığına Olan Etkisinin Zamana ve Konsantrasyona Bağlı Olarak Ortalama $\pm$ Standart Sapma Değerleri ile Gösterilmesi.....	35



EKLER

EK 1. İmmünfloresan Boyama Protokolü.....	52
EK 2. MTT Analizi Protokolü.....	53
EK 3. Oil Red O Boyama Protokolü.....	54



1. GİRİŞ

Apis mellifera, Hymenoptera takımının, Apidae familyasının, Apis cinsine ait bir türdür. Ülkemizde Anadolu'nun sahip olduğu çok çeşitli iklim koşulları, coğrafi zenginlik, floral çeşitlilik ve Asya, Avrupa ve Afrika arasında adeta bir köprü görevi görüyor oluşu Anadolu'yu, bal arılarının ana vatanlarından biri haline getirmiştir. Ülkemizde bulunan arı ırklarının çeşitliliği, Türkiye'yi hem koloni varlığı hem de bal üretimi bakımından dünya ikinciliğine taşımıştır.

Arı ürünlerinin her geçen gün artan değeri, özellikle bu ürünlerden olan arı venomunun insan sağlığı açısından terapötik etkileri üzerine sayısız araştırmanın yapılmasına olanak sağlamıştır. Venom içeriğindeki bileşenler araştırılmış ve edinilen bilgiler ışığında, venomun kanser hücrelerini baskılayıcı (anti-kanser) ve tümör gelişimini engelleyici (anti-tümör) özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. Bunlara ek olarak venom, kronik ağrı, artrit, multipl skleroz ve deri hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavisinde de klinikte alternatif bir tedavi yöntemi olarak uygulanmıştır.

Venomun terapötik bir ajan olarak anti-kanser özelliğinin yanı sıra, hücrelerdeki anti-proliferatif etkisinden ve hücreleri farklılaştırma potansiyelinden de yararlanılmaktadır. Kemik iliği ve göbek kordonundan izole edilen mezenseşimal kök hücreler (MKH) ile yapılan çalışmalarda, bal arısı venomunun bu hücrelerde osteojenik ve kondrojenik farklılaşmayı uyardığı gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında ise literatürde ilk kez, adipoz doku kökenli MKH'lere bal arısı venomu uygulandığında, kültür ortamında adipojenik besiyeri olmaksızın venomun, tek başına bu hücreleri adipojenik yönde farklılaştırma potansiyeli olduğu görülmüş ve hücrelerde gerçekleşen adipojenez düzeyleri gösterilmiştir.

Böylece adipojenezin tamamlanmasının ardından olgun adipositlere farklılaşacak olan adipoz doku kökenli MKH'lerin, doku mühendisliği alanında kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu hücrelerin çeşitli aşamalardan geçirildikten sonra, klinikte kullanılmak üzere hazırlanarak uygun yağ doku iskeleleri ile bir araya getirilmesi ve bu sayede yumuşak doku hasarlarının ve kayıplarının giderilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Apis mellifera* (Bal Arısı)

Apis mellifera, Hymenoptera takımının, Apidae familyasının, Apis cinsine ait bir türdür. Bal arısı, bir kurama göre Tropikal Afrika'dan köken almış, Güney Afrika'dan Kuzey Avrupa ve Batı Asya'ya doğru yayılım göstermiştir [1]. Ülkemizde ise Anadolu'da çok çeşitli iklim koşullarının var olması, Anadolu'nun coğrafik ve floral yöndeki zenginliği ve Asya, Avrupa ve Afrika arasında adeta bir köprü görevi üstleniyor olması birçok canlının yanı sıra, bal arılarına da ev sahipliği yapmasına neden olmuştur.



Şekil 2.1. Bal arısının (*Apis mellifera*) genel görünümü

Anadolu'da birçok arı ırkı bulunmakla birlikte ülkemiz, bal arısı ırklarına göre yedi bölgeye ayrılmaktadır. Türkiye'nin Kuzey ve Güney Doğusunda, Batısında ve Orta Anadolu'da olmak üzere dört belirgin bal arısı bulunmaktadır ve diğer bölgelerdeki bal arıları ise bu dört bal arısının hibridleridir [2]. Ülkemizde bulunan başlıca bal arısı kültür ırkları ise şunlardır:

- 1) *Apis mellifera anatolica* (Orta ve Batı Anadolu'da, Anadolu arısı),
- 2) *Apis mellifera remipes* (Doğu Anadolu'da, Sarı-Trans Kafkas arısı),
- 3) *Apis mellifera caucasica* (Kuzey Doğu Anadolu'da, Kafkas arısı),
- 4) *Apis mellifera syriaca* (Güneydoğu Anadolu'da, Suriye arısı),

5) *Apis mellifera meda* (Güneydoğu Anadolu'da, İran arısı).

Ülkemizdeki bu çeşitlilik, arıcılık sektörünün gelişmesine olanak sağlamış, arı ve arı ürünlerini hem dünyada hem de Türkiye'de yükselen bir değer konumuna getirmiştir [3].

2.2. Bal Arısının Biyolojisi

Bal arıları, büyük koloniler oluşturan sosyal böceklerdir ve büyük koloniler yaklaşık 30,000-50,000 arıdan oluşmakta ve bu topluluklara arı ailesi adı verilmektedir [4, 5]. Koloni oluşturan türlerin yanı sıra, tekil yaşayan bal arısı türleri de bulunmaktadır [4]. Küçük bir arı kovanında yaklaşık 20,000 arı bulunmakta ve arılar kendi içlerinde ana arı, erkek arı ve işçi arı olmak üzere üç bireye ayrılmaktadır [1] (Çizelge 1, [1, 5]'den uyarlanmıştır).

Çizelge 2.1. Arı ailesindeki bireyler ve özellikleri			
	Ana Arı	Erkek Arı	İşçi Arı
Boyut	Büyük	Orta	Küçük
Cinsiyet	Dişi	Erkek	Dişi
Yaşam Süresi	3-4 yıl	İlkbaharda 21-32 gün Yazın 90 gün	Yazın 40-60 gün (ölene dek çalışma) Kışın 4-6 ay
Kovandaki Sayı	1	~2000 ya da 0	20.000-80.000
İşlevler	Çiftleşme, Günde 1500, yılıda 200.000 döl verme Feromon salgılama, Kovan düzenini sağlama.	Genç ana arı ile çiftleşme	Ana arıyı besleme, Larva, genç erkek arılar ve ana arı ile ilgilenme, Petek yapma, Kovanı temizleme, havalandırma ve koruma Arı sütü ve balmumu salgılama, Nektar, polen, propolis toplama vb., Su taşıma, Balı olgunlaştırma.

Bal arılarının vücudu baş, göğüs ve abdomen (karın) olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Baş kısmında bulunan bir çift anten, duyu organı (koku, tat, dokunma)

olarak görev yapmaktadır. Yalayıcı-emici ağız tipine sahip olan bal arılarında, alt çene ve alt dudak uzayarak probosis adı verilen hortum şeklindeki yapıyı oluşturmaktadır. Bu yapı, dil ile birlikte sıvı besinin (nektar, bal, su) alınmasını sağlamakta ve hayvanın beslenmesi bittikten sonra probosis kıvrılarak başın arka kısmına katlanmaktadır [6].

Arının göğüs kısmı üç segmentten oluşmakta ve bu segmentlerde toplam iki çift kanat ve üç çift eklem bacak bulunmaktadır. Öndeki bir çift bacak, antenlerin temizlenmesi için kullanılırken; orta bacaklar, yürüme, denge sağlama ve polenin arka bacakta bulunan polen sepetine taşınmasında görev almaktadır. Arka bacaklar ise poleni kovana getirmektedir [5,6].

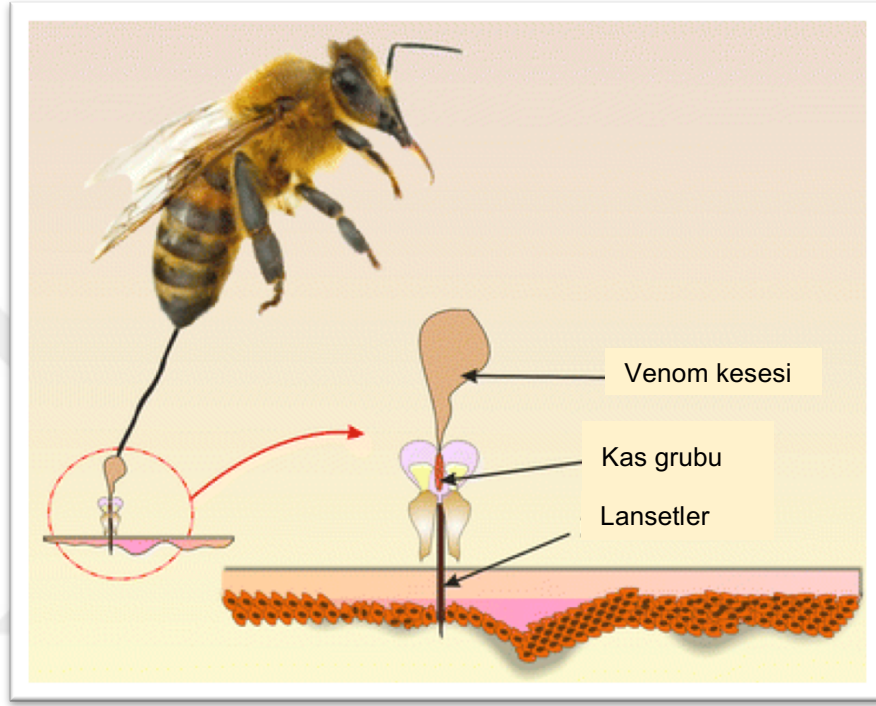
Arıların abdomeninde iç organlar, balmumu bezleri ve iğne bulunmaktadır. Larvada 10 adet abdomen segmenti bulunurken, ergin arıda 9 adet abdomen segmenti bulunmakta ve ana arı ve işçi arılarda abdomenin sonunda bir venom aparatı yer almaktadır [6].

2.2.1. Venom Aparatı

Sokabilen tüm böcekler Hymenoptera takımına aittir. Bal arıları kendilerini tehlikede hissetmedikleri ve rahatsız edilmedikleri sürece sokma davranışı göstermemektedir. Bu canlıların dişilerinde modifiye olmuş bir ovipozitör bulunmakta ve bu yapı, sokma aparatı olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle sadece dişiler, yani ana arı ve işçi arılar sokma davranışı göstererek kendilerini savunmaktadır [4].

İğne, kompleks bir morfolojidedir. Yapısında iki adet paralel lanset ve bu lansetlerin üzerinde geriye doğru bakan çengeller bulunmaktadır (Şekil 2.2). Bu çengeller, iğnenin dokuya daha derin bir şekilde girmesini sağlamaktadır. İğne, venom kesesi ve kas grubu ile bağlantılıdır ve iğnenin merkezinde, venomun akıtılacağı bir venom kanalı bulunmaktadır [4]. İğne, kullanılmadığı süre zarfında yedinci abdominal segmentin (A7) iğne çemberi adı verilen boşluğunda muhafaza edilmektedir [7,8]. Sokma davranışı esnasında iğne dışarı çıkarılmakta ve lansetler deriye girmektedir. Hayvan soktuğu zaman, iğnenin yapısında bulunan çengeller dokuya saplanmakta

ve böylece venom kanalı ile birlikte venomun, dokunun derinliklerine daha etkili bir şekilde enjekte edilmesi sağlanmaktadır. Fakat dokuya saplanan çengellerden dolayı hayvan, dokudan uzaklaşmaya çalışırken kaslar yırtılmakta ve bu yırtılma sonucu iğne, venom bezi ve venom kesesi hayvandan ayrılarak hayvanın ölümüne neden olmaktadır [4,7].



Şekil 2.2. Venom aparatının yapısı. Venom kesesi, venomun pompalanmasını sağlayan kas grubu ve yapısında çengeller bulunan lansetler [9].

Venom bezi, venomu geniş kese içerisine salgılayan uzun, ince ve integumenter bir bezdir. Metamorfozun tamamlanmasından iki ya da üç hafta sonra işçi arı, kovayı savunmaya başladığı andan itibaren keselerdeki venom miktarı maksimum düzeye ulaşmaktadır. İşçi arı nektar ve polen topladığı zamanlarda ise venom miktarı giderek azalmaktadır [4]. Ana arının venom kesesindeki venom miktarı ise özellikle acil durumlarda maksimum düzeye ulaşmaktadır. Ana arılar için acil durum, diğer ana arılar ile savaşma ve onları öldürme davranışına karşılık gelmektedir [7].

İnsan derisinde ise iğne, subkutanöz dokuya iki-üç mm girmekte ve arılar 50-100µg venom enjekte etmektedir [4].

2.3. Bal Arısı Venomu

Bal arısı venomu, suda çözünebilen, renksiz, kokusuz, sulu yapıda bir maddedir ve keskin ve acı bir tada sahiptir [5,7]. Venom kurutulduğu zaman rengi açık sarıya dönmektedir. Rengi kahverengiye çalan kurutulmuş venomların ise, içeriğinde bulunan bazı proteinlerin oksidasyona uğradığı ve başka materyaller ile kontamine olduğu yorumu getirilebilmektedir. Arı öldüğü zaman, venomun içeriği neredeyse tamamen bozulmaktadır [7].

Venom, çoğu zaman zehir ile karıştırılan bir terim olmakla birlikte iki terim birbirinden oldukça farklıdır ve bu iki terim, birbiri yerine kullanılmamalıdır. Venom içeren hayvanlar venomlarını, bir hücre grubu veya bir salgı bezi içerisinde üretmektedirler. Bu hayvanlarda, ısırma veya sokma esnasında venomun enjekte edilmesini sağlayan bir venom aparatı bulunmaktadır. Venom aparatı, venomu üreten ve depolayan bir doku (salgı bezi) ve bu dokuyla bağlantılı, içinde oyuk bulunan bir sokma aparatı veya bir dişten (zehir dişi) meydana gelmektedir. Genel olarak venom, bir başka organizmaya parenteral (intravenöz, intradermal, intramuskular, intraperitoneal veya subkutanöz) şekilde uygulandığında etkisini göstermektedir [4].

Zehirli hayvanlar da tıpkı venomlu hayvanlar gibi toksik maddelerini salgı bezleri veya dokularda üretmektedirler fakat bu maddeleri çevreden, diğer hayvanlardan, bitkilerden ya da mikroorganizmalardan da elde edebilmektedirler. Bu maddelere zehir adı verilmekte ve bu zehir, hayvanın vücudundaki belirli organlarda depolanıp biriktirilmektedir. Zehirlenme durumu, hayvanın, avcı tarafından sindirilmesi sonucu meydana gelmektedir. Zehir, etkisini çoğunlukla hayvanın bütününe veya hayvanın zehir içeren vücut parçasının avcı tarafından yenilmesi sonucu gösterebilmektedir. Fakat doğada istisnalar da bulunmaktadır [4].

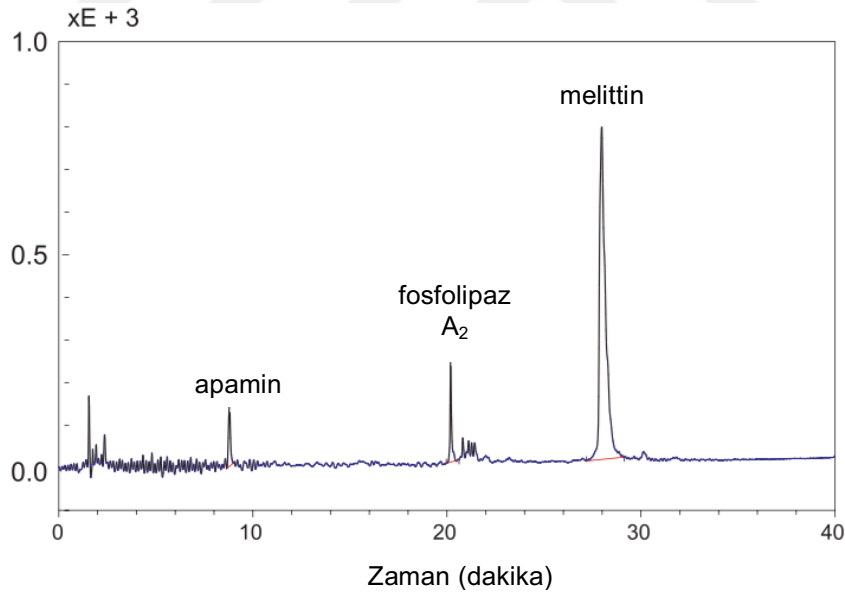
Doğadaki venomlar ve zehirler, tamamen saf maddeler değildir ve birçok toksik etki veya başka bir takım etkiler gösteren bileşenlerden oluşmaktadır. Venom, çoğunlukla peptidler ve proteinlerden oluşurken; zehir, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen ikincil metabolitlerden oluşmaktadır [4].

Venom salgılanmasının öncelikli nedeni, kolonilerin avcılara karşı etkili bir şekilde

savunulmasını sağlamaktır [10]. Savunmada anahtar rol oynayan bu bileşiğin, yapılan araştırmalar sonucu insan sağlığına da önemli katkılarda bulunduğu ve çok çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili olduğu saptanmıştır [11,12]. Bu nedenle venom bileşenleri araştırmacıların dikkatini çekmiş ve bu bileşenler ile ilgili sayısız araştırma yapılmıştır.

2.3.1. Arı Venomunun Bileşenleri

Arı venomu oldukça karmaşık bir yapıdadır. İçeriğinde melittin, apamin, adolapin, MCD (mast cell degranulating) peptidi gibi çeşitli peptidler, fosfolipaz A₂ gibi enzimler, histamin ve epinefrin gibi biyolojik olarak aktif aminler ve bunların yanı sıra lipidler, karbohidratlar ve serbest amino asitler gibi peptid olmayan bileşenler bulunmaktadır [10, 11]. Şekil 2.3'de melittin, apamin ve fosfolipaz A₂ olmak üzere üç ana venom bileşeninin HPLC analizi ile elde edilen protein fraksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.3. Arı venomunun yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizi sonucu elde edilen protein fraksiyonu [13].

Kuru venom ağırlığının %40-50'sini oluşturan ve venomun ana bileşeni olan **melittin**, acı ve ağrıya sebep olan peptiddir. Hücre membranlarına kolaylıkla girerek tetramer bir yapı oluşturmakta ve bu melittin tetramerleri sinir liflerinde

depolarizasyona neden olarak acı ve ağrıya neden oluşturmaktadır [4]. Bunun yanında, eritrosit gibi birçok hücre tipinde ve lizozom gibi hücre içi zarlarda lizizi tetiklemektedir. Bunlara ek olarak, suda çözünür yapıda olmasına rağmen hem doğal hem de sentetik fosfolipid membranları parçalamaktadır. Ayrıca uygulanan konsantrasyona bağlı olarak, kan damarlarının dilatasyonuna ve kasılmasına ve kalp kası hücrelerinin depolarizasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Sahip olduğu yapısal karakteristiklerden ötürü ise kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterebildiği ve anti-inflamatuvar özellikte olduğu saptanmıştır [10,11].

Venom bileşenlerinden olan bir diğer peptid **apamin**, venomun kuru ağırlığının %2-3'lük kısmını oluşturmaktadır. Bir nörotoksin olan apaminin, nöroblastoma hücrelerine ve sıçan kas hücrelerine dışarıdan düşük dozlarda uygulandığında, post-sinaptik membranlarda spesifik bir takım reseptörlere bağlanarak Ca^{2+} 'a bağlı K^+ kanallarını inhibe ettiği ve bu hücrelerde uzun süreli hiperpolarizasyona neden olduğu bildirilmiştir [10, 11].

Venom içeriğinde en çok çalışılan ve en önemli enzim olan **fosfolipaz A₂**, venomun kuru ağırlığının %10-12'sini oluşturmaktadır. Melittin peptidi ile birlikte biyolojik membranlarda fosfolipid tabakasında porlar oluşturarak, bu tabakayı lizise uğratmaktadır. Melittin, membran fosfolipidlerinin fosfolipaz A₂ enziminin katalik bölgesi ile etkileşimini kolaylaştırıcı rol oynamaktadır. Fosfolipidlerin lizisi sonucu açığa çıkan arakidonik asit, lökotrienler ve prostaglandin benzeri moleküllerin sentezini uyarak alerjik reaksiyona neden olmaktadır. Bu nedenle fosfolipaz A₂, en önemli venom alerjisi olarak bilinmektedir [4, 10, 11].

Bir diğer önemli peptid **MCD peptidi**, venomun kuru ağırlığının %2-3'ünü oluşturmakta ve kimyasal olarak apamine benzemektedir. Düşük konsantrasyonlarda uygulandığında mast hücrelerinden histamin salgılanmasını uyardığı, yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında ise histamin salgılanmasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu etkilere, MCD'nin, alerjik reaksiyonlar ile ilgisi olan immunoglobulin E (IgE) ile olan etkileşiminin sebep olabileceği düşünülmüştür. Böylece MCD'nin, anti-alerjenik bir ajan olarak görev yapabildiği gösterilmiştir [10, 11]. Bu etkilerin yanı sıra, MCD'nin voltaj bağımlı K^+ kanallarını inhibe ettiği gözlemlenmiştir [14].

Venomun içerdği tüm bileşenler göz önüne alındığında, venomun hücreler ve immün sistem üzerindeki olumsuz ve zararlı gibi görünen etkileri, araştırmacılar için ümit verici olmuştur. Venom bileşenlerinin araştırılması sonucu edinilen bilgiler ışığında venomun, özellikle kanser hücrelerini baskılayıcı (anti-kanser) ve tümör gelişimini engelleyici (anti-tümör) özelliği üzerine çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalardan olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bunlara ek olarak venom, kronik ağrı, artrit, multipl skleroz, gut hastalığı ve deri hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavisinde klinikte alternatif bir tedavi yöntemi olarak uygulanmıştır. Böylece, bal arısı venomunun terapötik amaçlı kullanımı (apiterapi) yaygınlaşmıştır [10, 12].

2.4. Kök Hücreler ve Genel Özellikleri

Kök hücreler ile ilgili olarak yapılabilecek en öz tanımda şu maddeler yer almaktadır; i. Bu hücreler, kendilerini yenileyebilmekte (kök hücre havuzunu yenileme), ii. Farklı tip hücrelere farklılaşma yetkinlikleri bulunmakta (potensi) ve iii. Klon oluşturabilmektedirler (klonalite) [15-17]. Bu hücreler bulundukları dokuda bir niş içerisinde, kendilerini çevreleyen ekstraselüler matriks ve kendileriyle direkt ya da indirekt olarak etkileşen diğer hücreler ile birlikte, farklılaşmamış halde bulunmaktadır [18].

Dokularda fazla sayıda bulunmayan bu hücreler, yaşamları boyunca sınırlı sayıda bölünmekte ve organizma yaşlandıkça, sayıları azalmaktadır. Bölünme hızları genellikle yavaş olup, herhangi bir doku yaralanması sonrasında yaralanmanın şiddetine göre bölünme hızları artmaktadır. Bu hücreler büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri aracılığıyla aktive olup, çeşitli sinyal yollarını (Wnt, Notch, TGF vb.) etkin bir biçimde kullanabilmektedirler. Bu özelliklerinin yanı sıra kök hücreler, sahip oldukları çeşitli karakteristiklerden ötürü strese karşı direnç gösterebilmektedirler [15].

Bir kök hücre bölündüğü zaman, hücrelerden biri kök hücre olarak kök hücre havuzuna katılırken, diğeri farklılaşma yolunda ilerlemektedir. Bu tip bölünmeye asimetrik hücre bölünmesi adı verilmektedir. Bu durumda, kök hücre havuzundan eksilen kök hücre sayısı tamamlanırken, diğer hücre de farklılaşmadan çoğalmaya

devam etmektedir. Farklılaşmadan çoğalan bu hücrelere **çoğalan geçici hücreler** adı verilmektedir. Çoğalan geçici hücreler ise ortam şartları uygun olduğunda ve belirli sayıya ulaştıklarında farklılaşabilmektedirler [15].

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere dört grupta sınıflandırılmaktadırlar. Totipotent kök hücre (zigot), bir organizmayı bütünüyle meydana getirebilirken, pluripotent kök hücreler (embriyonik kök hücreler) vücutta her türlü hücre tipine dönüşebilmektedir [19]. Multipotent özellik gösteren mezenşimal kök hücreler (MKH) -diğer adıyla yetişkin veya dokuya özgü kök hücreler- hem *in vitro* hem de *in vivo*'da kemik, kıkırdak ve yağ hücresi gibi birçok hücre tipine farklılaşabilmektedir [20]. Unipotent kök hücreler ise sadece bir tip olgun hücre meydana getirebilen hücrelerdir. Bu hücrelere örnek olarak, kasta bulunan miyosatellit hücreleri, korneal epitel hücreleri ve endotelial progenitor hücreler verilebilir [18].

2.5. Mezenşimal Kök Hücreler (MKH)

MKH'ler, embriyo ve fetüs gelişiminde önemli göreve sahip olan ve gevşek bir bağ doku olan mezenşimden köken almaktadırlar [15, 19]. Bu dokuda bulunan MKH'ler, mezoderm kökenli olan kemik, kıkırdak, kas, yağ hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri ve miyositlere farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Bunların yanında MKH'ler, endoderm kökenli olan kardiyomiyosit [21] ve hepatosit [22] gibi hücrelere de dönüşebilmektedirler. MKH'ler *in vitro*'ya alınıp çalışıldığı ve doğal ortamlarından uzaklaştırılarak hücre kültürü koşullarında özel muamele gördüklerinden ötürü, bu hücrelerin *in vivo*'daki tam karşılıkları günümüzde halen tartışma ve araştırma konusudur. Bu nedenle bu hücrelerin *in vitro*'da gösterdikleri işlevleri, *in vivo*'da da aynı şekilde göstermeleri beklenmemeli ve yapılacak olan çalışmalar, bu durum göz önüne alınarak yürütülmelidir [15].

MKH'lerin doğru bir şekilde tanımlanması için Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society for Cellular Therapy, ISCT) tarafından bir takım kriterler oluşturulmuştur. Bu kriterlere göre belirli bir dokudan izole edilen bir hücrenin "mezenşimal kök hücre" tanımını alabilmesi için aşağıda belirtilen özelliklere uyması gerekmektedir [23]:

1. Standart kültür koşullarında muhafaza edildiğinde kültür kabının yüzeyine tutunabilmeli,
2. CD105, CD73 ve CD90 gibi yüzey antijenlerini ifade ederken, CD45, CD34, CD14 ya da CD11b, CD79a ya da CD19 ve HLA-DR gibi yüzey antijenlerini ifade etmemeli,
3. *In vitro* ortamda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücre serilerine farklılaşma potansiyeline sahip olmalıdır.

İlk kez 1968 yılında Friedenstein ve meslektaşları tarafından fare kemik iliğinde tanımlanan MKH'lerin, fibroblastik yapıda ince uzun (iğ) şekilde oldukları, kültür kabının yüzeyine tutunabildikleri ve koloni oluşturabildikleri ifade edilmiş ve bu hücrelerin, potensi göstererek mezodermal kökenli birçok hücre tipine farklılaşabildikleri gözlemlenmiştir [19, 24].

MKH'lerin yüzey antijenleri, karakterizasyon için büyük önem taşımaktadır. Bu hücrelerin gen profili ve fenotipi, hücrelerin bulunduğu dokuya ve bu dokudaki niş'e, *in vitro*'daki kültür koşullarına ve hatta canlının türüne göre çeşitlilik gösterebilmekle birlikte, yukarıda belirtilen ve kabul görmüş yüzey belirteçleri ile MKH'ler, heterojenöz bir hücre popülasyonunda kolaylıkla karakterize edilebilmektedirler [25].

2.5.1. MKH'lerin Kaynakları ve Farklı Doku Kökenli MKH'ler

MKH'ler bol kan damarlı bağ doku içeren doku ve organlarda bulunmaktadır ve kemik iliği, göbek kordonu stroması, dental pulpa, periferik kan, kordon kanı ve yağ doku (adipoz) gibi birçok doku ve organdan izole edilebilmektedirler (Şekil 2.4). Fakat her bir kaynaktan elde edilen MKH'ler, genotipik özellik, farklılaşma potansiyeli, büyüme faktörleri ve sinyal moleküllerine verdikleri cevaplar, salgıladıkları sitokinler ve kemokinler açısından birbirlerinden oldukça farklılık gösterebilmektedirler [15].

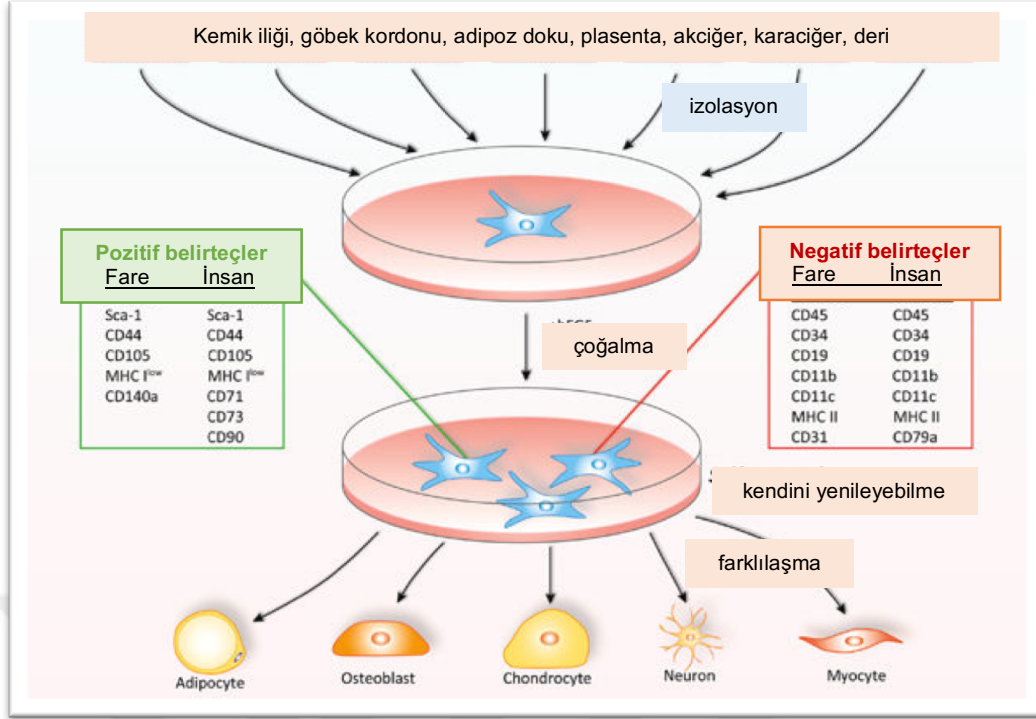
Kemik iliği MKH'leri, kemik iliği biyopsisi ile elde edilmekte ve bu hücreler, genellikle 20 yaştan sonra çoğalma yeteneklerini kaybetmeye başlamaktadır. Göbek kordonu

MKH'leri kemik iliği MKH'leri ile karşılaştırıldığında, göbek kordonu MKH'leri adiposit ve kondrositlere daha yavaş bir şekilde farklılaşmakta; ancak daha kısa sürede çoğalarak, daha geç yaşlanmaktadır [26].

Dental pulpa MKH'leri nöral krest hücrelerinden köken almakta, nestin gibi nöral hücre belirteçlerini ifade etmekte ve nöronlara farklılaşabilmektedir. Bu nedenle bu hücreler, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve omurilik yaralanmalarının tedavisi için prelinik olarak araştırılmaktadır [26].

Periferik kanda çok az sayıda MKH bulunurken; kordon kanının %10-30'undan MKH izolasyonu yapılabilmektedir. Kültür kabının yüzeyi fetal dana serumu (FBS) ile kaplandığında, kordon kanından izolasyon oranının arttığı görülmüş; fakat bu hücrelerin kültür kabının yüzeyinde çoğalmalarının oldukça uzun sürdüğü (2-4 hafta) belirtilmiştir [26].

Adipoz doku MKH'lerinin ise, kemik iliği MKH'lerine oranla daha fazla sayıda izole edilebilmesi ve adipoz dokunun kolay ve bol bir şekilde elde edilebilir olmasından dolayı adipoz doku MKH'leri, çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [19].



Şekil 2.4. MKH kaynakları, pozitif ve negatif yüzey belirteçleri ve farklılaşma özellikleri [27].

2.6. Adipoz Doku Kökenli MKH'ler

Adipoz doku kökenli MKH'ler, lipoemilim (liposuction) sonucu elde edilen lipoaspiratlardan veya subkutanöz adipoz doku fragmentlerinden fazla sayıda elde edilebilmekte ve *in vitro*'da kolaylıkla çoğaltılabilmektedirler. Bu hücreler, adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik yönde farklılaşma potansiyellerine sahiptirler [23].

Adipoz doku, adipositler ve onları çevreleyerek destekleyen heterojenöz hücre popülasyonlarından oluşmakta ve hücre izolasyonu esnasında toplanan damarca zengin olan bu adipoz dokuya stromal vasküler fraksiyon (SVF) adı verilmektedir. SVF'de multipotent adipoz doku kökenli MKH'lerin yanı sıra endotel hücreleri, fibroblastlar, kan hücreleri, perisitler ve preadipositler bulunmaktadır. Multipotent özellikteki bu adipoz doku kökenli MKH'ler, karışık hücre popülasyonundan kültür kabı yüzeylerine tutunma özelliği ile ayrılmaktadırlar [23, 24].

Kültür kabının yüzeyine tutunan adipoz doku kökenli MKH'ler, kültüre alındıkları süre boyunca uzun-ince, fibroblastik yapıda bir hücre morfolojisi göstermekte ve kemik iliği kökenli MKH'ler ile kıyaslandıklarında genetik olarak daha stabil bir yapı sergilemektedirler [23, 24].

Kemik iliği kökenli MKH'lerin toplanma yöntemi acı vermekte ve aspirasyon sonucu elde edilen hücre sayısı yetersiz kalmaktadır. Adipoz dokudan ise tek seferde bol miktarda kök hücre toplanabilmektedir. 100 g adipoz dokudan, 100 ml kemik iliği aspiratından elde edilen kök hücre sayısının 300 katı kadar kök hücre elde edilebilmektedir [24]. Bu nedenle adipoz doku, kök hücrelerin elde edilmesinde sıklıkla tercih edilen kemik iliğine alternatif, güçlü bir kaynak olarak günümüzde tercih edilmektedir.

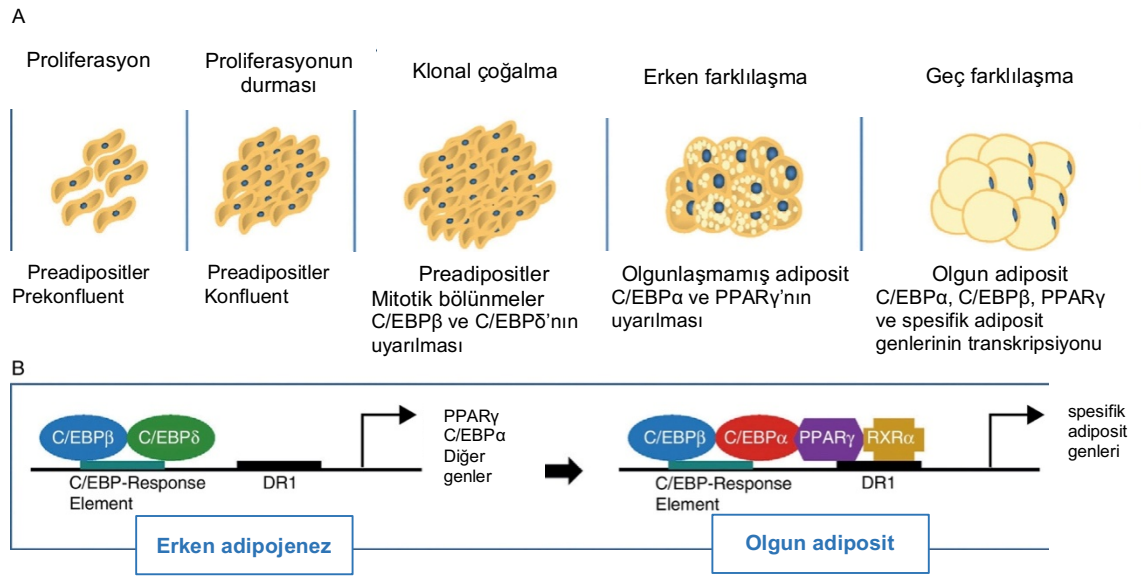
2.6.1. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin Adipojenik Farklılaşması

MKH'lerin hücre kültürü koşullarında adipojenik farklılaşması, fibroblastik morfoloji gösteren MKH'lerin, multiloküler lipid tanecikleri içeren preadipositlere dönüşümü ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.5). Bu süreçte MKH'ler, bir takım sinyaller aracılığıyla adipojenik yola girmektedirler. Hücre bölünmesinin G₁ aşamasında çeşitli transkripsiyon faktörleri sentezlenerek hücrelerdeki glukoz ve lipid metabolizması başlatılmaktadır. Lipid sentezinin başlamasından ötürü hücre sitoplazmasında lipid granülleri artmakta ve bu nedenle hücre, hacmini genişleterek (hipertrofi) yuvarlak bir morfoloji göstermektedir. Farklılaşmanın son aşamasında ise bu granüller birleşip tek bir lipid taneciği haline gelerek olgun adiposit oluşumu gözlemlenmektedir [15].

Hücre sitoplazmasında biriken lipid damlacıkları, Oil Red O boyası ile ışık mikroskopunda kırmızı renkte gözlemlenebilmektedir. Oil Red O boyası, yağda çözünebilir ve adipositlerdeki nötral lipid damlacıklarının saptanmasında sıklıkla tercih edilen güvenilir bir boyadır [15].

In vitro'da adipojenik farklılaştırma için, MKH'lerin özel bir besiyeri ile uyarılmaları gerekmektedir. Bu adipojenik besiyerinde, seruma (FBS) ek olarak deksametazon,

3-izobütil-1-metil-ksantin (IBMX), indometazin ve insülin bulunmaktadır. İnsülin, Akt-TSC2-mTORC1 sinyal yolu aracılığı ile adipojenезin başlamasını uyaran çok önemli bir hormondur ve hücrelerde trigliseridlerin birikimine neden olmaktadır [27]. Deksmetazon, adipositlere özgü transkripsiyon faktörlerinden olan PPAR γ 2 ve C/EBP'nin sentezlenmesini uyarmakta [29]; IBMX ise deksametazonun etkisini sinerjik bir şekilde artırırken, osteojenik belirteçler olan Runx2 ve Opn genlerinin baskılanmasını sağlamaktadır [15]. İndometazin de IBMX gibi osteojenezi baskılamakta ve farklılaşma ile ilgili olan proteinlerin salgılanmasını uyarmaktadır [30].



Şekil 2.5. Preadipositlerin adipositlere farklılaşması. (A) Preadipositlerden olgun adiposite dönüşümün evreleri: Proliferasyon, proliferasyonun durması, klonal çoğalma, erken farklılaşma ve geç farklılaşma. (B) Adipojenезin transkripsiyonal kontrolü. Erken adipojenik evreden, olgun adiposit oluşumuna kadar rol oynayan transkripsiyon faktörleri [31].

MKH'lerin bir hafta boyunca adipojenik yönde uyarılması sonucunda erken evrede hücrelerde lipid damlacıkları birikmeye başlamakta ve PPAR γ , C/EBP $\alpha/\beta/\delta$, lipoprotein lipaz (LP), ve FABP4/aP2 (fatty acid-binding protein-4) gibi protein ve transkripsiyon faktörleri saptanabilmektedir [15, 23].

2.6.1.1. Adipojenizde Rol Oynayan Transkripsiyon Faktörleri

Nükleer bir reseptör olan PPAR γ (peroxisome proliferation-activated receptor γ), MKH adipojenizini düzenleyen önemli bir adipojenik regülatördür. PPAR γ 'nın uzun zincirli yağ asitleri ve thiazolidinedion bileşenleri gibi çeşitli ligandlara bağlanması, PPAR γ 'nın aktivasyonuna ve baskılanmasına neden olmaktadır. Yapılan son çalışmalarda, bipotent koregülatör olan TAZ'ın, osteojenik bir belirteç olan Runx2'nin aktive olmasına ve PPAR γ 'nın baskılanmasına neden olduğu bulunmuş, böylece osteojenez desteklenirken, adipojenizin baskılandığı saptanmıştır. Bunun tam tersi bir durumun da mümkün olabileceği gösterilmiştir [19]. PPAR γ ile birlikte SREBP1 (sterol regulatory element-binding transcription factor 1) ve C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein) transkripsiyon faktörleri, adipojenizin başlaması ve devam etmesi için çeşitli genlerin ifade edilmelerini sağlamaktadırlar [15].

Transkripsiyonal faktörler arasında etkileşimin görüldüğü bir diğer örnek ise gerime dayalı mekanik uyarıdır. Fare embriyonik akciğer MKH'lerine gerim uygulandığında bu hücrelerin miyositlere dönüştükleri, gerim uygulanmadığında ise bu hücrelerin adipositlere dönüştükleri gösterilmiştir. Bu mekanik uyarım, hücrelerde TIPs (tension-induced/inhibited proteins) adı verilen spesifik izoformların aktive olmasına neden olmaktadır. TIP-1, hücrelerde gerimin olmadığı durumda ifade edilip adipojenizi desteklerken; TIP-3, miyojenizi desteklemektedir. Ayrıca TIP-1, adipojeniz esnasında hücrelerin yuvarlak şekil almalarından sorumlu bir izoform olarak görev yapmaktadır [20].

2.7. Bal Arısı Venomu ile Yapılan Hücre Kültürü Çalışmaları

Literatürde arı venomunun terapötik bir ajan olarak anti-kanser, anti-tümör, anti-proliferatif ve anti-nosiseptif (ağrı engelleyici) özelliklerinin yanı sıra, hücresel farklılaştırma potansiyelinden yararlanılan çalışmalara da rastlanılmaktadır. Bu çalışmalar genellikle hücre hatları düzeyinde yapılmış ve farklı tipte kanser hücre hatları ise bu konuda en fazla tercih edilen hücreler olmuştur.

Yapılan bir çalışmada, insan akut miyeloid lösemi hücreleri (HL-60) ile çalışılmış ve

bu malignant kanser hücrelerinin 1,25-dihidroksivitamin D₃ (1,25-(OH)₂VD₃) aracılığıyla yüksek proliferasyon özelliğinin yok edilmesi ve bu hücrelerin monositlere farklılaştırılması amaçlanmıştır. 1,25-(OH)₂VD₃ 'ün, HL-60 dahil birçok kanser hücresi üzerinde yüksek düzeyde farklılaşmayı uyardığı bildirilmiştir. Fakat bu vitaminin suprafizyolojik konsantrasyonları hücrelerde letal bir hiperkalsemiye neden olmaktadır. Bu nedenle bu bileşik, ancak başka ajanlarla birlikte kullanıldığında hücrelerden pozitif sonuçlar alınmıştır. Arı venomunun hem anti-kanser hem de farklılaşmayı uyarıcı özelliklerinden yola çıkılarak, HL-60 hücrelerinin monositlere farklılaştırılmasında arı venomu ve 1,25-(OH)₂VD₃ arasındaki sinerjik etkiden yararlanılmıştır. 2.5 µg/ml arı venomu ve 5nM 1,25-(OH)₂VD₃ konsantrasyonlarının oluşturduğu kombinasyon, COX ve NF-κB aktivitesini inhibe ederek 1,25-(OH)₂VD₃'ün, HL-60 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif ve farklılaştırmayı uyarıcı özelliğini artırmıştır [32].

Bir diğer çalışmada, murin P19 embriyonik karsinoma hücreleri ile çalışılmıştır. Bu hücrelerin belirli konsantrasyonlarda retinoik asit (RA) ile muamele edildiklerinde, retinoik asit (RAR) and retinoid X (RXR) nükleer reseptör-ailelerinin aracılık ettiği sinyal yolları ile, nöron ve astroglia hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir. Çalışmanın sonunda 5x10⁻⁷ M RA ve 3 µg/ml arı venomunun ayrı ayrı nöronal farklılaşmayı desteklediği, fakat bu iki bileşik bir arada kullanıldığında oluşan sinerjik etkinin, nöronal farklılaşma potansiyelini %93,5 oranında artırdığı tespit edilmiştir [33].

2.8. Farklı Canlı Türlerine Ait Venomun MKH Farklılaşması Üzerine Etkileri

Günümüzde, venomun farklı hücre tiplerine uygulanması ile yapılan ve bir önceki ana başlıkta değinilmiş olan hücre kültürü çalışmalarının yanında, hem arı venomunun hem de diğer hayvan gruplarına ait venomun, MKH'lerde de hücrel farklılaşmayı uyardığı bilinmektedir.

Kobra (*Naja atra*) venomundan izole edilen sinir büyüme faktörünün (nerve growth factor, NGF), kemik iliği MKH'lerinin kondrojenik farklılaşmasındaki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bir nöropeptid olan NGF'nin kıkırdak metabolizmasında

rol aldığı ve kondrojenik farklılaşmayı uyardığına dair bir hipotez kurulmuş ve bu hipotez hem *in vitro* hem de *in vivo*'da test edilmiştir. Yeni Zelanda tavşanlarında patella üzerinde dört mm çapında bir kırıkta defekti oluşturulmuş ve deneyler bu kırıkta onarımına yönelik olarak tasarlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, NGF'nin kemik iliği MKH'lerinde kırıkta özgü belirteçlerin ifadesini artırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca NGF ile muamele edilen kemik iliği MKH'lerinin kırıkta üzerindeki terapötik etkisinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Bunlara ek olarak, NGF aracılı kondrojenezin, NGF'nin spesifik reseptörü TrkA aracılığıyla PI3K/AKT ve MAPK/ERK sinyal yollarının aktivasyonu ile gerçekleştiği bildirilmiştir [34].

Kemik iliği MKH'leri ile yapılan bir diğer çalışmada ise, çingiraklı yılan (*Crotalus durissus terrificus*) venomundan elde edilen heterolog fibrin dolgusunun (heterologous fibrin sealant, HFS) osteoporotik sıçanlarda üç boyutlu biyolojik bir iskele olarak kullanımı araştırılmıştır. Sıçanların femurunda 5 mm çapında bir defekt oluşturulmuş ve bu defektin HFS/Kemik iliği MKH kombinasyonu ile onarımı sağlanmıştır. On dördüncü günde bu kombinasyonun, defekt bölgesinde kontrol grubuna göre daha fazla sayıda kemik hücresi oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir. Buna ek olarak HFS'nin, MKH'lerin osteojenik yönde farklılaşmasını uyardığı gözlemlenmiştir [35].

2.9. Bal Arısı Venomunun MKH Farklılaşmasındaki Roller

Göbek kordonu MKH'leri ile yapılan bir çalışmada bu hücreler, 1,2,3,4,5,6 µg/ml arı venomu konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 4, 5 ve 6 µg/ml arı venomu konsantrasyonlarının MKH'leri osteojenik ortam olmaksızın sağlıklı osteositlere dönüştürdüğü, 14 ve 21. günlerde yapılan Alizarin Red boyaması ile gösterilmiştir [36].

Bir diğer çalışmada, yine göbek kordonu MKH'leri kullanılmış fakat bu sefer arı venomu ve D3 vitaminin sinerjik etkisinden yararlanılmıştır. Hem D3 vitaminin hem de arı venomunun, kök hücreleri osteojenik yönde farklılaştırdığı bilinmektedir. Buradan yola çıkarak yapılan bu çalışmada, arı venomunun D3 vitaminin

farklılaştırma potansiyelini artıracak hipotezi kurulmuş ve bu hipotez test edilmiştir. Alizarin Red boyaması ve alkalen fosfataz testi yapıldığında, arı venomunun toksik olmayan konsantrasyonlarda (2, 4 ve 6 µg/ml) MKH'lerde kısmi bir osteojenik farklılaşmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelere arı venomu/D3 vitamini kombinasyonu uygulandığında ise 21 günün sonunda osteoblasta dönüşen hücrelerin, yalnızca arı venomu veya yalnızca D3 vitamini uygulamalarına göre sayıca daha fazla oldukları bildirilmiştir. Böylece çalışmanın başında kurulan hipotez doğrulanmış, iki bileşik arasında sinerjik bir etki olduğu gösterilmiştir [37].

2.10. Tez Çalışmasının Amacı

Kök hücrelerin tek başına veya bir doku iskelesi ile birlikte kullanılarak doku ve organ hasarlarının onarımı, günümüz tıp dünyasında tedavi yöntemi olarak oldukça yenilikçi bir fikir olarak ortaya çıkmıştır. Özellikle son yıllarda bu amaçla doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalar, klinik uygulamalar için büyük önem taşımaktadır.

Doku mühendisliğinin temelini, herhangi bir dokuda hücrelerin etrafını saran ve onları destekleyen ekstraselüler matriks (ESM) yapısı oluşturmaktadır [36, 37]. Bu kompleks yapının içeriğinde, laminin, kollajen, proteoglikan, glukozaminoglukanlar (GAGs) gibi proteinler ve polisakkaritler bulunmaktadır ve ESM'nin yapısı her doku ve organa göre değişiklik göstermektedir [38, 40].

Doku mühendisliğinde kullanılan "iskele" terimi, *in vivo*'daki ESM'ye karşılık gelen bir yapıyı tanımlamak için kullanılmaktadır. İşlevini gerçekleştirebilen bir iskele, tıpkı *in vivo* ESM gibi hücreleri destekleyebilmeli, hücre adezyonunu, proliferasyonunu, farklılaşmasını ve göçünü teşvik edebilmelidir. Kompleks *in vivo* ESM'nin özelliklerini gösterebilecek –bir diğer deyim ile taklit edebilecek- bir iskele oluşturulmasının zorluğundan dolayı dokulardan doğal olarak elde edilen doku iskeleleri, yani biyolojik iskeleler tercih edilmektedir [38, 41]. Bu iskeleler ancak bir seri fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemler ile hücrelerinden arındırılma işlemleri (deselülerizasyon) geçirdikten sonra, doku ve organ hasarlarının onarımında kullanılabilir [42].

Üzerinde klinik olarak çok fazla çalışmalar yapılmış doku hasarlarından birisi de yumuşak doku hasarlarıdır. Bu hasarlar arasında meme kanseri sonucu mastektomi ya da lumpektomi operasyonu geçiren hastalarda oluşan adipoz doku kaybı da bulunmaktadır. Klinik raporlara göre, adipoz dokunun yeniden oluşturulması ve yenilenmesinde adipoz dokudan elde edilen biyolojik iskeleler ve bu iskeleler ile birlikte kullanılan adipoz doku kökenli MKH'ler önemli rol oynamaktadır. Adipoz dokunun hastalardan kolaylıkla ve bol bir şekilde elde edilebilir olması ve dolayısıyla bu dokuda çok bol bulunan adipoz doku kökenli MKH'lerin izolasyonunun kolaylığı, bu hücrelerin doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilmesine neden olmuştur [43, 44].

Adipoz doku kökenli MKH'ler, hücre kültürü ortamında özel adipojenik besiyerleri ile uyarılarak adipojenik yönde farklılaşabilmekte ve adipojenez sonucu olgun adipositlere dönüşebilmektedirler. Yapılan bu tez çalışmasında ise, herhangi bir adipojenik besiyeri kullanılmaksızın arı venomunun hücresel farklılaştırma özelliğinden yararlanılmış ve venomun adipoz doku kökenli MKH'leri adipojenik yönde uyararak bu hücrelerde adipojenezi başlatıp başlatmadığı test edilmiştir. Böylece olası bir adipojenez sonrası adipositlere farklılaşan adipoz doku kökenli MKH'ler, ileride çeşitli aşamalardan geçirilerek, klinikte kullanılmak üzere hazırlanacak ve uygun yağ doku iskeleleri ile bir araya getirilen MKH'ler, doku kayıplarının giderilmesi için önemli bir kaynak olabilecektir.

2.11. Tez Çalışma Planı

Bu tez kapsamında, literatür taraması sonucu elde edilen bilgiler ve gözlemler dahilinde sıçan adipoz dokusundan izole edilmiş olan adipoz doku kökenli MKH'ler ve bal arısı venomu ile çalışılmaya karar verilmiştir. Çalışmanın hipotezi aşağıdaki şekilde kurulmuştur:

H₀ hipotezi

Bal arısı venomu, standart kültür koşullarında adipojenik besiyeri olmaksızın tek başına adipoz doku kökenli MKH'ler üzerine uygulandığında, bu hücrelerin

adipojenik farklılaşma potansiyeli üzerine herhangi bir etki göstermemekte ve hücreleri uyararak adipojenik yönde farklılaştırmamaktadır. Bu nedenle arı venomu, adipojenezi başlatan bir ajan olarak görev yapmamaktadır.

H₁ hipotezi:

Bal arısı venomu, standart kültür koşullarında adipojenik besiyeri olmaksızın tek başına adipoz doku kökenli MKH'ler üzerine uygulandığında, bu hücrelerin adipojenik farklılaşma potansiyeline etki etmekte ve hücreleri uyararak adipojenik yönde farklılaştırmaktadır. Bu nedenle arı venomu, adipojenezi başlatan bir ajan olarak görev yapmaktadır.

Hipotezin kurulmasının ardından bir öngöründe bulunulmuştur. Bu öngörüye göre, bal arısı venomunun, adipoz doku kökenli MKH'leri adipojenik yönde farklılaştıracığı, adipositlere dönüşen veya dönüşme aşamasında olan hücrelerde nötral lipid damlacıklarının gözlemleneceği ve bu damlacıkların Oil Red O boyaması ile gösterilebileceği düşünülmüştür. Öngörünün ardından ise hipoteze uygun bir deney tasarımı yapılarak hipotez test edilmiş ve bir karara varılmıştır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları için, laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarımız kapsamında izole edilerek dondurulmuş olan hücreler kullanılmıştır. Bu hücreler, sıçan subkutan adipoz dokusundan primer eksplant kültür yöntemi ile izole edilmiştir [45]. İzole edilmiş olan hücreler, birinci pasajdan (P/1) sonra standart hücre dondurma yöntemi kullanılarak dondurma besiyeri (%50 FBS, %40 DMEM/F12, %10 DMSO) içerisinde dondurularak sıvı azot ortamında -196°C'de stoklanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında P/1'deki hücreler sıvı azottan alınarak hızla sıcak su banyosunda (37°C) çözündürülmüş ve hücre süspansiyonu 800 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant dökülmüş ve tüp dibindeki hücreler (pelet), DMEM/F12 (%10 FBS, %0,5 penisilin/streptomisin) ile süspanse edilerek 25 cm²'lik kültür kaplarına aktarılıp etüvde standart kültür koşullarında (37°C, %5 CO₂) inkübe edilmiştir.

Hücreler kültür kaplarının yüzeyini tamamen kaplayarak konfluent hale geldikten sonra, tripsinizasyon yöntemi ile pasajlama yapılmıştır. Tripsinizasyon yönteminde hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine 0,5 ml tripsin/EDTA eklenerek hücreler etüve kaldırılmıştır. Yaklaşık 5-10 dakika içerisinde tripsin/EDTA'nın etkisiyle hücreler yüzeyden ayrılmaya başlayarak süspanse hale gelmiştir. Süspanse haldeki hücreler, DMEM/F12 (%10 FBS, %0,2 penisilin/streptomisin) ile muamele edilmiş ve santrifüj tüpüne alınarak 800 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda süpernatant dökülmüş ve tüp dibindeki hücreler (pelet), DMEM/F12 (%10 FBS, %0,2 penisilin/streptomisin) ile süspanse edilerek 25 cm²'lik kültür kaplarına aktarılıp 37°C—%5 CO₂ hava şartlarındaki standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini tamamen kaplayana dek inkübasyona devam edilmiş ve pasajlama işlemi iki kez daha tekrar edilmiştir. Böylece P/3 hücreler elde edilmiş ve deneylerde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.1. Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı çalışma kabini.

3.2. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin Karakterizasyonu

Adipoz doku kökenli MKH'lerin (P/3) karakterizasyonu için akış sitometri analizi ve immünfloresan boyama yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.1. Akış Sitometri Analizi ile Karakterizasyon

Akış sitometri analizinin birçok kullanım alanı olmakla birlikte, bu çalışmada analizin immünfenotipleme özelliğinden yararlanılmıştır. Bu analizde çeşitli antikolar ve florokromlar kullanılarak, hücre içerisinde ve yüzeyinde bulunan çeşitli proteinler, organeller ve hücrenin diğer bileşenleri ve özellikleri (DNA miktarı, enzim aktivitesi, hücre canlılığı vb.) saptanabilmektedir. Akış sitometri ile bir süspansiyon içerisinde bulunan hücreler, özel bir bölmede lazer ışığına maruz bırakılmakta ve hücrelerden yansıyan sinyaller çeşitli detektör ve filtreler ile tespit edilerek analiz edilmektedir.

Buradan yola çıkarak, adipoz doku kökenli MKH'lerin immünfenotiplenmesinde bu hücrelere özgü olan ve hücrelerin yüzeyinde bulunan CD29, CD54 ve CD90 antijenleri (pozitif belirteçler) ile, hücrelerin yüzeyinde bulunmayan CD45, CD106 ve

MHC Sınıf II antijenleri (negatif belirteçler) kullanılmıştır. Böylece, izole edilen MKH'lerin fenotipik karakterleri belirlenmiştir. Analizler, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Terapisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde (KOGEM) yapılmıştır.

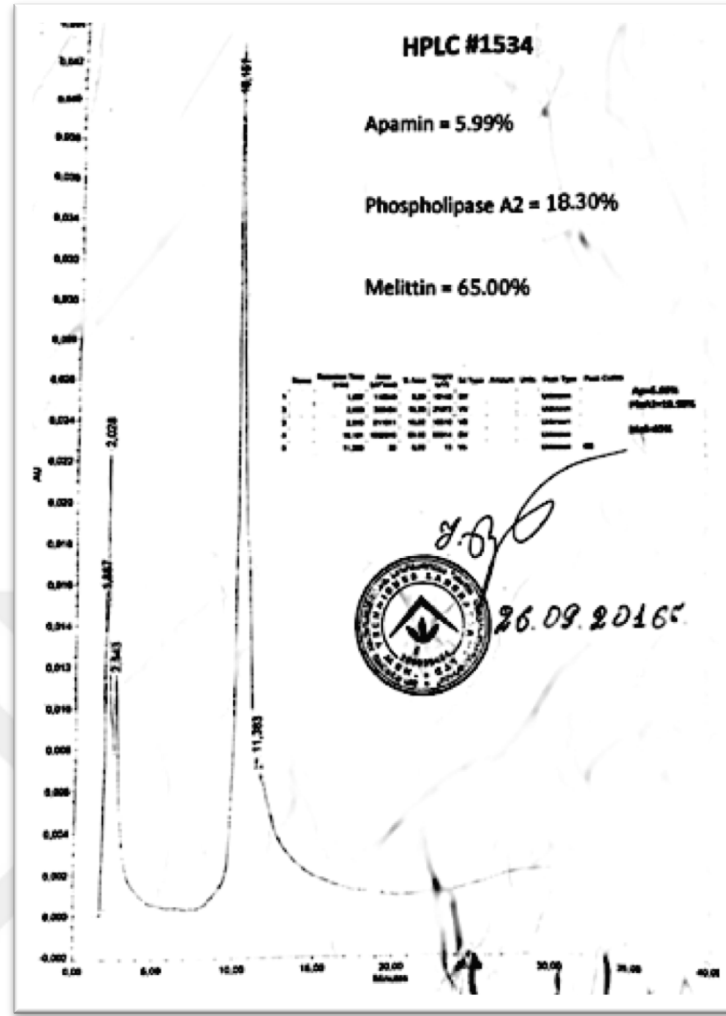
3.2.2. İmmü floresan Boyama ile Karakterizasyon

İmmü floresan boyama yönteminde MKH'lere özgü olan CD13 ve CD29 yüzey antijenleri kullanılmıştır. Kültür kaplarında çoğaltılan P/3'deki hücreler, primer ve sekonder antikor solüsyonları ile muamele edilerek floresan mikroskopta incelenmiştir. Yöntem, EK 1.'de belirtilen şekilde uygulanmıştır.

3.3. Bal Arısı Venomunun Eldesi ve HPLC Analizi ile Karakterizasyonu

Çalışmalarda kullanılan arı venomu, New Technology Laboratory (Gürcistan)'den ticari formda temin edilmiştir. Ürün bilgisine göre venom, arılardan elektro şok yöntemi ile elde edilmiştir. Bu yöntem ile arının cam levha üzerine salgıladığı venom, kurutularak levhadan kazınmış ve çeşitli işlemlerden geçirilmiştir. Bu işlemler Argon gazı varlığında yapılmış ve böylece, venomun hava ile teması minimuma indirilerek venomun oksidasyonunun engellenmesi amaçlanmıştır. Ardından hava geçirmeyen koyu renkli bir tüp içerisinde, polietilenden yapılmış bir paket ile sarılı halde tarafımıza iletilmiştir.

Venomun karakterizasyonu için kullanılan HPLC analizi, venomun temin edildiği laboratuvar tarafından yapılmıştır. Yapılan HPLC analizine göre çalışmalarda kullanılan arı venomu, %65 melittin, %5.99 apamin ve %18.3 oranında fosfolipaz A₂ içermektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Çalışmalarda kullanılan arı venomunun HPLC analizi sonuçları (New Technology Laboratory, Gürcistan).

3.4. Arı Venomunun Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

Arı venomunun adipoz doku kökenli MKH'ler üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek amacı ile 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) analizi uygulanmıştır. Aktif metabolizmaya sahip canlı hücreler, sarı renkli, suda çözünebilen bir tetrazolium tuzu olan MTT'yi, mitokondriyal dehidrogenazlar ile suda çözünemeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürürler. Hücreler öldüklerinde ise, MTT'yi formazan kristallerine dönüştürme kabiliyetlerini yitirirler. Bu nedenle mor renk oluşumu, canlı hücreler için elverişli bir belirteçtir ve renk yoğunluğu ile hücre canlılığı arasında doğru orantı vardır.

MTT analizinden önce konsantrasyonları 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml ve 100 mg/ml olacak şekilde arı venomu tartılarak DMEM/F12 içerisinde vortekslenerek çözülmüştür. Ardından stok solüsyonlar, 0,22 µ'luk filtreler kullanılarak steril edilmiştir.

MTT analizi için hücreler, sayıca 8×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. 24 saat sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış, sırasıyla steril venom solüsyonları eklenmiş ve venomun etkisi 4, 24, 48, ve 72. saat boyunca takip edilmiştir. Deney düzeneği altı tekrarlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre hücrelerin yarısının ölümüne neden olan doz, 50 mg/ml olarak belirlenmiş ve bir sonraki deney aşamasında hücrelere uygulanmıştır. MTT analizi EK 2'de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5. Arı Venomunun Adipoz Doku Kökenli MKH'ler Üzerinde Adipojenik Farklılaştırma Potansiyelinin İncelenmesi

Venom ile muamele edilen adipoz doku kökenli MKH'lerin, kültür ortamında adipojenik besiyeri olmaksızın adipojenik yönde farklılaşma potansiyellerini gözlemlemek amacıyla hücreler, 2×10^4 hücre/300µl olacak şekilde sekiz kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin besiyeri 21 gün boyunca iki günde bir değiştirilmiştir. 50 mg/ml venom konsantrasyonu, DMEM/F12 içerisinde çözülerek hazırlanmış ve 0,22 µ'luk filtreler ile steril edilerek hücrelere uygulanmıştır.

7, 14 ve 21. günlerde adipojenezin başlaması sonucu hücrelerde oluşan nötral lipid damlacıklarını göstermek üzere Oil Red O boyaması yapılarak inverted mikroskopta hücrelerin fotoğrafları çekilmiş ve hücreler 21 gün boyunca morfolojik olarak incelenmiştir. Buna göre üç deney grubu tasarlanmıştır:

- 1) **Negatif Kontrol Grubu:** Bu gruptaki hücreler 21 gün boyunca sadece DMEM/F12 (%10 FBS, %0,2 penisilin/streptomisin) ile muamele edilmiş ve hücreler 7, 14 ve 21. günlerde Oil Red O ile boyanmıştır.
- 2) **Pozitif Kontrol Grubu:** Bu gruptaki hücreler 21 gün boyunca adipojenik besiyeri

(DMEM/F12, %10 FBS, %0,1 penisilin/streptomisin, 5 µg/mL insülin, 60 µM indometazin, 10^{-7} M deksametazon, 500µM 3-izobütil-1-metilksantin) ile uyarılmış ve hücreler 7, 14 ve 21. günlerde Oil Red O ile boyanmıştır.

- 3) **Venom Uygulanan Deney Grubu:** Bu gruptaki hücreler 21 gün boyunca 50 mg/ml venom konsantrasyonu ile uyarılmış ve hücreler 7, 14 ve 21. günlerde Oil Red O ile boyanmıştır.

3.5.1. Adipojenez Seviyesinin Skorlanması

Adipojenez seviyesi, bir kuyucuğun ortasında bulunan ve lipid damlacığı içeren 100 hücre skorlanarak belirlenmiş, üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Skoring, ImageJ programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Her bir hücrenin adipojenez seviyesi, lipid damlacıkları ile kaplı yüzde sitoplazma oranı baz alınarak hesaplanmıştır: Düzey 0: Adipojenez yok; Düzey 1: %0—24; Düzey 2: %25—50; Düzey 3: %51—75; Düzey 4: %76—100 [46, 47].

3.5.2. Oil Red O Boyaması

Oil Red O boyaması sekiz kuyucuklu kültür kaplarında yapılmış ve boyamanın ardından kuyucuklar, inverted mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekilmiştir. Oil Red O ile hücrelerin içerisindeki nötral lipid damlacıkları kırmızı renkte, hücre çekirdekleri ise Hematoksilen boyası ile mavi-mor renkte boyanmıştır. Boyama protokolü EK 3'te belirtilen şekilde uygulanmıştır.

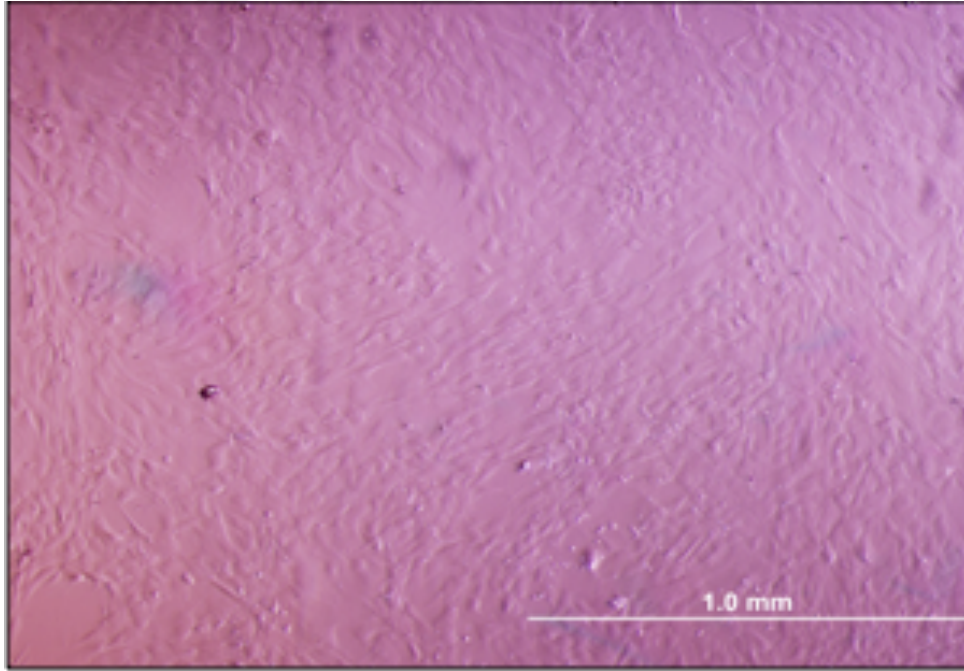
3.6. İstatistiksel Analizler

Sitotoksite testinde (MTT analizi) hücrelere uygulanan venom konsantrasyonlarının, zamana (4, 24, 48 ve 72. saat) ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı üzerinde gösterdiği farklılıklar parametrik bir test olan İki Yönlü Varyans Analizi ile incelenmiştir. Gruplar arasındaki farklılığı göstermek için ise bir post-hoc testi olan Bonferroni testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

Çalışmamızda, primer eksplant kültür yöntemi kullanılarak sıçan subkutan adipoz dokusundan izole edilen [45] ve sıvı azot ortamında -196°C 'de dondurma besiyeri ile dondurularak muhafaza edilen adipoz doku kökenli MKH'ler kullanılmıştır. Hücreler -196°C 'den çıkartılarak standart kültür koşullarına getirilmiş ve pasajlamalar yapılarak deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Standart kültür koşullarında inkübasyon süresince hücreler, fibroblastik morfolojideki mezenşimal kök hücre özellikleri göstermiş ve inkübasyonun devamında konfluent hale gelerek kültür kabının yüzeyini kaplamışlardır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Adipoz doku kökenli MKH'lerin P/3'deki morfolojisi (x4).

4.2. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerin Karakterizasyonu

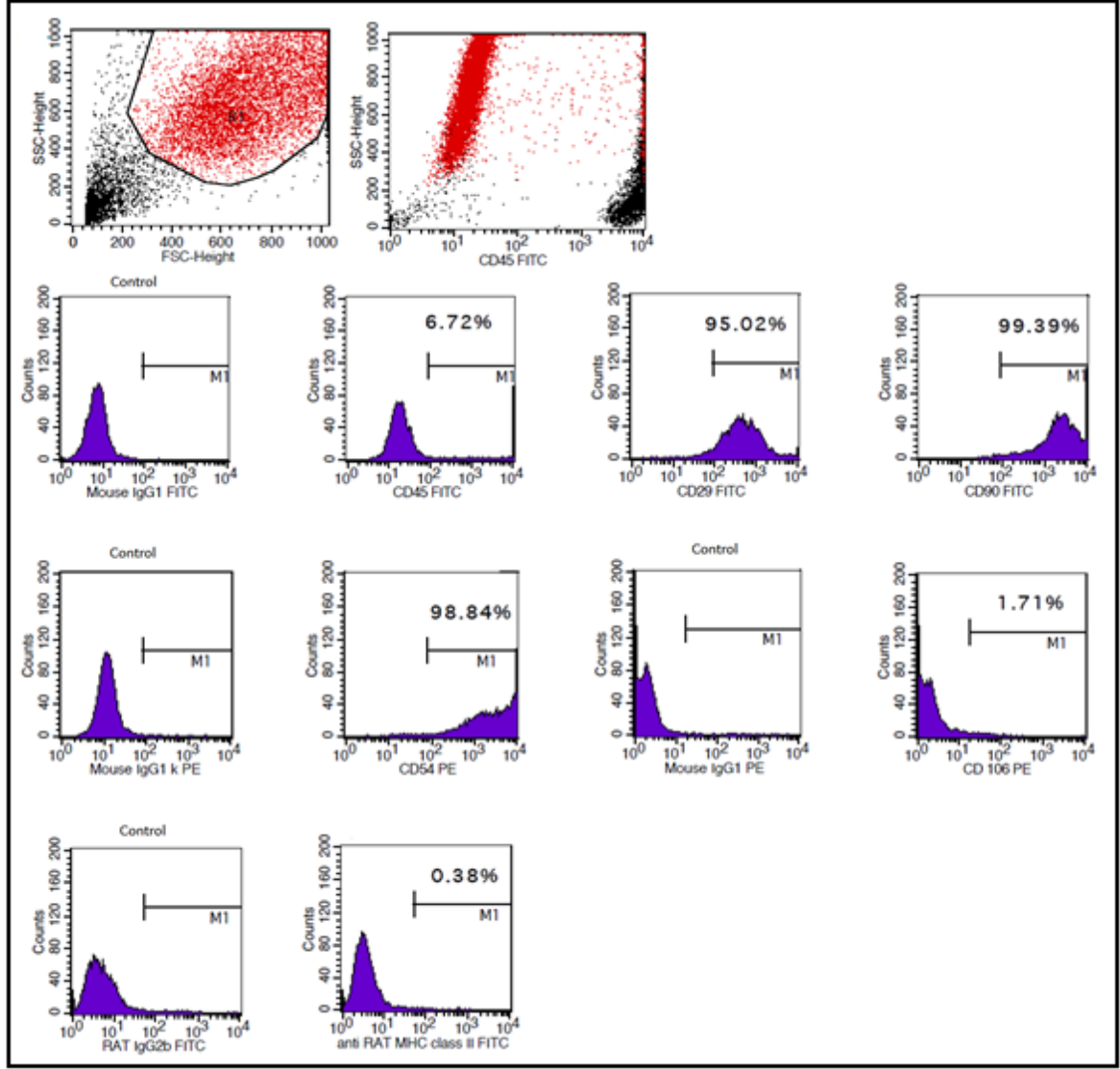
P/3'deki adipoz doku kökenli MKH'lerin karakterizasyonu için akış sitometri analizi ve immünfloresan boyama olmak üzere iki yöntem kullanılmıştır.

4.2.1. Akış Sitometri Analizi ile Karakterizasyon

Adipoz doku kökenli MKH'ler akış sitometri analizi ile immünofenotiplendiklerinde MKH'lerde bulunan CD29, CD54 ve CD90 yüzey antijenleri için pozitif, bu hücrelerde bulunmayan CD45, CD106 ve MHC Sınıf II yüzey antijenleri için negatif sonuç vermiştir. Akış sitometri analizinin sonuçları Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, P/3'deki MKH popülasyonunun %95 ve daha fazlasının CD29, CD54 ve CD90 antijenlerini bulundurduğu, popülasyonun %2 ve daha azının CD45, CD106 ve MHC sınıf II antijenlerini içerdiği saptanmıştır. Her iki grup yüzey antijenleri için de yüksek doğruluk oranı gösteren bu sonuçlar, MKH'ler için belirlenen antijen ifadesi kriterlerine uymaktadır.

CD29 (integrin β_1), MKH'lerin adezyonu ve göçünde görev alırken [48] ; CD90 (Thy-1), immünglobulin süperaillesine ait bir üyedir ve CD29 gibi hücrelerin adezyonu ve göçünde görev almaktadır [49]. Bu belirteç, MKH karakterizasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. CD54 (ICAM-1), hücrelerin haberleşmeleri, diapedezi ve hücre-hücre adezyonundan sorumludur. Adipoz dokudan izole edilen MKH'lerde CD54'ün ifadesi çok yüksektir. MKH'lerde düşük seviyelerde ifade edilen MHC Sınıf I molekülleri ise, doğal öldürücü hücreleri (NK) baskılamakta ve bu hücrelerin çoğalmasını engellemektedir [44].

MHC Sınıf II molekülleri sadece antijen sunan hücrelerde ve lenfositlerde bulunmaktadır. Bu sınıf moleküllerin MKH'lerde bulunmamasından dolayı MKH'ler hipo-immünojenik hücrelerdir [50]. CD45, hematopoetik hücre belirtecidir ve MKH'lerde bulunmamaktadır. Bu molekül, hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında görev almaktadır. CD106 (VCAM-1) ise hematopoetik hücre ve endotelial hücre belirtecidir ve MKH'lerde bulunmamaktadır. Bu molekül, lenfositler, monositler, eozinofiller ve bazofillerin vasküler endotelyuma adezyonunu sağlamaktadır [44].

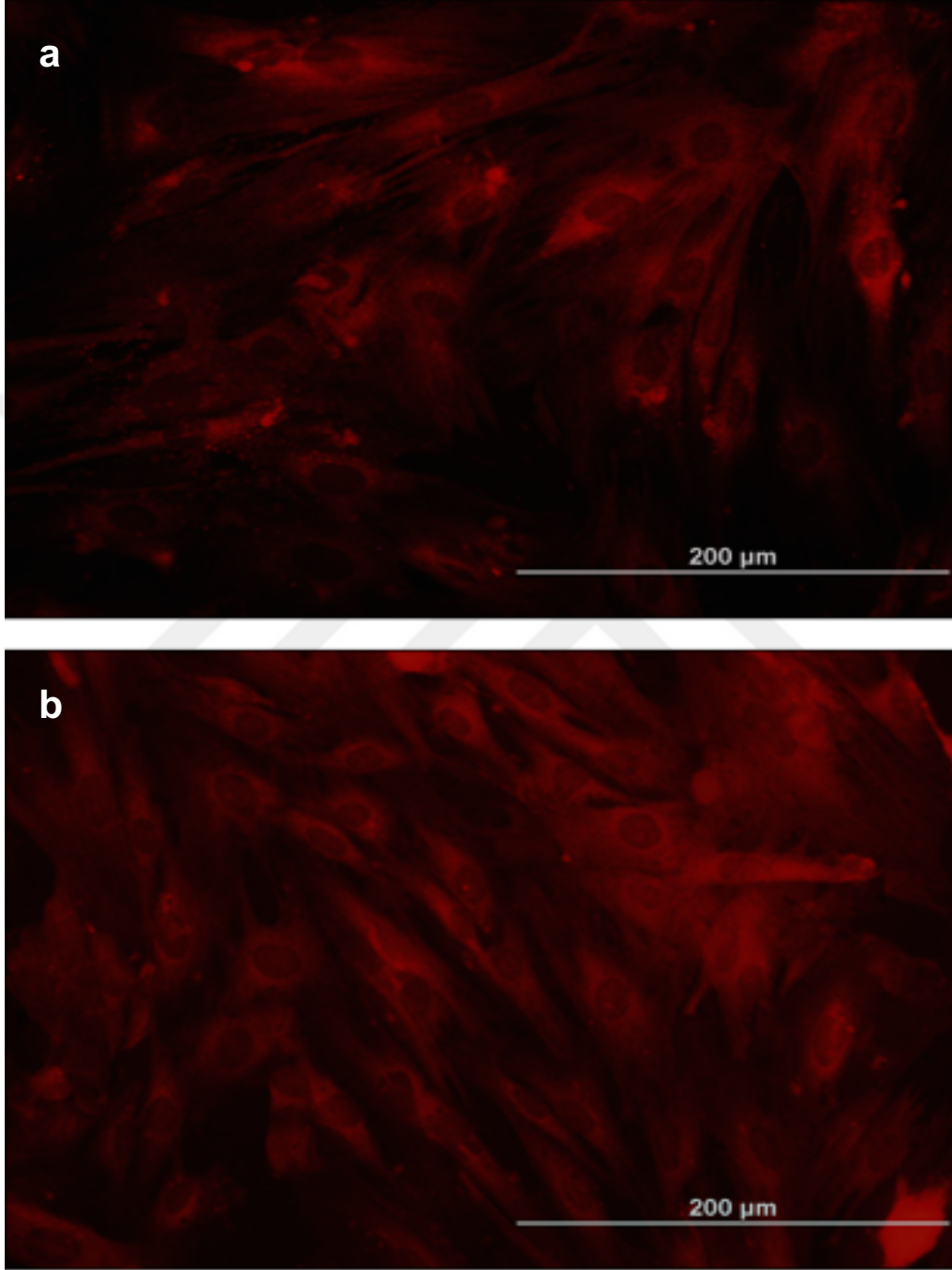


Şekil 4.2. Sıçan adipoz doku kökenli MKH'lerinin akış sitometri analizi sonuçları. Fenotipi pozitif olan antijenler ($\geq$ %95): CD29, CD54 ve CD90. Fenotipi negatif olan antijenler ($\leq$ %2): CD45, CD106 ve MHC sınıf II

4.2.2. İmmüno Floresan Boyama ile Karakterizasyon

İmmüno Floresan boyama yöntemi ile MKH'lere özgü olan CD13 ve CD29 yüzey antijenleri gösterilerek, kültürdeki hücrelerin karakterizasyonu yapılmıştır. Hücreler FITC için 493-528 nm dalga boyunda floresan aydınlatma ile inverted mikroskopta görüntülenmiştir (x10). Buna göre hücrelerin CD13 ve CD29 için pozitif boyanması (Şekil 4.3), izole edilen tüm hücrelerin MKH karakteristiğinde olduğunun bir göstergesidir. CD29 (integrin β_1), MKH'lerin adezyonu ve göçünde görev almakta;

CD13 (Aminopeptidaz N), MKH'ler dışında granülositler, monositler ve endoteliyal hücrelerde de bulunmaktadır.



Şekil 4.3. P/3'deki MKH'lerin (a) CD13, (b) CD29 yüzey antijenlerine ait floresan boyama görüntüleri (x10).

4.3. Arı Venomunun Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

Çalışmamızda, iki parametrenin (arı venomu konsantrasyonu ve zaman) tekrarlı ölçümlerinin değerlendirilmesinde iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

MTT analizinde, **birinci etken arı venomu konsantrasyonu, ikinci etken ise zamandır.** Zaman içindeki ölçümler her bir konsantrasyon için yapılmıştır, dolayısıyla tekrarlamalar söz konusudur ve zaman etkeni için **ölçümler birbirine bağımlıdır.** Kullanılan parametreler ve değerleri, Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmamızda kullanılan parametreler ve değerleri.

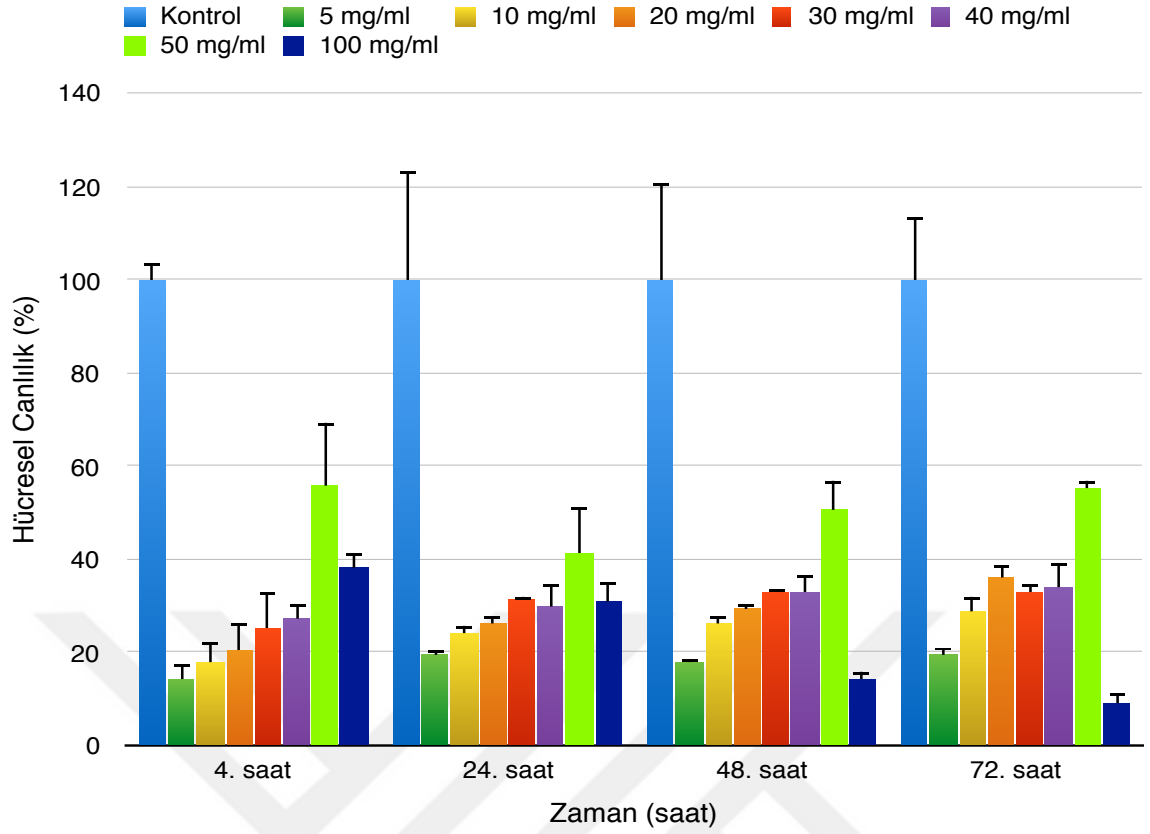
Arı Venomu Konsantrasyonu	Zaman
5 mg/ml	4. saat
10 mg/ml	24. saat
20 mg/ml	48. saat
30 mg/ml	72. saat
40 mg/ml	
50 mg/ml	
100 mg/ml	

Venom Konsantrasyonları ve Zaman Arasındaki Etkileşimin F İstatistiği ile Test Edilmesi

✓ P anlamlılık düzeyi %0,01 ($P < 0,0001$) olarak alınmıştır.

- H_0 hipotezi: Etkileşim anlamsızdır (konsantrasyon x zaman).
- H_1 hipotezi: Etkileşim anlamlıdır.

$F_{\text{ETKİLEŞİM}}=2,676$ değeri F_{TABLO} değerinden büyük olduğundan dolayı, etkileşimin önemli olduğu sonucuna varılmış ($P < 0,0001$) ve H_0 hipotezi reddedilmiştir. Buna göre, **hücre canlılığı üzerine venom konsantrasyonu ve zamanın ortak etkisinin olduğu** yorumu yapılmıştır.



Şekil 4.4. Arı venomunun adipoz doku kökenli MKH'lerin hücre canlılığına olan etkisinin zamana ve konsantrasyona bağlı değişimi

Arı venomunun farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığına olan etkisi Şekil 4.4'de verilmiştir. Buna göre, her bir venom konsantrasyonunun adipoz doku kökenli MKH'ler üzerindeki sitotoksik etkisi, kontrol grubu ile karşılaştırılarak incelendiğinde tüm saatlerde anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($P < 0,0001$). Bu farklılık, kontrol grubu lehinedir ve diğer tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı, kontrol grubundan daha düşüktür.

5 mg/ml venom konsantrasyonunun hücre canlılığına olan etkisi diğer konsantrasyonlar ile karşılaştırıldığında tüm zaman dilimlerinde sadece 50 mg/ml'de; 100 mg/ml'de ise sadece 4. saatte anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($P < 0,0001$).

50 mg/ml venom konsantrasyonu ile diğer konsantrasyonlar karşılaştırıldığında ise, tüm zaman dilimlerinde her bir konsantrasyon arasında hücre canlılığı bakımından anlamlı bir farklılık gözlemlenmiş ve bu farklılıklar Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Ayrıca 50 mg/ml hariç diğer tüm konsantrasyonlar kendi içinde ikili olarak karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlı farklılık bulunmamıştır ($P>0,0001$).

Çizelge 4.2. 50 mg/ml venom konsantrasyonu ile diğer konsantrasyonlar arasında gözlemlenen, saatlere göre P anlamlılık düzeyleri.

Arı Venomu Konsantrasyonları	P Anlamlılık Düzeyleri
5 mg/ml – 50 mg/ml	4. saat *** 24. saat ** 48. saat *** 72. saat ***
10 mg/ml – 50 mg/ml	4. saat *** 24. saat *** 48. saat *** 72. saat ***
20 mg/ml – 50 mg/ml	4. saat *** 24. saat * 48. saat ** 72. saat *
30 mg/ml – 50 mg/ml	4. saat *** 24. saat — 48. saat * 72. saat **
40 mg/ml – 50 mg/ml	4. saat *** 24. saat — 48. saat * 72. saat *
50 mg/ml – 100 mg/ml	4. saat * 24. saat — 48. saat *** 72. saat ***
*0,05 ; **0,01 ; ***0,0001	

Hücrelere arı venomu uygulanmasının ardından dördüncü saatten itibaren tüm saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın gözlemlendiği doz **50 mg/ml** venom konsantrasyonu olmuştur ($P<0,0001$) ve **bu doz, hücrelerin yarısının ölümüne neden olan doz olarak belirlenmiştir.**

100 mg/ml venom konsantrasyonu uygulanan hücrelerde 4. ve 24. saatlerde zamana bağlı olarak hücre canlılığı yüksek olarak gözlemlenmiş ancak bu durum, istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ($P \geq 0,05$). 100 mg/ml venom konsantrasyonu hücre canlılığı üzerinde yüksek sitotoksik etki göstermektedir.

Tüm zaman dilimlerinde ve konsantrasyonlarda hücre canlılığının absorbans değerleri (ortalama) ve standart sapmaları ise Çizelge 4.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. Arı venomunun adipoz doku kökenli MKH'lerin hücre canlılığına olan etkisinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile gösterilmesi

	Kontrol	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml
4. saat	0,28 $\pm$ 0,01	0,040 $\pm$ 0,009	0,05 $\pm$ 0,012	0,057 $\pm$ 0,016
24. saat	0,264 $\pm$ 0,061	0,052 $\pm$ 0,002	0,064 $\pm$ 0,004	0,07 $\pm$ 0,003
48. saat	0,25 $\pm$ 0,052	0,045 $\pm$ 0,001	0,066 $\pm$ 0,003	0,073 $\pm$ 0,003
72. saat	0,226 $\pm$ 0,030	0,044 $\pm$ 0,003	0,065 $\pm$ 0,007	0,081 $\pm$ 0,006

	30 mg/ml	40 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml
4. saat	0,071 $\pm$ 0,021	0,076 $\pm$ 0,009	0,156 $\pm$ 0,038	0,107 $\pm$ 0,008
24. saat	0,083 $\pm$ 0,002	0,079 $\pm$ 0,012	0,110 $\pm$ 0,025	0,082 $\pm$ 0,011
48. saat	0,082 $\pm$ 0,002	0,082 $\pm$ 0,009	0,127 $\pm$ 0,015	0,036 $\pm$ 0,003
72. saat	0,075 $\pm$ 0,003	0,077 $\pm$ 0,012	0,125 $\pm$ 0,003	0,020 $\pm$ 0,005

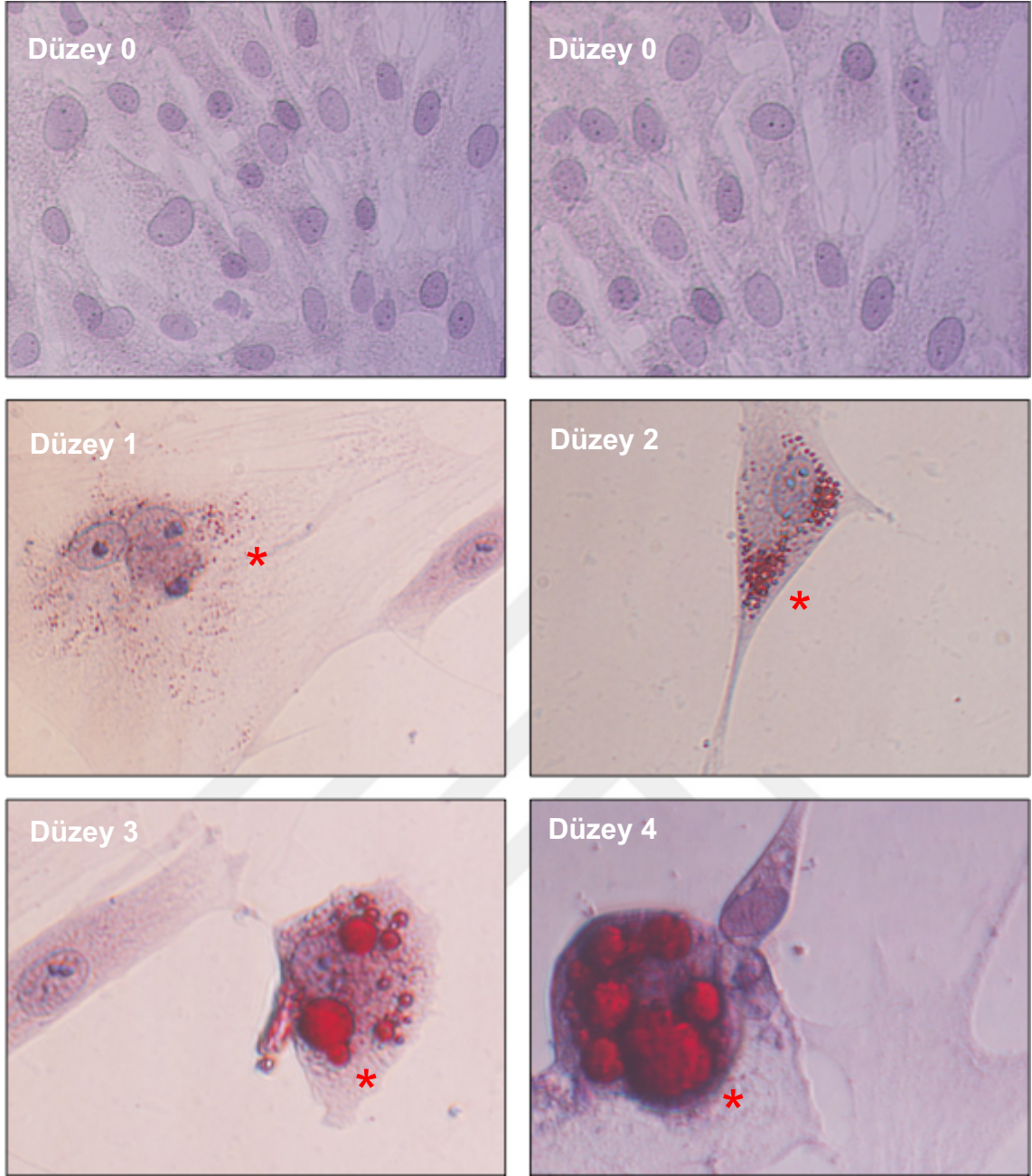
4.4. Arı Venomunun Adipoz Doku Kökenli MKH'ler Üzerinde Adipojenik Farklılaştırma Potansiyelinin İncelenmesi

Hücrelerin adipojenez seviyelerini incelemek için üç grup oluşturulmuş ve sonuçlar dört farklı düzeyde skorlanarak incelenmiştir: Düzey 0: Adipojenez yok; Düzey 1: %0—24; Düzey 2: %25—50; Düzey 3: %51—75; Düzey 4: %76—100 (Şekil 4.5)

- 1) **Negatif Kontrol Grubu (NK):** Yirmi bir gün süreyle sadece DMEM/F12 (%10 FBS, %0,2 penisilin/streptomisin) ile inkübe edilen hücreler Oil Red O ile boyandıklarında, hücrelerde nötral lipid damlacıkları görülmemiş ve dolayısıyla bu gruptaki hücreler Düzey 0 olarak skorlanmıştır. Sağlıklı adipoz doku kökenli MKH'lerin çekirdekleri Hematoksilen ile mavi-mor renkte boyanmıştır (Şekil 4.6).
- 2) **Pozitif Kontrol Grubu (PK):** Yirmi bir gün süreyle adipojenik besiyeri ile uyarılan MKH'lerin, üçüncü günden itibaren morfolojik olarak negatif kontrol grubundaki hücrelere göre, hipertrofidan dolayı daha yuvarlak oldukları görülmüştür. Dördüncü günden itibaren hücrelerin içerisinde nötral lipid damlacıkları oluşmaya başlamış ve dördüncü günde adipojenez seviyesi Düzey 2 ve Düzey 3'e kadar çıkmıştır (Şekil 4.7). Lipid damlacığı içeren hücre sayısı, damlacıkların sayısı ve büyüklüğü 21. güne kadar artmıştır. Adipojenezin ilk evrelerinde gözlemlenen, sitoplazmada multiloküler yerleşik lipid damlacıkları, ilerleyen evrelerde birleşmeye başlamışlardır. Belirli günlerde yapılan Oil Red O boyaması ile bu damlacıklar kırmızı renkte boyanmıştır (Şekil 4.8). Böylece kültürde adipoz doku kökenli MKH'leri uyaran optimal bir adipojenik besiyeri olduğunda ve hücreler standart kültür koşullarında inkübe edildiklerinde, hücreler sağlıklı bir şekilde adipojenik yönde farklılaşmış ve adipojenez düzeyi Düzey 3 ve Düzey 4'e kadar çıkmıştır. Ayrıca kuyucuklarda Düzey 1 ve Düzey 2 hücreler de görülmüştür.
- 3) **Venom Uygulanan Deney Grubu (VG):** Yirmi bir gün süreyle 50 mg/ml venom konsantrasyonu ile muamele edilen bu hücreler, pozitif kontrol grubundaki hücreler ile morfolojik olarak karşılaştırıldıklarında, venom uygulanan adipoz doku kökenli MKH'lerin, fibroblastik kök hücre morfolojilerini korudukları gözlemlenmiştir. Belirli günlerde yapılan Oil Red O boyamasında hücrelerin

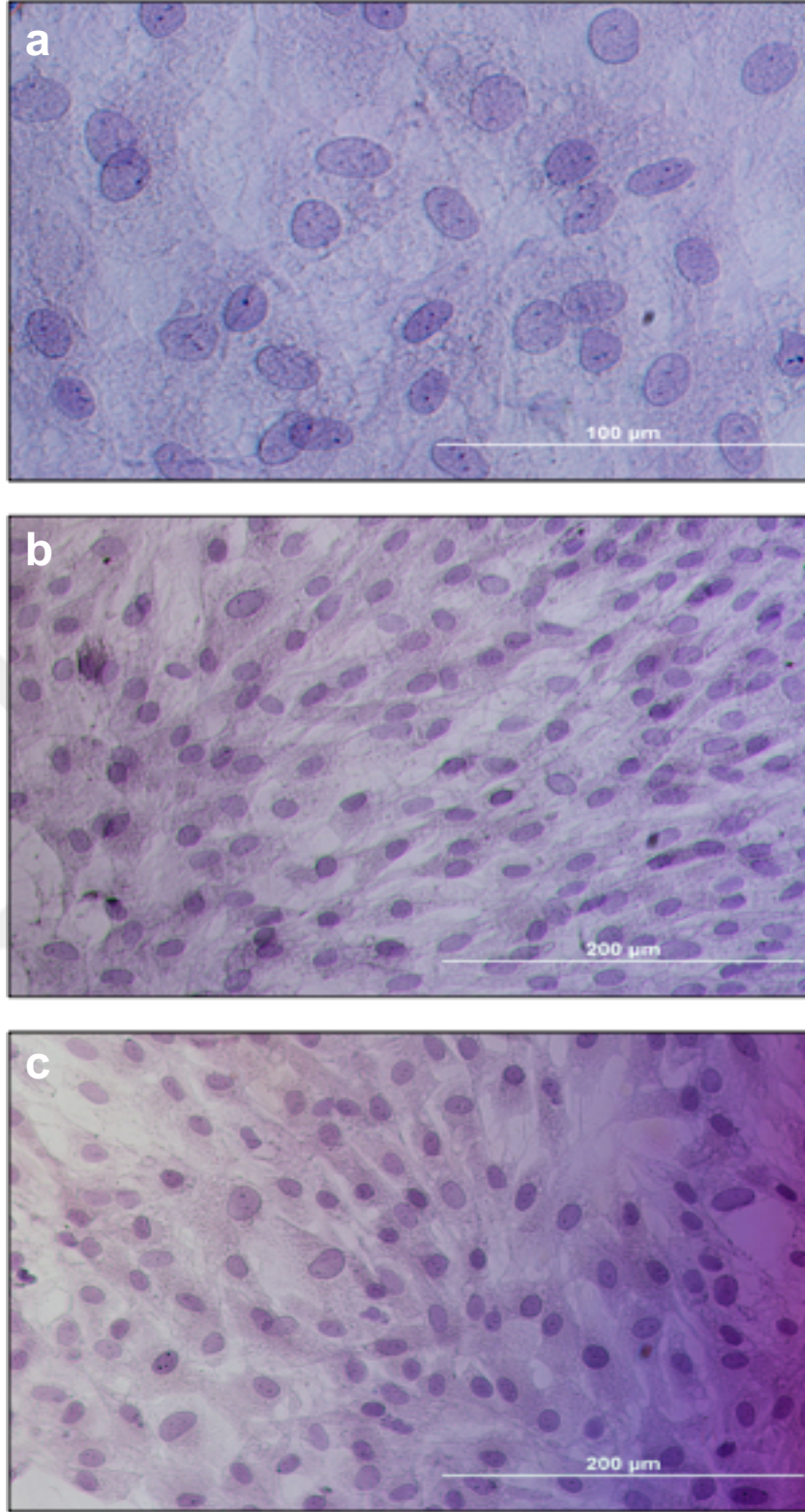
içerisinde kırmızı renkli nötral lipid damlacıkları görülmüş fakat bu damlacıkların, pozitif kontrol grubundakilere göre daha küçük ve granüler yapıda oldukları gözlemlenmiş ve hücrelerin adipojenez seviyesi olarak Düzey 1 ve Düzey 2 arasında oldukları görülmüştür (Şekil 4.9). Hücrelerdeki lipid damlacıklarının sayısı ve bu damlacıkları içeren hücrelerin sayısı pozitif kontrol grubunda olduğu gibi 21. güne kadar artmış ve 21. günün sonunda adipojenez seviyesi Düzey 1 ve Düzey 2 arasında seyretmeye devam etmiştir. Hücrelere uygulanan venomun hücreler üzerindeki sitotoksitesinden dolayı, parçalanmış hücrelerin kalıntıları zeminde birikmiş ve özellikle üçüncü haftada kirli bir zemin görünümüne neden olmuştur.



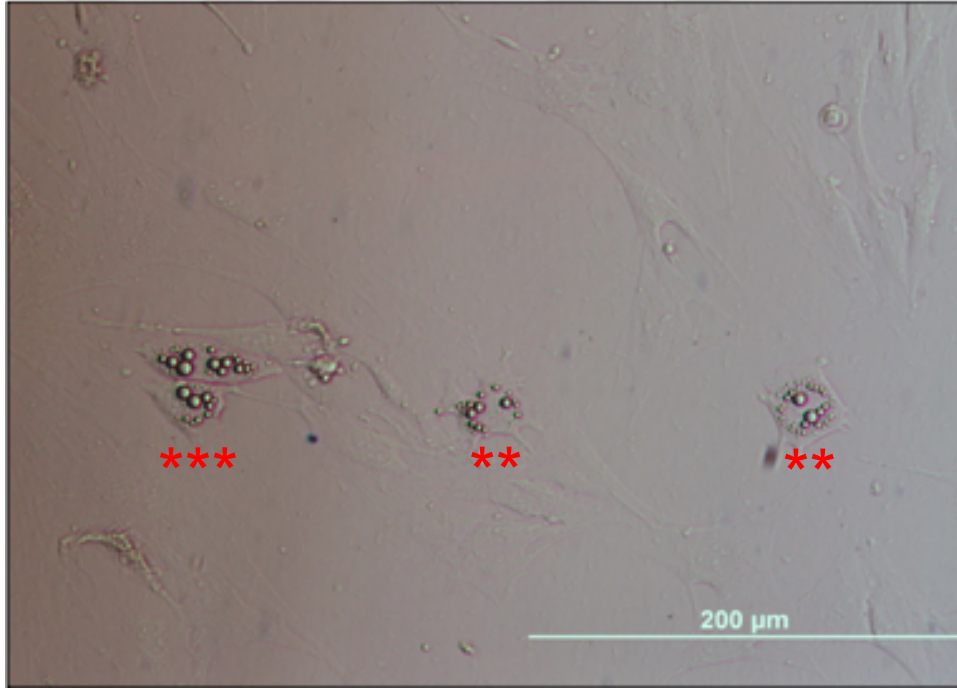
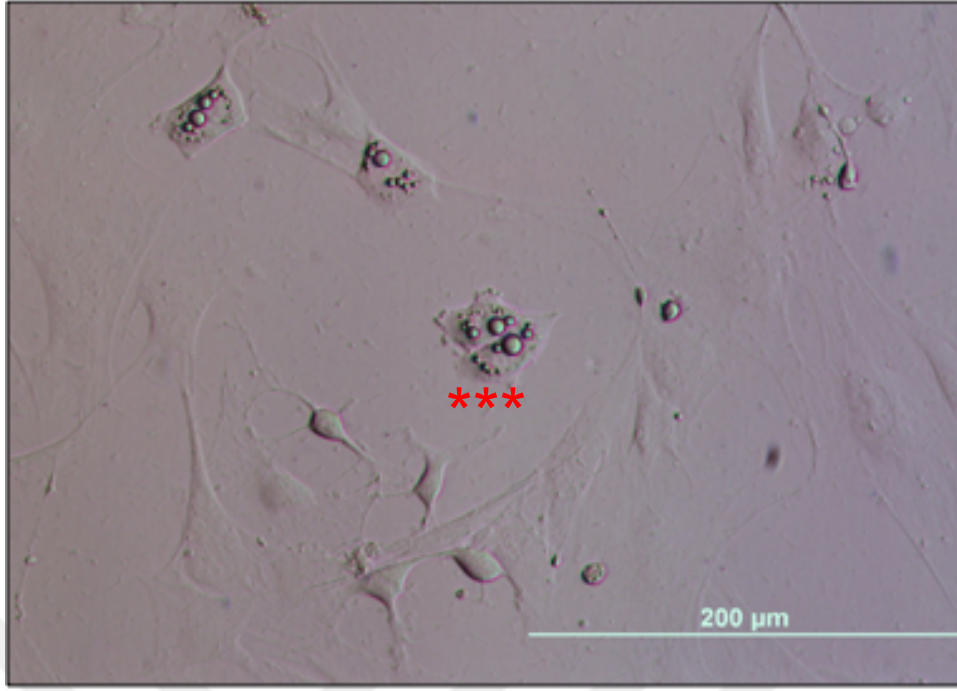


Şekil 4.5. MKH'lerin adipojenez seviyeleri. Düzeyler, lipid damlacıkları ile kaplanan hücre sitoplazması oranını belirtmektedir. Düzey 0: Adipojenez yok; Düzey 1: %0—24; Düzey 2: %25—50; Düzey 3: %51—75; Düzey 4: %76—100.

* Lipid damlacıkları

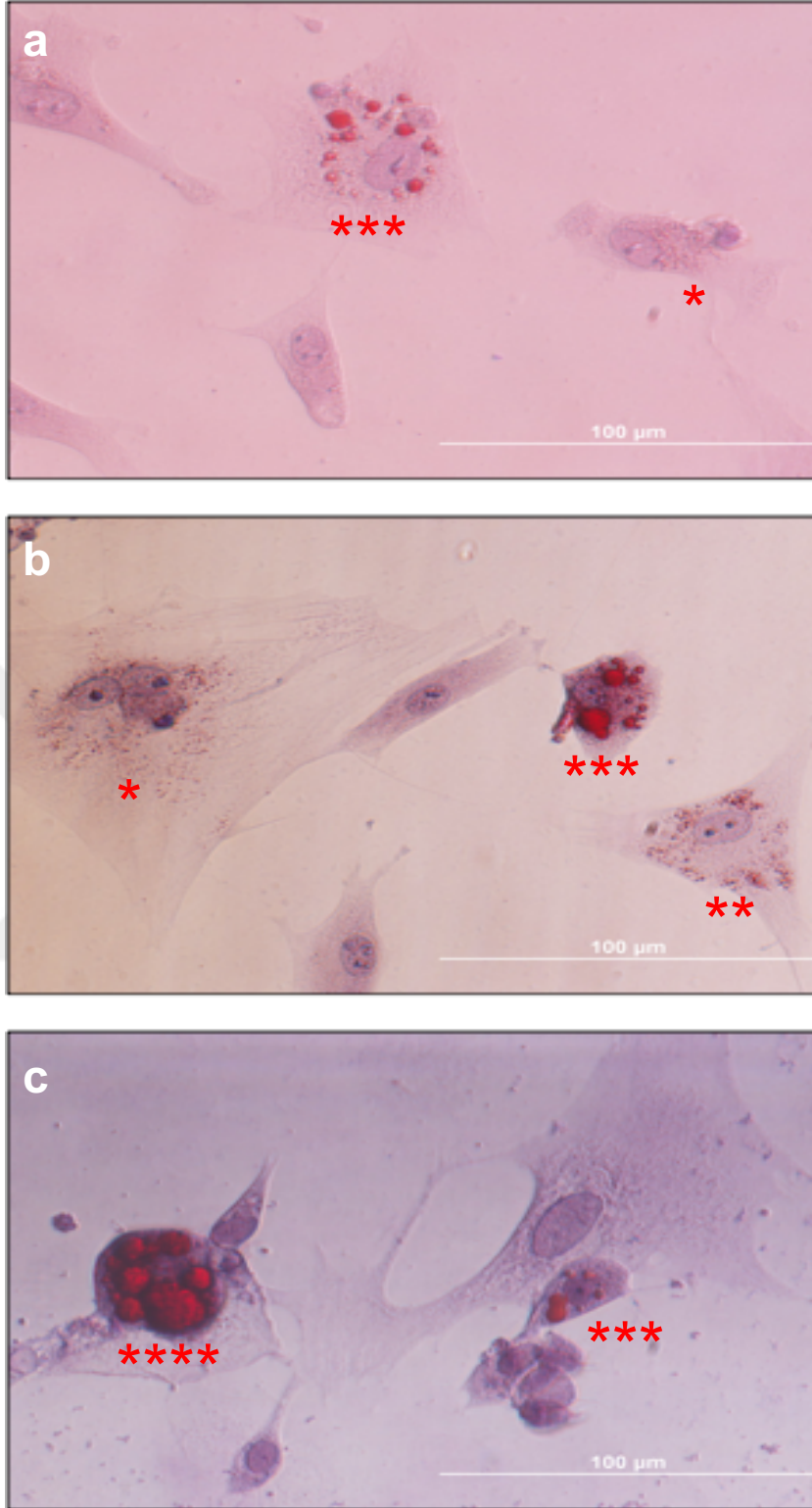


Şekil 4.6. Negatif kontrol grubu. Adipojenik farklılaşma göstermeyen MKH'ler ve Hematoksilen ile boyanan çekirdekleri. (a) 7. gün (x20), (b) 14. gün (x10), (c) 21. gün (x10). Hücrelerin adipojenez seviyeleri Düzey 0'dır.



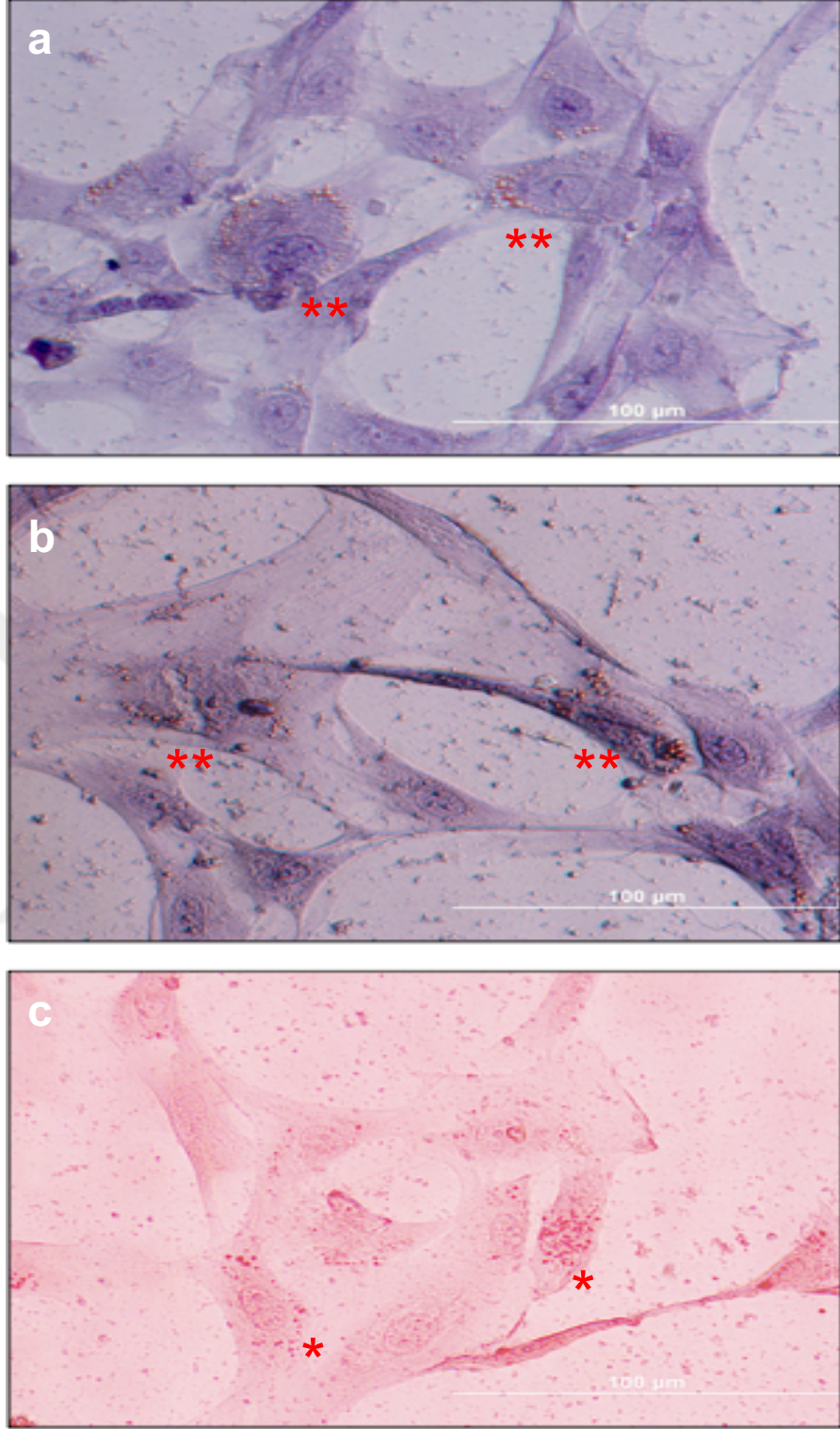
Şekil 4.7. Adipojenik besiyeri ile uyarılan pozitif kontrol grubundaki hücrelerde, dördüncü günden itibaren morfolojik olarak görülmeye başlanan nötral lipid damlacıkları (x10).

** Düzey 2 ; *** Düzey 3



Şekil 4.8. Pozitif kontrol grubu. Adipojenik farklılaşma göstermiş olan ve nötral lipid damlacıkları Oil Red O ile boyanmış MKH'ler. (a) 7. gün, (b) 14. gün, (c) 21. gün (x20).

* Düzey 1 ; ** Düzey 2 ; *** Düzey 3 ; **** Düzey 4



Şekil 4.9. Venom uygulanan deney grubu. Adipojenik farklılaşma göstermiş olan ve nötral lipid damlacıkları Oil Red O ile boyanmış MKH'ler. (a) 7. gün, (b) 14. gün, (c) 21. gün (x20).

* Düzey 1 ; ** Düzey 2

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Arı ürünlerinin terapötik olarak insan sağlığına yönelik her türlü kullanımı “apiterapi” olarak adlandırılmakta ve apiterapi, alternatif bir tedavi yöntemi olarak önemli bir rol oynamaktadır [7, 51]. Bir arı ürünü olan kompleks yapıdaki arı venomu, çok çeşitli enzimler, peptidler, serbest amino asitler, aminler, lipidler, karbohidratlar vb. bileşenleri içermektedir [10]. Bu bileşenler ile ilgili bu güne kadar sayısız araştırma yapılmış ve her bir bileşenin farklı hücre tipleri üzerindeki etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Araştırmacılar, bu bileşenlerin birkaçının bir araya geldiğinde oluşturduğu sinerjik etkiden faydalanarak veya bir bütün olarak arı venomunu hücrelere uygulayarak, kanser, kronik ağrı, romatoid artrit, multipl skleroz, deri hastalıkları ve gut hastalığı gibi birçok hastalığın tedavisinde arı venomunun tedaviyi destekleyici özellikte bir ajan olduğunu göstermişlerdir [11, 12].

Saf arı venomu sıvı haldeyken renksiz, kokusuz, keskin ve acı bir tada sahip; kurutulduğunda ise hızlı bir şekilde kristalize olarak açık sarı renk alan bir maddedir. Bu açık sarı renk, venom saflığının önemli bir göstergesidir. Renk kahverengiye döndükçe, venomun saf olmadığı ve içeriğindeki bazı proteinlerin oksidasyona uğradığı yorumu yapılabilmektedir [7]. Bu nedenle venomun, herhangi bir çalışma alanında kullanılmadan önce, içerdiği bileşenler yönünden saflığının ölçülmesi gerekmektedir. Arı venomunun karakterizasyonunda HPLC analizi, ultra performans sıvı kromatografisi (UPLC), kütle spektrometresi analizleri (MALDI-TOF-MS) ve ince tabaka kromatografisi gibi birçok yöntem kullanılmaktadır [52, 53]. Bu tez çalışmasında kullanılan arı venomunun karakterizasyonu ise HPLC analizi kullanılarak venomun temin edildiği laboratuvar (New Technology Laboratory Ltd., Gürcistan) tarafından yapılmış ve içerdiği başlıca bileşenler %65 melittin, %5,99 apamin ve %18,3 fosfolipaz A₂ olarak belirlenmiştir.

Hücrelere arı venomu uygulanarak yapılacak olan herhangi bir çalışmada, venom bileşenlerinin gösterilmesinin yanı sıra, venomun hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin de gösterilmesi büyük önem taşımaktadır ve çalışmanın gidişatı, bu sitotoksikite sonucuna göre yönlendirilmelidir. Arı venomunun terapötik amaçlı kullanımına yönelik bu güne kadar yapılan çalışmalarda kullanılan gerek insan hücrelerinin, gerekse deney hayvanı hücrelerinin venom ile muamele edildiklerinde

gösterdikleri hücresel canlılık ve venomun bu hücrelerde yarattığı etkiler çok farklı olabilmektedir [33, 36, 54, 55]. Bu nedenle hücrelerdeki doza bağlı sitotoksik etkinin ölçülerek hücreler için ölümcül dozların belirlenmesi gerekmektedir. Buradan yola çıkarak bu tez kapsamında, MTT analizi kullanılarak hücresel canlılık tayin edilmiş ve analiz sonuçlarına göre, hücrelerin yarısının ölümüne neden olan dozun 50 mg/ml olduğu ölçülmüştür. Dolayısıyla 50 mg/ml venom konsantrasyonu, bir sonraki deney aşamasında hücrelere uygulanacak doz olarak belirlenmiştir.

Arı venomunun hücreler üzerinde gözlemlenen anti-kanser, anti-tümör, anti-proliferatif ve anti-nosiseptif etkilerine ek olarak, hücresel farklılaşmayı uyardığı yönünde de bulgular bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, arı venomu ve 1,25-(OH)₂VD₃'ün sinerjik etkisinden yararlanılmış ve COX ve NF-κB aktivitesinin baskılanması ile insan akut miyeloid lösemi hücrelerinin (HL-60) proliferasyonu durdurularak bu hücrelerin monositlere dönüşümü sağlanmıştır [32].

Bir diğer çalışmada, arı venomu ile retinoik asit arasında oluşan sinerjik etkinin, murin P19 embriyonik karsinoma hücrelerinde RAR ve RXR sinyal yolları aracılığı ile nöronal farklılaşma potansiyelini %93,5 oranında artırdığı gösterilmiştir [33]. MKH'leri baz alan diğer çalışmalarda ise göbek kordonu MKH'lerine çeşitli arı venomu konsantrasyonları uygulanarak bu hücrelerin, ortamda osteojenik besiyeri bulunmaksızın osteositlere dönüştükleri Alizarin Red boyaması ile gösterilmiş [36]; arı venomu ile D3 vitamini arasındaki sinerjik etkiden faydalanılarak osteojenik farklılaşmanın uyarıldığı bildirilmiştir [37]. Bu tez çalışmasında ise sıçan adipoz doku kökenli MKH'leri ile çalışılmış ve arı venomunun bu hücreler üzerindeki adipojenik farklılaştırma potansiyeli araştırılmıştır.

Bu amaç ile, pozitif ve negatif kontrol grupları ve venom uygulanan grup olmak üzere üç deney grubu tasarlanmış ve venom grubu, sitotoksikite testi sonucu belirlenen 50 mg/ml venom konsantrasyonu ile 21 gün boyunca muamele edilmiştir. 7, 14 ve 21. günlerde yapılan Oil Red O boyaması sonucunda negatif kontrol grubundaki hücrelerde beklenildiği üzere herhangi bir adipojenik farklılaşma gözlemlenmemiş, adipojenik besiyeri ile uyarılan pozitif kontrol grubundaki hücrelerde ise kırmızı renkli nötral lipid damlacıkları gözlemlenmiştir. Lipid damlacıklarının sayısı ve büyüklüğü üçüncü haftaya kadar artmaya devam etmiş ve üçüncü haftanın sonunda

hücrelerdeki adipojeniz seviyesi çoğunlukla Düzey 3 ve Düzey 4 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol grubundaki hücreler, dördüncü günden itibaren, adipojenizin başlaması ve hipertrofiyen dolayı yuvarlak bir morfoloji göstermeye başlamışlardır.

Pozitif kontrol grubu ile venom uygulanan grup 21 gün boyunca morfolojik olarak karşılaştırıldığında, venom uygulanan gruptaki adipoz doku kökenli MKH'lerin, adipojeniz esnasında görülmesi beklenen yuvarlak morfoloji ve hipertrofiyi göstermedikleri, bunun aksine fibroblastik yapıdaki mezenşimal kök hücre morfolojilerini korudukları gözlemlenmiştir. Bunun yanında belirli günlerde yapılan Oil Red O boyaması ile hücrelerin içeriğindeki kırmızı renkli nötral lipid damlacıkları net bir şekilde inverted mikroskopta görülmüştür. Fakat bu lipid damlacıklarının, pozitif kontrol grubunda gözlemlenen lipid damlacıklarından daha küçük ve granüler yapıda oldukları saptanmış ve hücrelerdeki adipojeniz seviyesinin Düzey 1 ve Düzey 2 olduğu görülmüştür.

Hem pozitif kontrol hem de venom grubundaki adipoz doku kökenli MKH'lerin sitoplazmasında multiloküler şekilde yerleşik olan lipid damlacıklarının henüz birleşip, tek bir büyük lipid damlacığı haline gelmemelerinin ilk sebebinin, arı venomu kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Arı venomunun etkisine bağlı olarak adipojenizin adipoz doku kökenli MKH'lerde yavaş ilerliyor olabileceği yorumu getirilmiştir. İkinci sebep olarak ise, dondurulmuş olan adipoz doku kökenli MKH'lerin farklı donörlerden (sıçan) alınmış olabileceğidir. Yapılan çalışmalar, farklı donörlerden alınan aynı tipteki MKH'lerin heterojenöz yapıda olduklarını, dolayısıyla farklılaşma derecelerinde değişiklikler olduğunu göstermiştir [56]. Bu bilgiler doğrultusunda, tez çalışmasında kullanılan adipoz doku kökenli MKH'lerin, adipojenik farklılaşma öncesi gösterdikleri kararlanma evrelerinin birbirinden farklı olduğu düşünülmüştür.

Elde edilen bu sonuçlardan yola çıkarak literatürde ilk kez, herhangi bir adipojenik besiyeri kullanılmaksızın arı venomunun, adipoz doku kökenli MKH'leri adipojenik yönde uyatarak bu hücrelerde adipojenizi başlattığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, çalışmanın başında kurulan H₀ hipotezi reddedilmiş ve *“Bal arısı venomu, standart kültür koşullarında adipojenik besiyeri olmaksızın tek başına adipoz doku kökenli*

MKH'ler üzerine uygulandığında, bu hücrelerin adipojenik farklılaşma potansiyeline etki etmekte ve hücreleri uyararak adipojenik yönde farklılaştırmaktadır. Bu nedenle arı venomu, adipojenezi başlatan bir ajan olarak görev yapmaktadır.” şeklinde kurulan H₁ hipotezi kabul edilmiştir.

Nabiuni ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda, insan kökenli MKH'lerin osteojenik yönde farklılaşması için kullanılan ve diğer hücre kültürü çalışmalarında kullanılan mikrogram (μ g) düzeyindeki venom konsantrasyonları ile çalışmamızda sıçan adipoz doku kökenli MKH'lere uyguladığımız 50 mg/ml venom konsantrasyonu karşılaştırıldığında MKH'lerin, köken aldığı hayvan ve dokuya göre sitotoksisiteye olan toleransının değişebileceği düşünülmüştür. Ayrıca düşük venom konsantrasyonlarının osteojenik, yüksek venom konsantrasyonlarının ise adipojenik farklılaşmayı uyarabileceği yorumu getirilmiştir. Ancak tez kapsamında, adipojenik farklılaşmanın hangi sinyal yolları aracılığı ile gerçekleştiğine dair bir çalışma yürütülmemiştir.

Çalışmanın bir sonraki aşaması için bal arısı venomunun, MKH'leri hangi spesifik sinyal yolları ile adipojenik yönde farklılaştırdığının ve venom içeriğindeki bileşenlerden hangisinin bunda rol oynadığının araştırılması planlanmaktadır. Bu tez çalışmasında elde edilen Oil Red O boyası verilerine ek olarak, gerçek zamanlı PCR (real time PCR, RT-PCR, qPCR) tekniği kullanılarak adipojeneze özgü transkripsiyon faktörü olan PPAR γ ve geç adipojenezde gözlemlenen FABP4 proteinine ait gen ifadelerinin ölçülmesi hedeflenmektedir. Ayrıca hem FABP4 protein birikiminin ölçümü hem de Nil Kırmızısı boyası (Nile Red staining) ile hücrelerdeki lipid damlacıklarının ölçümü için akış sitometri analizinin uygulanması düşünülmektedir.

Tüm bu çalışmalardan elde edilecek olan veriler değerlendirilerek, adipoz doku kökenli MKH'lerdeki bal arısı venomu ile uyarılan adipojenezin verimliliği ve güvenilirliği doğru bir şekilde gösterilebilecektir. Böylece, adipojenezin tamamlanmasının ardından olgun adipositlere farklılaşacak olan adipoz doku kökenli MKH'lerinin, genel bilgilerde ayrıntılı bir şekilde değinilen doku mühendisliği alanında kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu hücreler çeşitli aşamalardan geçirilerek, klinikte kullanılmak üzere hazırlanacak ve uygun yağ doku iskeleleri ile

bir araya getirilen MKH'ler, doku kayıplarının giderilmesi için önemli bir kaynak olabilecektir.



6. KAYNAKLAR

- [1] Winston M.L., *The biology of the honey bee*. Harvard University Press **1991**.
- [2] Korkmaz A., *Anlaşılabilir Arıcılık*. Vol. 1. **2015**.
- [3] Kence A. Türkiye Balarılarında Genetik Çeşitlilik ve Korunmasının Önemı. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, (1) **2006**.
- [4] Mebs D., *Venomous and Poisonous Animals*. Medpharm, Stuttgart p. 339, **2002**.
- [5] Sorkun K. et al., *Yaşam İçin Arılar*. Türkiye Arı Yetiřtiricileri Merkez Birlięi, p. 135, **2008**.
- [6] Anonim. Arının Anatomisi, <http://www.sakaryaaricilarbirligi.org.tr/arinin-anatomisi> (27 Aralık 2012).
- [7] Krell R. *Value-added products from beekeeping*. Food & Agriculture Org. **1996**
- [8] Snodgrass R.E., *Anatomy of the honey bee*. Cornell University Press, **1984**.
- [9] Elieh D.A.K., Shafaghat F., Zwiener R. Immunology of Bee Venom. *Clinical Reviews In Allergy & Immunology*, **2017**.
- [10] De Lima, P. Brochetto-Braga M. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 9(2): p. 149-162, **2003**.
- [11] Son D.J. et al., Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, 115(2): p. 246-270, **2007**.
- [12] Mizrahi A., Y. Lensky. Bee products: properties, applications, and apitherapy. *Springer Science & Business Media* **2013**.
- [13] Rybak-Chmielewska H., Szczęsna T. HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *J Apicultural Sci* 48(2): p. 103-9, **2004**.
- [14] Ziai M.R. et al. Mast cell degranulating peptide: a multi-functional neurotoxin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42(7): p. 457-461, **1990**.
- [15] Can A., *Kök hücre. Biyoloęisi, Türleri ve Klinik Kullanımları*. Ankara, Akademisyen Yayınevi, 715, **2014**.
- [16] Cowen C., Melton D. *Stemness: Definitions, Criteria, and Standards*. Essentials of Stem Cell Biology, p. 25-31, **2006**.

- [17] Smith A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1): p. 435-462, **2001**.
- [18] Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol*, 25(2): p. 57-59, **2008**.
- [19] Orbay H., Tobita M, Mizuno H., Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells International*, **2012**.
- [20] Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 9(1): p. 204, **2007**.
- [21] Makino S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(5): p. 697-705, **1999**.
- [22] Snykers S. et al. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*, 27(3): p. 577-605, **2009**.
- [23] Lindroos B., Suuronen R., Miettinen S., The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(2): p. 269-291, **2011**.
- [24] Fellows C.R. et al. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Frontiers In Genetics*, 7: p. 213, **2016**.
- [25] Sell S. *Stem Cells Handbook*. Springer, **2013**.
- [26] Klingemann H., Matzilevich D, Marchand J. Mesenchymal Stem Cells-Sources and Clinical Applications. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35(4): p. 272-277, **2008**.
- [27] Chen Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death and Differentiation*, 23(7): p. 1128, **2016**.
- [28] Zhang H.H. et al. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PloS One*, 4(7): p. e6189, **2009**.
- [29] Shugart E.C., Umek R.M. Dexamethasone signaling is required to establish the postmitotic state of adipocyte development. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*, 8(10): p. 1091-1098, **1997**.
- [30] Leyvraz C. et al. Selective effects of PPAR γ agonists and antagonists on human pre-adipocyte differentiation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12(3): p. 195-203, **2010**.

- [31] Ràfols M.E. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 61(2): p. 100-112, **2014**.
- [32] Mohseni-Kouchesfahani H. et al. Honey bee venom combined with 1, 25-dihydroxyvitamin D3 as a highly efficient inducer of differentiation in human acute myeloid leukemia cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 13(3): p. 544, **2017**.
- [33] Kouchesfahani H.M. et al. Effect of honey bee venom on differentiation of cholinergic neurons. *Journal of Venom Research*, 1: p. 29, **2010**
- [34] Lu Z. et al. Nerve growth factor from Chinese cobra venom stimulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Disease*, 8(5): p. e2801, **2017**.
- [35] Orsi P.R. et al. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1): p. 205, **2017**.
- [36] Nabiuni M. et al. Honey bee venom will differentiate mesenchymal stem cells in to the osteocyte. *International Conference on Applied Life Sciences. InTech*, **2012**.
- [37] Nabiuni M. et al. Study of Bee Venom and Vitamin D3 Differential Effects on Stem Cells Derived From Umbilical Cord In To Osteoblast. **2012**.
- [38] Hoshiba T, Lu H, Kawazoe N, Chen G. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opinion On Biological Therapy*, 10:1717-1728, **2010**.
- [39] Hoshiba T et al. Decellularized extracellular matrix as an in vitro model to study the comprehensive roles of the ECM in stem cell differentiation. *Stem Cells international* 2016.
- [40] Sellaro TL, Ravindra AK, Stolz DB, Badylak SF. Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds. *Tissue Engineering* 13:2301-2310, **2007**
- [41] Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Research International* **2017**
- [42] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32:3233-3243, **2011**.
- [43] Flynn L. The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 31:4715-4724, **2010**.

- [44] Wang L, Johnson JA, Zhang Q, Beahm EK. Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering. *Acta biomaterialia* 9:8921-8931, **2013**.
- [45] Niyaz M. et al. Isolation, culturing and characterization of rat adipose tissue derived mesenchymal stem cells: a simple technique. *Turkish Journal of Biology*, 36(6), **2012**.
- [46] Aldridge A. et al. Assay Validation for The Assessment of Adipogenesis of Multipotential Stromal Cells—A Direct Comparison of Four Different Methods. *Cytotherapy*, 15(1), 89-101, **2013**.
- [47] English A. et al. A Comparative Assessment of Cartilage and Joint Fat Pad As A Potential Source of Cells for Autologous Therapy Development In Knee Osteoarthritis. *Rheumatology*. 46:1676e83, **2007**.
- [48] Ode A, Kopf J, Kurtz A et al. CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Euro Cells Mater* 22: 26-42, **2011**.
- [49] Wiesmann A, Bühring HJ, Mentrup C et al. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med* 2: 1-6, **2006**.
- [50] Abdi R, Fiorina P, Adra CN et al. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 57: 1759-67, **2008**.
- [51] Barış D., FİDAN A.F. Apis Venomunun Diabetes Mellitus ve Pankreas Üzerine Etkileri. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 8(2): p. 51-63, **2015**.
- [52] Matysiak J. et al. Proteomic Analysis of Apis Mellifera Venom Determined by Liquid Chromatography (Lc) Coupled With Nano-Lc-Maldi-Tof/Tof Ms. *Acta Olonae Pharmaceutica*, 74(1): p. 53-65, **2017**.
- [53] Şirin Y. et al. Bal Arısı Zehrinin Karakterizasyonunda SDS-Page Elektrophorez Kullanılabilirliğinin Araştırılması. *Uludag Bee Journal*, 16(2), **2016**.
- [54] Jeon S. et al. Bee venom stimulates human melanocyte proliferation, melanogenesis, dendricity and migration. *Experimental & Molecular Medicine*, 39(5): p. 603, **2007**.
- [55] Nabiuni M. et al. Neural Differentiation and developmental Effects of Honey Bee Venom on PC12 Cells; A Comparison to Nerve Growth Factor (NGF). *Journal of Adv. Lab. Res. in Bio.* ISSN, p. 0976-7614, **2012**.
- [56] Sen A. et al. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *Journal of Cellular Biochemistry*, 81(2): p. 312-319, **2001**.

EKLER

EK 1. İMMÜNFLORESAN BOYAMA PROTOKOLÜ

- 1) Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak hücreler fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmıştır.
- 2) Hücreler soğuk metanolde beş dakika süre ile fikse edilmiştir.
- 3) Fiksatif havada kurutularak uzaklaştırılmış ve hücreler üç kez PBS ile yıkanmıştır.
- 4) Hücreler engelleyici serum (%10 normal keçi serumu:PBS) ile 20 dakika inkübe edilmiştir.
- 5) Engelleyici serum uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır.
- 6) Hücreler primer antikor solüsyonları ile 60 dakika, karanlık ortamda, 25°C'de inkübe edilmiştir.
- 7) Primer antikor uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile üç kez beş dakika süre ile yıkanmıştır.
- 8) Hücreler sekonder antikor solüsyonları (CD13 yüzey antijeni için: goat anti-mouse IgG-1 FITC, CD71 yüzey antijeni için: goat anti-mouse IgG-1 FITC) ile 45 dakika inkübe edilmiştir.
- 9) Sekonder antikor uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile üç kez beş dakika süre ile yıkanmıştır.
- 10) Hücrelerin yüzeyi mounting medium ile kapatıldıktan sonra FITC için 493-528 nm dalga boyunda floresan ekli inverted mikroskopta inceleme yapılmıştır.

Primer ve sekonder antikorlar, 1:100 (v/v) oranında PBS içerisinde hazırlanmıştır. Mikroskop incelemesi, floresan ışımının solmasını engellemek amacı ile boyamanın hemen ardından yapılmıştır.

EK 2. MTT ANALİZİ PROTOKOLÜ

- 1) Belirlenen zaman dilimlerinde hücrelerin üzerinden venom/besiyeri karışımı uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 100 µl %10 MTT'li besiyeri eklenmiştir.
- 2) Hücreler etüvde dört saat inkübe edilmiştir.
- 3) Dört saat sonunda hücrelerin üzerindeki MTT'li besiyeri uzaklaştırılmıştır.
- 4) Oluşan formazan kristallerinin gözlemlenebilmesi için her bir kuyucuğa 100 µl izopropil alkol eklenmiştir.
- 5) Örneklerin absorbans değerleri 570 nm'de ELISA cihazında okutulmuştur.

%10 MTT'li besiyeri; 1:10 oranında MTT/serumsuz DMEM/F12 ile hazırlanmıştır.



EK 3. OIL RED O BOYAMA PROTOKOLÜ

1. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılır.
2. Hücreler iki kez PBS ile yıkanır.
3. Hücreler %10 formalinde 25°C'de beş dakika süre ile fikse edilir.
4. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra hücreler distile su ile iyice yıkanır.
5. Hücreler %60 izopropanol ile yıkanır.
6. Hücreler, taze hazırlanan Oil Red O boyası ile 15 dakika inkübe edilir.
7. Hücreler iki kez %60 izopropanol ile yıkanır.
8. Hücre çekirdekleri Hematoksilen boyası ile 10 saniye süre ile boyanır.
9. Hücreler üç kez distile su ile yıkanır.
10. Hücrelerin üzerine PBS eklenir.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Melis SESLİ

Doğum Yeri: Kdz. Ereğli/Zonguldak

Medeni Hali: Bekar

E-posta: melisesli@gmail.com

Adresi: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Beytepe/Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lise: 2007-2011 TED Karadeniz Ereğli Koleji

Lisans: 2011-2015 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü; 2014 Bahar Dönemi
Sevilla Üniversitesi (Erasmus Öğrenci Programı)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce ileri düzey, İspanyolca orta düzey

İş Deneyimi

—

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

—

Tezden Üretilmiş Yayınlar

—

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Sesli M, Akbay E, Onur MA. Adipogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells Under Honey Bee Venom Treatment, Nisan 2018, 7. Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya. İngilizce Poster Sunumu.



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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 07/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: BAL ARISI VENOMUNUN ADİPOZ DOKU KÖKENLİ MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 50 sayfalık kısmına ilişkin, 25/05/2018 tarihinde ~~Yahya~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: MELİS SESLİ
Öğrenci No: N14320455
Anabilim Dalı: BİYOLOJİ / GENEL BİYOLOJİ
Programı: HAYVAN FİZYOLOJİSİ
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.


07/06/2018

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



PROF. DR. MEHMET ALİ ONUR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)



HACETTEPE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCE AND ENGINEERING
THESIS/DISSERTATION ORIGINALITY REPORT

HACETTEPE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCE AND ENGINEERING
TO THE DEPARTMENT OF BIOLOGY

Date: 07/06/2018

Thesis Title / Topic: EFFECTS of HONEY BEE VENOM on ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

According to the originality report obtained by myself/my thesis advisor by using the *Turnitin* plagiarism detection software and by applying the filtering options stated below on 25/05/2018 for the total of 50 pages including the a) Title Page, b) Introduction, c) Main Chapters, d) Conclusion sections of my thesis entitled as above, the similarity index of my thesis is 3 %.

Filtering options applied:

1. Bibliography/Works Cited excluded
2. Quotes excluded /~~included~~
3. Match size up to 5 words excluded

I declare that I have carefully read Hacettepe University Graduate School of Science and Engineering Guidelines for Obtaining and Using Thesis Originality Reports; that according to the maximum similarity index values specified in the Guidelines, my thesis does not include any form of plagiarism; that in any future detection of possible infringement of the regulations I accept all legal responsibility; and that all the information I have provided is correct to the best of my knowledge.

I respectfully submit this for approval.

Date and Signature

Name Surname: MELİS SESLİ

Student No: N14320455

Department: BIOLOGY

Program: ANIMAL PHYSIOLOGY

Status: ☒ Masters ☐ Ph.D. ☐ Integrated Ph.D.

07/06/2018

ADVISOR APPROVAL

APPROVED.

PROF. DR. MEHMET ALİ ONUR

(Title, Name Surname, Signature)