

**BAL ARISI (*APIS MELLIFERA*) VENOMUNDAN
SAFLAŞTIRILMIŞ MELİTTİN'İN U118 GLİOBLASTOMA
HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**PURIFIED MELITTIN FROM HONEYBEE (*APIS
MELLIFERA*) VENOM'S EFFECTS ON U118
GLIOBLASTOMA CELL LINE**

KÜBRA NUR GÜVEN

PROF.DR.NEVİN KESKİN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

Kübra Nur GÜVEN 'in hazırladığı “ **Bal Arısı (*Apis Mellifera*) Venomundan Saflaştırılmış Melittin'in U118 Glioblastoma Hücre Hattı Üzerindeki Etkileri**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Figen ÜNLÜ ERKOÇ
Başkan

Figen Erkoç

Prof. Dr. Nevin KESKİN
Danışman

Nevin Keskin

Prof. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP
Üye

Duygu Özel Demiralp

Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR
Üye

Özer Aylin Gürpınar

Yrd. Doç. Dr. Banu Şebnem ÖNDER
Üye

Banu Şebnem Önder

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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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 etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

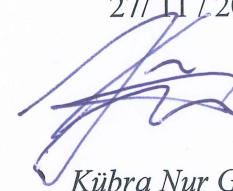
- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

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

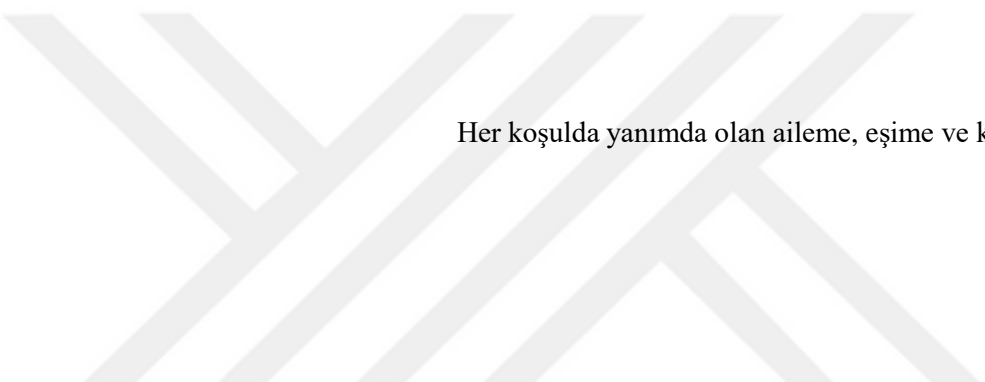
- Tezimin/Raporumun 27/11/2020 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

27/11/2017



Kübra Nur GÜVEN



Her koşulda yanımda olan aileme, eşime ve kızıma ...

ETİK

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

- 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 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.

27/11/2017

Kübra Nur GÜVEN

ÖZET

BAL ARISI (*APIS MELLIFERA*) VENOMUNDAN SAFLAŞTIRILMIŞ MELİTTİN'İN U118 GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Kübra Nur GÜVEN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nevin KESKİN

Kasım 2017, 74 Sayfa

Glioblastoma multiforme (GBM); merkezi sinir sistemi içindeki glial hücrelerinden ortaya çıkan, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından grade IV olarak tanımlanan ölümcül beyin tümörlerinden bir tanesidir.

MMP-9 ve ADAMTS-5 proteazları kanserli hücre invazyonunda etkili proteazlardır, bunların yanısıra TGF- β sitokini de hücre invazyonunda etkindir. Günümüzde uygulanan kanser tedavilerinin yetersiz kalması nedeniyle, bu konuda kemoterapötik ilaçların etkinliğini artırabilecek yeni ajanlar ve tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. Bu konuda en çok araştırılan biyotoksinlerden olan Melittin (MEL), arı zehrinin ana bileşenini oluşturmaktadır.

Bu çalışmada bal arısı (*Apis mellifera*) venomundan saflaştırılmış melittinin, U118 glioblastoma hücre hattı üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Melittin'in hücrelerdeki mitokondriyal aktivitesi MTT testi ile, protein içeriğinin varlığı ise Western Blotting yöntemi ile araştırılmıştır. MTT testinde 1, 3, 24, 48 ve 72 saat süreyle 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında MEL' e maruz bırakılan U118 hücrelerinde; en düşük

absorbans değerleri 10, 15 ve 20 µg/ml dozlarında ölçülmüştür. U118 kontrol grubu hücrelerinde TGF-β protein düzeyi düşük görülürken, MEL'in düşük doz olarak hücreye verilmesiyle TGF-β'nın aktif hale geldiği görülmüştür. MEL'in toksik etkisiyle TGF-β'nın aktivasyonu artmıştır. Ancak uygulama zamanı arttıkça ve MEL'in U118 hücresi üzerindeki toksik etkisi de artarak; TGF-β'nın baskılandığı görülmüştür. U118 kontrol hücrelerine göre TGF-β protein düzeyindeki en fazla düşüş, 3 µg/ml konsantrasyonda 48 saat Melittin uygulanan hücrelerde görülmüş ve düşüş 0,7 kattır. U118 hücrelerine uygulanan 48 saat 3 µg/ml konsantrasyonda Melittin uygulanan hücrelerden Melittin'nin toksik etkisinden dolayı MMP-9 proteinin salgılanması baskılanmış ve bu nedenle bant görüntüsü alınamamıştır. Uygulanan 3 µg/ml konsantrasyondaki MEL'in 24 saatlik uygulamasında MMP-9 protein düzeyi kontrol hücrelerine göre 0,8 kat düşüş görülmüştür. U118 hücrelerinin ADAMTS-5 protein seviyelerinin kontrol grubu hücrelerine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. U118 kontrol hücrelerine göre, en fazla düşüş 3 µg/ml konsantrasyonda 48 saat Melittin uygulanan hücrelerin ADAMTS-5 protein düzeyinde görülmüş ve düşüş 0,85 kattır. Western Blotting ile analiz edilen MMP-9 ve ADAMTS-5 proteazlarının ve TGF-β sitokininin protein seviyeleri en düşük 48 saat süreyle 3 µg/ml konsantrasyonda MEL uygulanan hücrelerde görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar GBM hücrelerinin tedavisinde MEL'in alternatif bir yol olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Melittin, GBM, U118, MMP-9, ADAMTS-5, TGF-β

ABSTRACT

PURIFIED MELITTIN FROM HONEYBEE (*APIS MELLIFERA*) VENOM'S EFFECTS ON U118 GLIOBLASTOMA CELL LINE

Kübra Nur GÜVEN

Postgraduate, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nevin Keskin

(co-supervisor)

November 2017, 74 pages

Glioblastoma multiforme (GBM); is one of the deadly brain tumors created by the glial cells in the central nervous system defined as grade IV by the World Health Organization (WHO).

MMP-9 and ADAMTS-5 are proteases that are effective in cancer cell invasion, besides TGF- β cytokines are effective in cell invasion. Due to the inadequacy of currently available cancer therapies, new agents and treatment strategies which can increase the effectiveness of chemotherapeutic drugs have started to be needed. One of the most investigated biotoxin, Melittin (MEL) is the main component of bee venom.

In this study, the effects of purified melittin from honeybee (*Apis mellifera*) venom on U118 glioblastoma cell line was investigated. Mitochondrial activities of the melittin on the cells with MTT test, and the presence of protein component on the cells with the western blotting method have been displayed. The lowest absorbance values in U118 cells exposed to MEL at concentrations of 0.5, 1, 3, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$ for 1, 3, 24, 48 and 72

hours in MTT test were measured at doses of 10, 15 and 20 $\mu\text{g/ml}$. While TGF- β protein levels were low in the U118 control group cells, it was observed that TGF- β was activated by administration of low dose MEL to the cells. The activation of TGF- β has increased by the toxic effect of MEL. However; toxic effect of MEL on U118 cell increases with increased administration time, and TGF- β has been suppressed. The highest decrease in TGF- β protein level compared to U118 control cells was observed in cells treated with Melittin for 48 hours at a concentration of 3 $\mu\text{g/ml}$, and the decrease was 0.7 fold. Because of the toxic effect of Melittin, the secretion of MMP-9 protein was suppressed in cells treated with Melittin at a concentration of 3 $\mu\text{g/ml}$ for 48 hours in U118 cells, and thus no band image was able to be obtained. At 24 hours of application of MEL at 3 $\mu\text{g/ml}$ concentration, there was a 0.8 fold decrease in MMP-9 protein level compared to control cells. It has been identified that the ADAMTS-5 protein levels of U118 cells were lower than control cells. Comparing to the U118 control cells, the highest decrease was observed at ADAMTS-5 protein level of cells treated with Melittin for 48 hours at a concentration of 3 $\mu\text{g/ml}$, and the decrease was 0.85 fold. The protein levels of MMP-9 and ADAMTS-5 proteases and TGF- β cytokin analysed by western blotting has been displayed the cells threated with MEL minimum level through 48 hour and 3 $\mu\text{g/ml}$ concentration. The results obtained that MEL may be an alternative way for therapy of GBM cells.

Keywords: Melittin, GBM, U118, MMP-9, ADAMTS-5, TGF- β

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her koşulda yanımda olan ve tezimi yaparken bana karşı inancını yitirmeyen ve beni olumlu yönde teşvik eden canım hocam Prof. Dr. Nevin Keskin'e, tez süresince akademik hayatımda önemli tecrübeler kazanmama vesile olan ve bilgilerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Figen Ünlü Erkoç ve Yrd. Doç Dr. Banu Şebnem Önder'e, tez süresince bilgilerini ve laboratuvar imkanlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Duygu Özel Demiralp ve Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar' a, Dr. Handan Sevim'e, U118 hücrelerin teminini sağlayan ve deneylerde yardımcı olan Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu'na, Dr. Tülin Özkan'a ve Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ailesine, deneyleri yaparken tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan Prof. Dr. Hilal Özdağ'a, Yrd. Dr. Doruk Engin'e, Dr. Beycan Ayhan'a, Devrim Aydın'a ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji ailesinin diğer elemanlarına, tez çalışması süresince tecrübelerini ve bilgilerini esirgemeyen her zaman ilerlediğim yolda zorlukları aşmamda bana yardımcı olan, Dr. Fatma Zülifdar'a, Dr. Egemen Foto'ya, Dr. Çiğdem Özenirler'e ve Dr. Nezahat Pınar Barkan'a, uygulamalı biyoloji ailesine, yüksek lisans boyunca desteğini esirgemeyen dostlarım Özlem Elçioğlu, Serpil Metin ve Serhat Ertuğrul'a, hayatım boyunca okumamı teşvik eden, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam İsmail Küpçüler'e, annem Gülşen Küpçüler'e, kardeşim ve dostum Elif Büsra İşçioğlu ve eşi Gökhan İşçioğlu'na, minik yeğenim Mehmet Çınar'a, anne karnından itibaren şefkatli ve merhametli kanatlarını üstümden esirgemeyen şimdi bir melek olan sevgili anneanneme, varlığını her zaman yanımda durarak hissettiren ve akademik ilerlememde maddi ve manevi beni teşvik eden eşim Emre Güven'e ve tezimi hazırlarken hem yazım hem deney aşamasında sabırla ve bana olan inancıyla her daim benimle birlikte olan biricik kızım Beyza Güven'e tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER	viii
ÇİZELGELER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Arı Zehri ve Kanser	3
2.1.1. Arı Zehrinin Anti-Kanser Etkisi	4
2.1.2. Melittin'in Anti-Kanser Etkisi.....	4
2.1.3. Melittin'in Anti-Kanser Etki Mekanizmaları	6
2.1.3.1. Tümör Metastazının ve İnvazyonunun İnhibisyonu.....	6
2.1.3.2. Anjiyogenez.....	6
2.2. Merkezi Sinir Sistemi ve Gliomalar	7
2.2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM)	8
2.2.2. ECM'nin GBM İnvazyonuna Etkisi	11
2.2.3.ECM Degredasyonu ve Proteazlar	11
3.MATERYAL - METOT	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Çalışmada kullanılan GBM Hücre Hattı	13
3.1.2. Hücre Kültürünün Pasajlanması ve Dondurulmasında Kullanılan Malzemeler.....	13
3.1.3.[3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromür] (MTT) Sitotoksisite Testi	13
3.1.4. Protein İzolasyonu ve Protein Tayini İçin Kullanılan Malzemeler	13
3.1.5. Western Blotting İçin Kullanılan Malzemeler.....	14
3.2. Yöntemler	14
3.2.1. Hücre Hattının Kültürü.....	14
3.2.2. Hücrelerin Beslenmesi.....	15
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	15

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması	15
3.3. Melittin'in Hazırlanması	16
3.4. MTT İle Sitotoksosite Testi.....	16
3.5. Western Blotting İçin U118 Hücrelerinin Eldesi	18
3.6. Protein İzolasyonu	18
3.7. Protein Miktar Tayini	18
3.8. Western Blotting.....	18
3.8.1. Yürütme	19
3.8.2. Transfer.....	19
3.8.3. Bloklama.....	19
3.8.4. Primer Antikor (1. Ab)	19
3.8.5. Sekonder Antikor (2.Ab)	19
3.8.6. ECL Solüsyonu İle Görüntüleme	21
3.9. İstatistiksel Analizler	20
4. BULGULAR	21
4.1. Hücre Hattının Kültürü.....	21
4.2. MTT ile Sitotoksosite Testi	21
4.3. Protein Ölçümleri	31
4.4. Western Blotting.....	33
4.4.1. Melittin'in 0,5, 1 ve 3 µg/ml Konsantrasyonlarında U118 Hücrelerine 3, 24 ve 48 saat Uygulanması sonucu TGF-β Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi.....	34
4.4.2. Melittin'in 0,5, 1 ve 3 µg/ml Konsantrasyonlarında U118 Hücrelerine 3, 24 ve 48 saat Uygulanması sonucu ADAMTS-5 Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi	37
4.4.3. Melittin'in 0,5, 1 ve 3 µg/ml Konsantrasyonlarında U118 Hücrelerine 3, 24 ve 48 saat Uygulanması Sonucu MMP-9 Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	58

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Melittin'in yapısı	5
Şekil 2.2. Glial hücreler ve gliomalar	8
Şekil 3.1. MTT testi için 96 kuyucuklu plağa MEL'in farklı konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/ml}$) uygulama düzeni.....	17
Şekil 4.1. U118 hücre hatlarının ışık mikroskobunda görünümü (Handan Sevim, Kübra Nur Güven)	21
Şekil 4.2. 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Melittin'e maruz bırakılan U118 hücre hattının 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüleri (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)	22
Şekil 4.3. 1 $\mu\text{g/ml}$ Melittin'e maruz bırakılan U118 hücre hattının 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)	23
Şekil 4.4. 3 $\mu\text{g/ml}$ Melittin'e maruz bırakılan U118 hücre hattının 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüleri (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)	24
Şekil 4.5. 5 $\mu\text{g/ml}$ Melittin'e maruz bırakılan U118 hücre hattının 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüleri (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)	25
Şekil 4.6. 10 $\mu\text{g/ml}$ Melittin'e maruz bırakılan U118 hücre hattının 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüleri (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)	26
Şekil 4.7. MTT ile sitotoksitite testine ait U118 hücre hattının absorbans grafiği	28
Şekil 4.8. MTT ile sitotoksitite testine ait U118 hücre hattının canlılık oranları	29
Şekil 4.9. U118 hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyondaki dozların 1, 3, 24, 48 ve 72 saat sonrası absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	30
Şekil 4.10. Standard olarak hazırlanmış proteinlerin Bradford yöntemiyle ölçümlerinden elde edilen referans grafiği y: absorbans, x: konsantrasyon	33
Şekil 4.11. ECL solüsyonu ile muamele edilerek görüntüsü elde edilen TGF- β protein görüntüsü	34
Şekil 4.12. TGF- β proteininin farklı doz ve zamandaki kat artışları grafiği	35

Şekil 4.13. TGF- β proteininin U118 kontrol hücresinin ve uygulanan 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyondaki Melittin dozunun 3 saatlik (a), 24 saatlik (b), 48 saatlik (c) uygulama box-plot grafiği	36
Şekil 4.14. ECL solüsyonu ile muamele edilerek görüntüsü elde edilen ADAMTS-5 protein görüntüsü	37
Şekil 4.15. ADAMTS-5 proteininin farklı doz ve zamandaki kat artışları grafiği	38
Şekil 4.16. ADAMTS-5 proteininin U118 kontrol hücresinin ve uygulanan 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyondaki Melittin dozunun 3 saatlik (a), 24 saatlik (b), 48 saatlik (c) uygulama box-plot grafiği	40
Şekil 4.17. MMP-9 proteininin farklı doz ve zamandaki kat artışları grafiği	41
Şekil 4.18. MMP-9 proteininin farklı doz ve zamandaki kat artışları grafiği	42
Şekil 4.19. MMP-9 proteininin U118 kontrol hücresinin ve uygulanan 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyondaki Melittin dozunun 3 saatlik (a), 24 saatlik (b), 48 saatlik (c) uygulama box-plot grafiği	43

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. WHO tarafından oluşturulmuş IDH-wildtip ve IDH-mutant glioblastoma karakterizasyon tablosu	10
Çizelge 4.1. Melittin'in U118 hücre hattına farklı konsantrasyon ve farklı zamanlarda verildikten sonra 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbands değerleri	27
Çizelge 4.2. U118 hücre hattının farklı konsantrasyonda uygulanan MEL dozlarının IC50 değerleri.....	31
Çizelge 4.3. U118 hücre hattında Melittin' in kontrol grubunun farklı konsantrasyonlarda değerlendirilmesi (Bonferroni, $p < 0,05$).....	31
Çizelge 4.4. U118 hücrelerinin protein konsantrasyon değerleri	32

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar

ADAMT-5	A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 5 (=Trombospondin Tip 1 5 Motifli Disintegrin Ve Metalloproteinaz)
Ap-1	Aktivatör Protein-1
ATRX	Alpha-Thalassemia X-Linked (=X-Bağımlı Alfa Talasemi)
DMSO	Dimetilsülfoksit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ECL	Enhanced Chemiluminescence (=Geliştirilmiş Kemilüminesans)
ECM	Hücre Dışı Matris
FBS	Fötal Sığır Serumumu
FGFR2	Fibroblast Growth Factor Receptor 2(=Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü 2)
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GBM	Glioblastoma Multiforme
IC ₅₀	Inhibitör Konsantrasyonu
IDH	Izositrat Dehidrojenaz
IGF2	Insulin-Like Growth Factor 2(=İnsülin-Benzeri Büyüme Faktör 2)

kDa	Kilo Dalton
MEL	Arı Zehirinden Saflaştırılmış Melittin
μg	Mikrogram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MMP	Metalloproteinaz
MMP-9	Matrix Metalloproteinaz-9
MTT	[3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromür]
NF-KB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells (=Aktive Edilmiş B Hücrelerinin Kappa-Hafif Zincir-Arttırıcı Nükleer Faktörü)
NP-40	Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol 40
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PI	Proteaz İnhibitör Kokteyli
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Kinaz
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
TGF- β	Transforme Edici (Dönüştürücü) Büyüme Faktörü Beta
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TNF α	Tumor Necrosis Factor Alpha (=Tümör Nekrozu Faktör A)
TP53	Tümör Protein 53
TBS-T	Tris Buffered Saline-Tween 20
WHO	World Health Organisation

1.GİRİŞ

Kanser çağımızın en önemli ölümcül hastalıklarından bir tanesidir. Her geçen gün kansere yakalanma oranı ve çoğu vakanın ölümlü sonuçlanması kanserin araştırılmasını ilgi çekici hale getirir. Ancak uygulanan geleneksel kemoterapi yöntemlerinin yeterli gelmediği düşünüldüğü için uygulanan tedavilere yardımcı yeni ajanlar ve tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır [1].

Kanserin doğal yollarla tedavi edilmesine karşı artan bir ilgi vardır. Doğal ürünlerle tedavide özellikle biyotoksinlerin potansiyel terapötik değeri oldukça dikkat çekmektedir. En popüler biyotoksin, arı zehrinin ana bileşenlerinden biri olan Melittin' dir (MEL) [2].

MEL, plazma zarına karşı iyi tanımlanmış etkisi sayesinde her zaman antimikrobiyal bir peptid olarak kullanılmıştır. MEL, tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin zarlarını parçalayan seçici olmayan bir sitolitik peptittir. Bu nedenle, damar içine enjekte edildiğinde, ciddi toksisite reaksiyonlarını tetikler; bu durumda hemoliz meydana gelir. Bu spesifik olmayan hücresel litik aktivite, normal hücrelerden farklı olarak büyük bir zorluk oluştursa da, MEL zar potansiyeli daha büyük olduğu için tümör hücre membranlarında daha fazla hasara neden olmaktadır [3].

MEL; normal ve kanserli hücreler arasında DNA hasarına bağlı apoptozu farklılaştırmadan başlatmak ve hızla bölünen hücreleri hedef alan geleneksel kemoterapötik maddelerden farklı olan belirli bir hücresel bileşen yerine hücre zarlarının genel yapısını hedeflemektedir. Buna ek olarak, endositoz yoluyla sitoplazmaya girmekte ve çeşitli hücre içi hedefleri etkilemektedir [4]. Öte yandan, MEL'in kemoterapötik ilaçla kombinasyonu ile tedavide sinerjik etki gösterdiği görülmüştür. Böylece, MEL' in farklı kanser türlerini tedavide çekici bir kanser kemoterapötik ajan olarak rol oynadığı düşünülmüştür

Glioblastoma multiforme (GBM) ; en ölümcül beyin tümörlerinden bir tanesidir. Tedavi uygulanmasına karşın hastalığa yakalanan kişilerin çok kısa sürede ölmesi GBM hücre mekanizmasının araştırılmasını ve GBM hücrelerinin infiltre olarak büyümesini inhibe edecek yeni ajan arayışına sebep vermiştir. Uygulanan cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi tedavilerine rağmen hastanın yaşama süresi en fazla 50 haftadır [5].

GBM; nekrozu ve mikrovasküler çoğalmayı ifade etmesiyle düşük dereceli gliomalardan ayrılır ve hızlı infiltrasyon yolu ile invazyon yaparak tümör hücrelerine bariyer olan hücre dışı matrix (ECM) üzerindeki proteinlere bağlanır. GBM; ECM'den salgılanan bazı molekülleri regüle ederek çevredeki stromal hücreleri etkiler ve GBM hücreleri ECM'i geçmek için bazı proteazlar ile ECM'yi parçalarlar [6]. Bu durum GBM hücrelerinin invazyonuna olanak tanır. Bunun sonucunda hücre dışı matriksi sindiren proteazların ekspresyonları artar [7]. Proteolitik enzim olan MMP'ler ve ADAMTS'ler invazyonda önemli bir role sahip oldukları için; bu proteazların inhibe edilmesi önem kazanmıştır [8].

Farklı in vitro ve in vivo çalışmalar; MEL' in proliferasyon, apoptoz, metastaz, anjiyogenez ve hücre döngüsü gibi kanserli hücrelerin hücresel işlevleri üzerinde çoklu etkileri olduğunu göstermiştir. Ayrıca farklı kanser hücre tiplerine bağlı olarak bu süreçleri düzenlemek için çeşitli sinyal yolları, genler ve moleküller etkinleştirilmiş veya modüle edilmiştir [9].

Yapılan çalışmaların ışığında GBM' nin invazyonunu kolaylaştırmada salınan proteazların inhibasyonu önem arz etmektedir. Anti-tümör etkiye sahip ve kanser hücrelerinde invazyonu engellemesiyle MEL'in proteazları inhibe edebileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Arı Zehri Ve Kanser

Kanser; dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Son yıllarda kanser hastalığı ve bu hastalığa yakalananların ölüm sayısı önemli ölçüde artmıştır. Araştırmalara göre küresel demografik özellikler baz alındığında, 2025 yılına kadar kansere yakalanan insan sayısının yılda 20 milyondan fazla olacağı öngörülmektedir [1]. Yapılan başka bir çalışmada 2012 yılında 14,1 milyon yeni kanser vakası olduğu ve 8.2 milyon kanserli hastanın öldüğü saptanmıştır [10].

Çok sayıda kanser vakasının ölümle sonuçlanması, bu konudaki çalışmaları arttırmış ve yapılan çalışmalar ışığında tedavi yöntemlerinde ilerleme sağlanmıştır. Uzun zamandır kemoterapi ve radyasyon gibi klasik tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat bu tedaviler; kanser hücrelerinin direnci, sistemik uygulamada kullanılan ilaçların neden olduğu yan etkiler ve toksisite gibi nedenlerle sınırlı etkinlik göstermektedir [11]. Bu yüzden kansere karşı etkinliği kabul edilen kemoterapik ilaçların etkinliğini artırabilecek yeni ajanlar ve tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır [12].

Günümüzde kanserin doğal ürünlerle tedavisine olan ilgi giderek artmaktadır. Doğal ürünlerle tedavide özellikle biyotoksinlerin potansiyel terapötik değeri oldukça dikkat çekmektedir. Biyotoksinler; farmakolojik açıdan aktif birkaç bileşen içeren, organizmaların zehir bezinde sentezlenen ve salınan faydalı biyolojik kaynaklardır. Biyotoksinlerin içerikleri yeni bileşiklerin çeşitli doğal kaynakları olarak kullanılmakta, özellikle de kanser gelişimini ve ilerlemesini etkileyen çoklu yollarda ve de içerdikleri birçok faktör aracılığıyla anti kanser tedavisinde kullanılması düşünülmektedir [13].

Son on yılda yapılan araştırmalara göre; kötü huylu tümörlere (malignancy) karşı yılan zehiri, arı zehiri (BV), akrep zehiri, deniz anemon toksini ve diğer hayvan zehirleri gibi birçok hayvan zehiri ve toksininin mükemmel antitümör aktivite sergilediği gösterilmiştir. Bu nedenle zehirlerin ve toksinlerin biyoçeşitliliğinden yararlanılarak, yeni antikanser ajanları olarak geliştirilebilecekleri öngörülmektedir [12].

Biyotoksinler arasında en yaygın olarak incelenen arı zehiri ve ana bileşeni olan Melittin (MEL); kanser hücresi büyümesini ve çoğalmasını inhibe etmek, apoptozu indüklemek veya

tümör metastazını baskılamak da dahil olmak üzere tümörün birden fazla yönünü etkiler. Bu yüzden kanser tedavisinde alternatif olabileceği düşünülmektedir [14].

2.1.1. Arı Zehrinin Anti-Kanser Etkisi

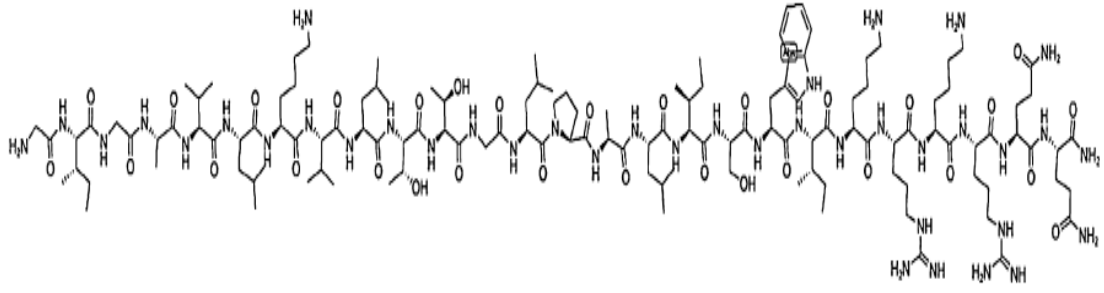
Arı zehiri; bal arısı (*Apis mellifera*) tarafından üretilen doğal bir toksindir. Arı zehiri; peptidler (melittin, apamin, adolapin ve mast hücre-degranüle peptit), enzimler (fosfolipaz A2, hiyalüronidaz), diğer aminler ve peptid olmayan bileşenler de dahil olmak üzere en az 18 biyolojik aktivite bileşeni içeren maddelerden oluşan bir karışımdır [15,16].

Arı zehri; artritik hastalıklarda, romatizmada ve kronik ağrılı hastalıklarda geleneksel bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Arı zehrinin geniş biyolojik ve farmakolojik faaliyetleri nedeniyle cilt hastalıkları, inflamatuvar hastalıklar da dahil olmak üzere bir çok ülkede çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir [17,18,19]. Ayrıca arı zehiri ile yapılan çalışmalarda; arı zehrinin hepatoselüler karsinom, prostat kanseri, melanoma, akciğer kanseri meme kanseri, yumurtalık kanseri, mesane kanseri ve lösemi dahil olmak üzere çeşitli kanser hücreleri üzerinde cazip anti-kanser etkileri olduğu belirlenmiştir [12].

2.1.2. Melittin'in Anti-Kanser Etkisi

Farklı hastalıkların tedavisinde doğal ürünlerin ve bunların aktif bileşenlerinin kullanımı temel olarak geleneksel tıbbı dayanmaktadır. Doğal ürünlerle tedavide özellikle dikkat çeken arı venomu (BV) ve onun temel bileşeni olan Melittin'in (MEL) anti kanser etkilerinden dolayı ilaç olabilme potansiyeli arı venomuna ve Melittin'e olan ilgiyi arttırmıştır [20].

MEL arı zehrinin esas aktif bileşenidir. Zehirin kuru ağırlığının %40– 60'ını oluşturur. MEL, kuvvetli bir hemolitik aktiviteye sahip olan 2847,5 Da ağırlığındaki bilinen 26 aminoasit diziliminden oluşan, kimyasal formülü $C_{131}H_{228}N_{38}O_{32}$ olan küçük bir doğrusal bazik peptiddir. MEL' in amino asit sekansı, Gly- Ile- Gly- Ala- Val- Leu- Lys- Val- Leu- Thr- Thr- Gly- Leu- Pro- Ala- Leu- Ile- Ser- Trp- Ile- Lys- Arg- Lys- Arg- Gln- Gln' dır [21].



Şekil 2.1. Melittin'in yapısı [21]

Melittin'nin anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral ve anti-parazitik gibi birçok biyolojik etkisi vardır[22,23,24,25]. Bunların dışında, MEL'in antitümör etkisi ve kanser tedavisi için terapötik potansiyeli vardır [4]. MEL'in hücre çoğalması ve klonojenitenin güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir. MEL'in bu antitümör etkisi ilk olarak Hait ve ark. tarafından bildirilmiştir. MEL'in kalmodulin inhibitörü olarak insan lösemi hücrelerinin büyümesini inhibe edebildiğini tespit etmişler [26]. Ayrıca, MEL'in biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri de vardır. MEL'in güçlü bir membran-bozulma aktivitesine sahip olmasından dolayı biyolojik etkileri olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu özelliği negatif yüklü membran yüzeylerine kolayca bağlanmasını sağlar ve fosfolipid çift tabakalarının bütünlüğünü bozar. Membran yüzeyine bağlandıktan sonra iyon kanalı oluşturarak atomik iyonların ve moleküllerin sızıntısının ve geçirgenliğinin arttırılmasıyla bir yüzey aktif madde (sümfaktant) gibi etki göstererek membran bütünlüğünü bozar. Lipid membranların kompozisyonları (elektrik yükü veya paketleme yoğunluğu) Melittin hareketinin modunu etkileyebilir. MEL, plazma zarına karşı iyi tanımlanmış etkisi sayesinde her zaman anti-mikrobiyal peptid olarak kullanılmıştır. MEL, tüm prokaryotik ve ökaryotik hücre zarlarını parçalayan seçici olmayan bir sitolitik peptittir. Damar içine enjekte edildiğinde ciddi toksisite reaksiyonlarını tetikler ve hemolize neden olur. Bu spesifik olmayan hücresel litik aktivite, normal hücrelerden farklı olarak büyük bir zorluk oluştursa da, MEL zar potansiyeli daha büyük olduğu için tümör hücre membranlarında daha fazla hasara neden olmaktadır [27,28,29].

Kanserli hücrelerin kazanılmış kemoresistans direnç geliştirme olasılığı düşüktür; belirli bir hücresel bileşen yerine hücre zarlarının genel yapısını hedeflerler. MEL'in kemoterapötik ilaçla birlikte tedavide sinerjik etki gösterdiği görülmüştür. MEL endositoz yoluyla sitoplazmaya girmekte ve çeşitli hücre içi hedefleri etkilemektedir. Böylece, MEL farklı

kanser türlerini tedavi etmek için çekici bir kanser kemoterapötik ajan olarak rol oynadığını düşündürmektedir [4].

2.1.3. Melittin'in Anti-Kanser Etki Mekanizmaları

Kanser gelişimini ve ilerlemesini etkileyen birçok faktörün belirlenmesi, MEL'in anti-tümör etkisinden dolayı kanser tedavisinde kullanım alanını artırmıştır. Farklı in vitro ve in vivo çalışmalar MEL'in; proliferasyon, apoptoz, metastaz, anjiyogenez ve hücre döngüsü gibi kanserli hücrelerin hücresel işlevleri üzerinde çoklu etkisi olduğunu göstermiştir. Farklı kanser hücre tiplerine bağlı olarak bu süreçleri düzenlemek için çeşitli sinyal yolları, genler ve moleküller etkinleştirilmiş veya modüle edilmiştir [4].

MEL'in antitümör etkilerinin altında yatan hücresel mekanizmaların incelendiği çok sayıda çalışmada, MEL'in bazı kanser hücrelerinde ölüm mekanizması yoluyla anti-kanser etkisini gösterdiğini ve arzu edilen bir terapötik peptid olarak yararlı olabileceği belirlenmiştir [4].

2.1.3.1. Tümör metastazının ve invazyonunun inhibisyonu

Tümör metastazı, kanser hücrelerinin konak dokularından diğer dokulara transferiyle gerçekleşen bir süreçtir. Kanser hastalarındaki hayatta kalma oranının azalmasının başlıca nedenleri arasında, kanser rezeksiyonundan sonra metastazı ve hastalığın nüksetmesinin engellenememesi yer almaktadır [30].

Kanser metastazı ve invazyonunun; adezyon molekülleri, hücre dışı matriks (ECM) degradasyon enzimleri ve anjiyogenez faktörleri de dahil olmak üzere çoklu moleküllerin katılımını içeren karmaşık süreçler olduğu gösterilmiştir. MEL'in bunları ve diğer matriks bileşenlerini yeniden yapılandırılmasıyla tümör hücresi progresyonunu baskıladığı düşünülmektedir. Yapılan ek araştırmalarda, MEL'in antitümör etkisinin tümör metastazı ve invazyonunun bastırılmasıyla yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir[31].

2.1.3.2. Anjiyogenez

Anjiyogenez; genellikle embriyonik gelişme, yara iyileşmesi veya tümör büyümesi ve metastaz gibi bazı fizyolojik ve patolojik koşullar altında oluşan yeni kan damarlarının oluşumudur. Kanserlerde ana işlevi, agresif malignitelerin büyümesi ve yaygınlaştırılması için gerekli tümör hücrelerine besin maddeleri ve oksijen sağlamaktır. Anjiyogenezin tıkanması bu beslemeyi keser buda etkili bir anti-tümör hedef olarak kabul edilir [32] .

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ; endotel hücrelerinin proliferasyon, göç ve tüp oluşumunu düzenleyen anjiyojenez sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Kanserli vakalarda, VEGF genellikle up regüle edilir. Bulguların giderek artması, MEL'in tümörlerdeki VEGF ekspresyonunu inhibe ederek potansiyel bir anti-anjiogenik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [32].

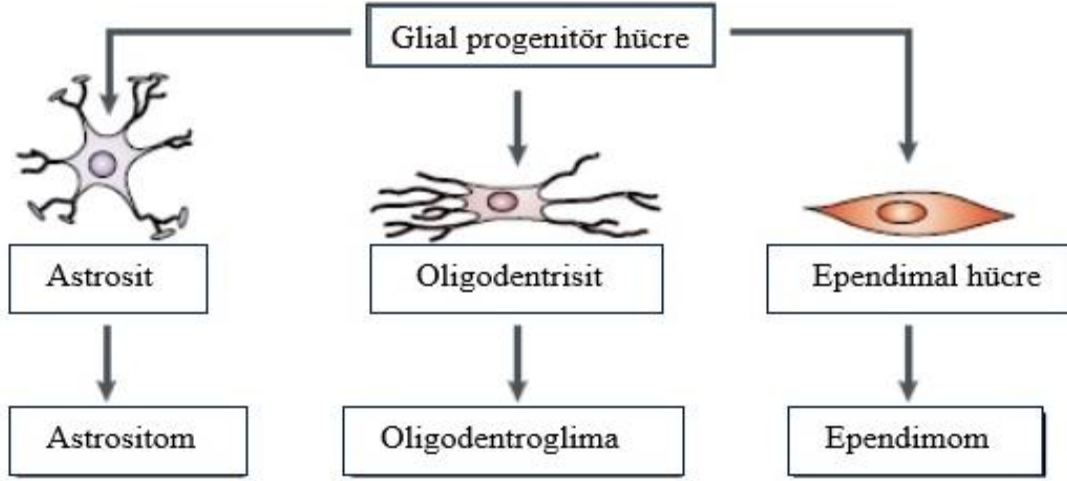
2.2. Merkezi Sinir Sistemi Ve Gliomalar

Malign gliomalar en yaygın beyin kanseri tipidir ve merkezi sinir sistemi içindeki glial hücrelerden ortaya çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından grade III ve grade IV olarak tanımlanan histopatolojik kriterlere göre sınıflandırılan gliomalar aynı zamanda Glioblastoma multiforme (GBM) olarak da adlandırılır [33].

Merkezi sinir sisteminin malign tümörlerinin (CNS tümörleri) invazyonu kötü bir prognoza sebep olduğundan klinik önem taşımaktadır. Hastaya Glioblastoma tanısı konduğunda, ortalama hayatta kalma süresi tedavisi olmayan tanılar için 17 hafta, cerrahi ve radyasyon müdahalesi ile 30 hafta arasında değişmektedir. Birçok yan etkisi olmasına rağmen kemoterapi ile ortalama hayatta kalma süresi 50 haftaya kadar yükselmektedir [5].

Geleneksel tedavi yöntemlerinin, glioma hücrelerinin radyasyon direnci ve gliomaların tipik olarak diffüzyon ve infiltratif büyüme şekline dolaylı olarak tümör rezeksiyonunun yapılamaması nedeniyle birincil MSS neoplazmanın iyileşmesinde etkisiz olduğu gösterilmiştir [34].

Glioma, glial hücre orijinli primer MSS tümörlerini kapsar. Glial hücreler arasında ependimal hücreler, oligodendrositler ve astrositler bulunur. Bu hücreler glial orijinli ve mikroglialın aynı soyundan gelmektedir. Mikroglia, retikuloendotelial sistemin bir bileşeni olarak düşünülür. Bu hücreler dolaşımdaki monositler olarak işlev görürler ve hücre parazitlerini temizlemek için beyin parankimine girerler [35].



Şekil 2.2. Glial hücreler ve gliomalar [35]

Glial hücreler, hepsi glioma olarak sınıflandırılan farklı tümör türlerine yol açan çeşitli hücre tiplerini içerir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2016 yılında yayımlanmış olduğu bildiriye, merkezi sinir sistemi tümörleri son yıllarda yapılan çalışmaların ve gelişen teknolojinin ışığında tekrar sınıflandırılmıştır. Bu sınıflardan bazıları; yayılcı astrositik ve oligodendroglial tümörler, ependimal tümörler, embriyonal tümörler, menenjiomalar, mezenkimal tümörler vb. gösterilebilir (Şekil 2.2.). Sınıflandırma yapılırken öncelikle histolojiye dikkat edilmiştir. Astrositoma, oligoastrositoma, oligodendroglioma ve glioblastoma olmak üzere dört farklı histoloji kategorisi bulunmaktadır. Bu kategoriler, IDH (izositrat dehidrogenaz) mutasyonuna sahip olan ve olmayan tümörler olarak ikiye ayrılmaktadır. Astrositoma, oligoastrositoma ve oligodendroglioma yapısına sahip ve IDH mutasyonu bulunduran tümörler ve ATRX ve/veya TP53 mutasyonlarına sahip olan ve 1p/19q ko-delesyonuna sahip olan tümörler olmak üzere ikiye ayrılırlar [33].

2.2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM)

GBM primer astrositik beyin tümörleri arasında görülme sıklığı 100 000 kişiden 320 sinin hastalığa yakalanmasıyla en malign beyin tümörüdür. Glioblastoma (GBM) karmaşık bir biyolojiye sahip tümör türü olup yıllar süren araştırmalara rağmen halen tam olarak çözülememiştir [36].

Tedaviye cevap veren hastalar nöroşirurji, radyasyon terapisi ve kemoterapiyi DNA metilasyon ajanı temozolomid ile birleştiren bir tedavi yöntemiyle tedavi edilebilmektedir

[37]. Ancak, yoğun tedaviye rağmen, hastalığın çok ileri boyutunda yaşama süresi 7-8 ay, orta derece boyutta yaşama süresi 14-16 aydır. Hastaların %9,8'i 5 yıllık genel yaşama süresi ile kötü bir prognoza sahiptir [38,39].

Glioma tanısı tarihsel olarak histopatolojik incelemeye dayanmaktadır. Son gelişmeler moleküler alt tipten önemini belirtmiştir. Bu nedenle, GBM; IDH (izositrat dehidrogenaz) mutasyonuna sahip olan ve olmayan tümörler olarak ikiye ayrılmış. WHO' da IV grade iki kategoride GBM hücrelerini sınıflandırır. Birincisi klinik olarak tanımlanmış birincil veya de novo glioblastomayla en sık eşleşen vakaların %90'da ve 55 yaş üzerindeki hastalarda baskın olan IDH-wild tipi; ikincisi primer düşük dereceli difuz glioma öyküsü olan, vakaların %10'unda ve daha genç yaştaki hastalarda ortaya çıkan bu sekonder tümörlerde görülen IDH mutantıdır [33].

GBM oluşumuna G1/S kontrol noktasında meydana gelen deregülasyonlar, kromozom 10q'da meydana gelen kayıplar, EGFR, FGFR2, IRS2 ve AKT3 gibi genlerin amplifikasyonu ve PI3K, PTEN, TP16, TP53, PARK2, PTPRD ve NF1 genlerinde meydana gelen mutasyonlar başlıca sebeplerdir [40]. WHO tarafından oluşturulmuş IDH-wildtype and IDH-mutant glioblastoma karakterizasyon tablosu Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. WHO tarafından oluşturulmuş IDH-wildtip ve IDH-mutant glioblastoma karakterizasyon tablosu [33]

	IDH-Wildtip Glioblastoma	IDH-mutanttip Glioblastoma	Referanslar
Sinonim	Primer glioblastoma, IDH-wild tip	Sekonder glioblastoma, IDH-mutant tip	{1830}
Öncü Lezyon	Teşhis edilemeyen; Gelişen de novo	Difüz astrocytoma, Anaplastik astrocytoma	{1827}
Glioblastoma Proposiyonu	%90	%10	{1797}
Teşhisin ortalama yaşı	62 yıl	44 yıl	{214, 1078, 1797, 2103}
Erkek ve Kadın oranı	1:42:1	1:05:1	{214, 1417, 1797}
Klinik Öykü Uzunluğu	4 ay	15 ay	{1797}
Kurtulma Ortalaması	Sürecinin		
Cerrahi+Radyoterapi	9.9 ay	24 ay	{1797}
Cerrahi+radyoterapi +kemoterapi	15 ay	31 ay	{2810}
Lokasyon	Supratentorial	Genellikle frontal	{1417}
Nekroz	Geniş	Sınırlı	{1417}
TERT promotor mutasyonu	%72	%26	{1801, 1830}
TP53 mutasyonu	%27	%81	{1797}
ATRX mutasyonu	İstisna	%71	{1519}
EGFR amplifikasyonu	%35	İstisna	{1797}
PTEN mutasyonu	%24	İstisna	{1797}

Genetik modifikasyonların dışında infiltratif büyüme şekli olan GBM'in tamamen yok olmasını engelleyen bir özelliği de cerrahi rezeksiyonu komplikasyona uğratmasıdır. Bu özellik tümörün tekrar büyümesine ve hayatta kalan tümör hücrelerinin rezeksiyon alanına yakın bir yere invazyonuna neden olmasını sağlamaktadır [41].

İnvaziv hücrelere uyarlanmış tedaviyi optimize etmek ilk bakışta oldukça kolaydır. Daha yakından incelendiğinde, hücre göç sürecinin karmaşıklığı daha belirgin hale gelir ve tümör hücrelerinin farklı göç modları, yani kolektif, mezenkimal ve ameboid arasında geçiş yapma ve kullanma becerisine sahip olması, tedavinin gelişimini karmaşık hale getirir [42].

İntegrinlerin yanı sıra, proteazların glioblastoma hücreleri tarafından çevreleyen beyin mikro çevre içine salınması, sağlıklı beyin alanlarının infiltrasyonunu kolaylaştırır ve böylece hastalığın ilerlemesini artırır. GBM tümörlerinin infiltrasyonunu sınırlamak için integrinleri ve proteazları terapötik olarak hedeflenmesi ve proteinlerin inhibitörlerini cazip hale getirmiştir [43].

Bir diğer önemli nokta, hücre hareketliliğini ve ayrıca tedavi direnciyle bağlantılı seçkin hücre işlevlerini yöneten hücre dışı matriks (ECM) etkileşimidir. Yapılan çalışmalarla glioblastoma hücre invazyonu, proliferasyon ve tedavi direncinin, ECM ile bir integrine dayalı etkileşime ve sonuç olarak hücreler arası sinyal transdüksiyon yollarının modülasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir [43,44].

2.2.2. ECM'nin GBM İnvazyonuna Etkisi

ECM; büyüme faktörleri ve matriks proteinlerinin rezervuar olarak işlev görmesinde yapısal destek sağlamak için ve GBM invazyonunu sağlanması için önem arz etmektedir [45,46]. Beyindeki nöronlar, glia ve kan damarları gibi önemli hücresel bileşenler beyin hacminin %15-20'sine tekabül eden ECM iskelesi ile tutulur [47]. Sağlıklı bir beynin ECM'si geniş boşluk doldurucu protein içermeyen glikosaminoglikan, hiyalüronik asit (HA) ve ayrıca hücre dışı alanı düzenlemek için etkileşen proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşur [48]. Miyelinli aksonlar boyunca hareket eder ve GBM vasküler bazal membran boyunca sağlıklı beyin bölgelerine ve kollajen, fibronektin, lamininler ve vitronektin gibi lifli proteinlerin eksprese edildiği glia sınırlayıcı eksternal bölgede yayılır [48,49]. Bu ECM bileşenleri; tedavi direnci ve invazyonun hızlandırıcıları olarak görev yapabilecekleri GBM tümörleri boyunca saptanmıştır [50].

2.2.3. ECM degradesyonu ve Proteazlar

Matriks proteinlerinin mikro çevre içine salınımının yanı sıra, GBM hücreleri, ECM'i yeniden şekillendirme ve infiltrasyon için ECM-degradesyon enzimlerini eksprese eder ve

enzimler salınır. Bu proteazların fonksiyonu spesifik inhibitörler tarafından kontrol edilir ve ekspresyon seviyelerindeki dengesizlik invazyonu kolaylaştırır [33].

Glioblastomda, ECM'nin çeşitli bileşenlerini parçalayarak agresif infiltrasyon ile bağlantılı olan üç proteaz vardır [33].

1. Serin proteaz grubu: Bunlar arasında ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) ve membrana bağlı reseptör (uPAR) oldukça dikkat çekmektedir. Plazminojen'i aktif plazmaya dönüştürerek uPA, fibronektin ve laminin gibi çeşitli ECM proteinlerinin bozunumunu indüklemekte olup glioblastoma hücrelerinin yapışkan ve invaziv özelliklerinin aktivasyonuna katkıda bulunurlar [50]. uPA veya reseptörünün hedeflenen inhibisyonu in vitro olarak tümör büyümesini ve glioblastoma hücre invazyonunu azaltır [51].

2. Sistein proteazı Katepsin B: Lamininlerin ve kollajenlerin parçalanmasıyla glioblastoma invazyonunu etkilemektedir [52]. Bu proteaz glioblastoma hücrelerinin artmış invazyonu ile ilişkilidir [53]. Hücre yüzeyinde artmış Katepsin B ekspresyonu ve enzim aktivitesi tümör derecesi ile korelasyon gösterir [54,55,56].Katepsin B ekspresyonunun downregülasyonu, GBM hücresinin invaziv ve tümörojenik potansiyelini bozar [57,58,59].

3. MMP endopeptidazları: Yapısına ve substrat özgüllüğüne göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilysinler ve membran tipi MMP'ye göre gruplandırılabilir [60]. Bunların hepsi, matriks proteinleri üzerindeki yıkım aktivitesinden önce enzimatik bölünme ile inaktif proenziminin aktivasyonunu gerektirir. Yapılan çalışmalarda birkaç MMP'nin, GBM tümörlerinde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir ve glioblastoma hücrelerinin tipik invazyon yolu olan vasküler bazal membran doğrultusunda, jelatinaz MMP-2 ve MMP-9'un GBM hücre invazyonunun hızlandırıcısı olarak işlevini aydınlatmaya yönelik çalışmalar vardır [61].

Yapılan çalışmaların ışığında GBM'in invazyonunu kolaylaştırmada salınan proteazların inhibasyonu önem arz etmektedir. Anti-tümör etkiye sahip ve kanser hücrelerinde invazyonu engellemesiyle MEL'in proteazları inhibe edebileceği düşünülmüştür. Bu yüzden çalışmamızda MEL'in GBM ile ilişkili ECM proteazları olan Trombospondin Tip-1 5 Motifli Matriks Metalloproteinazı (ADAMTS 5), Matrix metalloproteinaz-9 (MMP-9) ile Transform edici büyüme faktör beta (TGF- β) sitokininin üzerindeki etkisine bakılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan GBM Hücre Hattı

Tez çalışması kapsamında glioblastoma hücre hattı olarak U118 seçilmiştir. Çalışmada kullanılan U118 hücre hattı Ankara Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ABD'dan temin edilmiştir. Sıvı azot tankında saklanan hücre hatları Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ABD'dan kuru buz içerisinde alınarak, Hacettepe Üniversitesi'ne getirildikten sonra kültür edilmiştir.

3.1.2. Hücre Kültürünün Pasajlanması ve Dondurulmasında Kullanılan Malzemeler

U118 hücre hattı için; L-glutaminli RPMI-1640, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 L-glutamin besiyeri hazırlanmıştır. RPMI -1640'lı besi yeri için (0.3 mg/L L-glutamin ve sodium bikarbonatlı) RPMI-1640 (Capricorn, RPMI-A), Fötal Dana Serum (FBS) (Capricorn, FBS-11A), Penisilin-Streptomisin (Capricorn, PS-B) kullanılmıştır. Tripsinizasyon işleminde (%0,25 Tripsin / %0,02 EDTA) Trypsin/EDTA (Biochrom, L2163) kullanılmıştır. Hücre dondurulurken Dimetilsulfoksit (DMSO) (Sigma, D2650) ve hücre yüzeyi yıkanırken (Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen) (pH: 7,4) Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (Sigma, 79382) kullanılmıştır. Hücre kültür işlemlerinde steril kabin olarak Biolab Faster B42004, %5 CO₂'li inkübatör olarak Hera Cell Heraeus, invert mikroskop olarak Olympus I x 70 kullanılmıştır.

3.1.3. [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromür] (MTT) Sitotoksite Testi

MTT solüsyonu için 5 mg MTT tozu (Sigma, M5655) 1 ml steril PBS'de çözülmüş ve filtre edilerek kullanılmıştır. MTT besiyeri karışımı için 96'lık plakta her bir kuyucuk için 1:10 MTT solüsyonu (5 mg/ml) kullanılmıştır.

3.1.4. Protein İzolasyonu ve Protein Tayini İçin Kullanılan Malzemeler

U118 hücrelerinden protein izolasyonu için 50 mM Tris base (pH:7.4), 150 mM NaCl, %1 NP-40, 1mM Pi (Roche, 04693159001) derişimlerde 1 l'lik lizis tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Protein tayini için protein standardı olarak ana stok olan Pierce bovine serum albumin (2 mg/ml) (Thermo, 23209) 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 mg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde seyreltilmiş

ve protein tayininde seyreltilen protein standartları kullanılmıştır. Protein tayininde Bradford reaktifi olarak Pierce™ coomassie plus (Thermo, 23200) kullanılmıştır.

3.1.5. Western Blotting İçin Kullanılan Malzemeler

Western blotting için 12 kuyucuklu hazır jel (Clear page, PK01012) kullanılmıştır. Protein büyüklüğünü (kDa) gösteren marker olarak 10-230 kDa aralıkta Prestained Protein Ladder (Thermo Protein PageRuler™, 26616) kullanılmıştır. Running tamponunun stok çözeltisi olarak 20 X SDS yürütme tamponu (Clear Page, FB50053) kullanılmış ve deneyde tanka eklenen 1 X yürütme tamponu için stok çözültiden 40 ml alınarak 800 ml'ye kadar distile su eklenerek tampon çözelti hazırlanmıştır. Western blotting'de transfer işlemi yapılmadan önce taze Towbin transfer tampon çözeltisi hazırlanmıştır. 4 membran için 5.4 g Tris ve 1.14 g Glisin tartılarak üzerine 75 ml Methanol ve 300 ml'ye kadar distile su ile tamamlanarak tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Yıkama işleminde stok çözelti olarak 10 X TBS tamponu (Biorad, 1706435) kullanılmış, deneyde yıkama işlemi yapılırken 1 X TBS-T tamponu için stok çözültiden 100 ml alınarak 1 l'ye kadar distile su ve %0.05 Tween 20 eklenerek tampon çözelti hazırlanmıştır. Primer antikor olarak ADAMTS-5 (Abcam, ab39202), MMP-9 (Abcam, ab38898), TGF- β (Abcam, ab92486), GAPDH (Abcam, ab8245), sekonder antikor olarak anti rabbit (Cell Signaling, 7074) kullanılmıştır. ECL Solüsyonu olarak Pierce ECL Western blotting Substrate (Thermo, 32106), protein bantlarını görüntülemek için Odyssey FC Li-cor görüntüleme cihazı ve IS western blotting görüntüleme programı kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Hattının Kültürü

Tez çalışması kapsamında U118 hücre hattı Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ABD'dan kuru buz içerisinde alındıktan sonra Hacettepe Üniversitesi'ne getirilerek kültür edilmiştir. Bunun için cryo-tüpler içerisindeki hücreler 37 °C'de su banyosunda çözüldükten sonra hızlı bir şekilde 10 ml besiyerinin içine alınarak homojen bir şekilde çözülmüştür. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak DMSO'lu süpernatant ortamdaki uzaklaştırılmış ve pelet oluşturan hücreler 10 ml uygun besiyerinde çözülmüştür. Hücreler ilk pasajında 25 cm²'lik, sonraki pasajlarda ise 75 cm²'lik kültür kabına ekilmiş ve daha sonra %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de büyümeye bırakılmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Beslenmesi

İnkübatörden alınan flasklardaki eskiyen besi yeri serolojik pipetlerle çekilmiştir. Yıkama işleminde 3 ml PBS kullanıldıktan sonra PBS serolojik pipet yardımı ile çekilmiştir. 25 cm²'lik flasklar için 6 ml, 75 cm²'lik kültür kabı için 12 ml taze besiyeri eklenerek hücreler tekrar inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Kültür yüzeyi %70 oranında hücre ile kaplandığında hücrelerin tripsinizasyon yöntemi ile pasajları yapılmıştır. Bunun için kültür kabındaki besi ortamı uzaklaştırılmış ve serumun tripsin üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırmak için kabın yüzeyi %0.25 Tripsin/%0.02 EDTA'lı tripsin çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra kültür kabının yüzeyini kapatacak miktarda tripsin, 25cm²'lik kültür kabı için 0,5 ml, 75 cm²'lik kültür kabı için 1 ml olacak şekilde kültür kabına eklenmiş ve kültür kapları 37 ° C'lik inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir. 5 dakika sonra kültür kabı yüzeyinden tamamen ayrılan hücrelere tripsin miktarının iki katı miktarda besi yeri eklenmiştir. Kültür kabındaki besiyeri falkon tüpe alındıktan sonra hücreler PBS ile 2 kere yıkanmıştır. Kültür kabındaki besi yeri de falkon tüpe alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Hücrelerin bir kısmı dondurulmak üzere ayrılmış ve kalan kısmı ise pasajı devam edilerek kültür kabına yeniden ekildikten sonra %5 CO₂'li inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Kültürü devam eden hücreler olası deney tekrarlama veya sonraki projelerde kullanılmak üzere her pasajda ticari Tripan mavisi ile sayılarak dondurulma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler ticari Tripan mavisi ile sayılmak için tripsinizasyon yöntemiyle kültür kabından ayrılan süspanse hale gelmiş hücre besiyerinden 900 µl alınmış ve üzerine 100 µl tripan mavisi eklendikten sonra Neubauer lamı ile hücreler sayılmıştır. Dondurma işlemi için tripsinizasyon yöntemi ile kültür kabından uzaklaştırılan hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra pelet haline getirilen hücrelerin üzerine %5 DMSO ve %95 besiyeri içeren dondurma solüsyonu eklenerek cryo tüplere alınmış ve -80 °C'ye kaldırılmıştır.

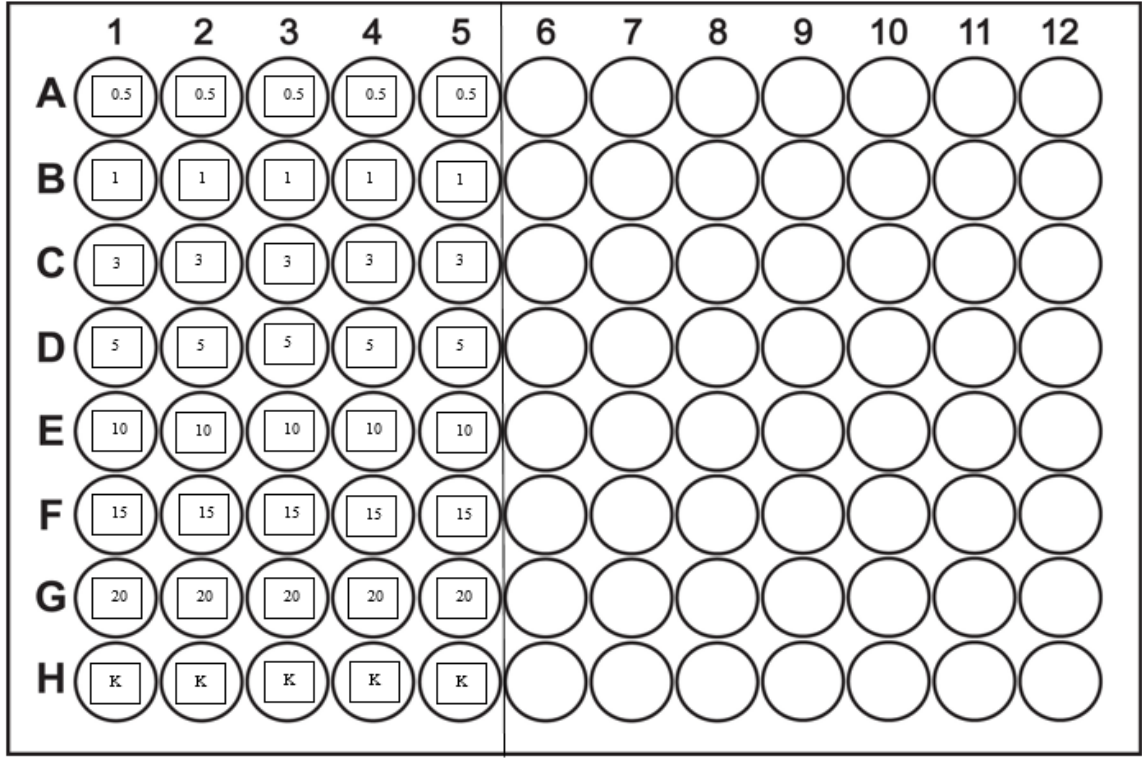
3.3. Melittin'in Hazırlanması

Liyofilize melittin (MEL) Sigma firmasından (M2272) temin edilmiştir. MEL için stok doz çözeltisi 5mg/ml oranında PBS ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

3.4. MTT İle Sitotoksosite Testi

Sitotoksosite çalışmaları, hücreler üzerindeki maddelerin toksik olma özelliğinin incelendiği çalışmalardır. Günümüzde maddelerin hücreler üzerindeki toksik etkisi MTT tayini ile yapılmaktadır. MTT testi, hücrelerin metabolik aktivitesini değerlendiren kolorimetrik bir yöntemdir. NAD(P)H-bağımlı hücre oksidoredüktaz enzimleri, belirli koşullar altında canlı hücre sayısını yansıtmaktadır. Bu enzimler, bir tetrazolyum boya olan MTT'yi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür] mor bir renge sahip olan çözünmeyen formazana indirgeme yeteneğine sahiptir. Hücreler, toksisitesi incelenecek maddelerle muamele edildikten sonra MTT tayini yapılarak değerlendirilir.

Tez çalışması kapsamında; MEL'in U118 hücreleri üzerindeki toksisitesi incelenmiş ve toksik dozlar belirlenmiştir. Çalışma öncesinde istenilen miktarda üretilen U118 hücreleri, kültür kaplarından tripsinizasyon yöntemiyle toplanıp santrifüj edilmiştir. Pelet kısım kullanılarak hücre süspansiyonu hazırlanmış ve süspansiyondaki hücre sayısını belirlemek için hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için; 900 µl hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne alınarak üzerine 100 µl ticari Tripkan mavisi (%0,5 w/v, Biochrom) eklenmiştir. Daha sonra Neubauer lamı kullanılarak canlı hücre sayımı yapılmıştır. Her bir kuyucuğunda 15×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa ekim yapılmıştır. Hücrelere uygulanacak farklı konsantrasyonlardaki MEL için 5 farklı 96 kuyucuklu plağa hücreler ekilerek 1, 3, 24, 48 ve 72 saat için inkübatöre kaldırılmıştır. Hazırlanan farklı MEL konsantrasyonlarının her biri için 5 kuyucuk kullanılmıştır.. Hazırlanan MEL konsantrasyonları 0,5, 1, 3, 5 , 10, 15 ,20 µg/ml'dir. Ayrıca kontrol amaçlı MEL uygulanmayan kuyucuklara besiyeri eklenmiştir (Şekil 2.1.).



Şekil 3.1. MTT testi için 96 kuyucuklu plağa MEL'in farklı konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/ml}$) uygulama düzeni

4 saat sonra kuyucuklardaki besiyerleri toplanarak üzerine her bir kuyucuk için hesaplanmış stok çözülden alınan farklı konsantrasyonlarda MEL'li ve MTT'li serumsuz besiyeri hücrelere eklenmiştir. MTT'li serumsuz besiyeri her bir kuyucuğa 1:10 oranında eklenmiş ve kuyucuk başına 200 μl serumsuz besiyeri ve 20 μl MTT çözeltisi (5mg/ml PBS) hazırlanarak içine belirlenen doz ve zamanda MEL hücrelere uygulanmıştır. Hücreler bu şekilde 37 °C'deki inkübatörde dört saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra, hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. Her bir göze 0.05 M HCl içeren 100 μl izopropil alkol eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen mor renkli çözelti 570 nm'de Elisa plaka okuyucu (Biotek, μQuant) ile spektrofotometrik olarak ölçüm ile optik yoğunluk belirlenmiştir. Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan IC_{50} ; inhibe edici özelliği olduğu bilinen maddenin tam inhibisyon sağlayacak değeri bulunmasında yardımcı olur. Bu yüzden MEL'in uygulanan farklı dozları IC_{50} 'ye göre belirlendikten sonra bu değerler Western Blotting deneyinde kullanılmıştır.

3.5. Western Blotting İçin U118 Hücrelerinin Eldesi

Western Blot için 6 kuyucuklu 10 plağın her bir kuyucuğuna 2×10^5 hücre içeren besiyeri ekilmiştir. Plaklardan bir tanesi kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Hücreler %80 doluluk oranına ulaştığı zaman kontrol grubu dışında kalan plaklardan her bir konsantrasyon için 3 plak ayrılarak kuyucuklarına 0,5, 1, 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda MEL eklenmiştir. Plaklar %5 CO_2 'li 37°C 'deki inkübatörde 3, 24 ve 48 saat aralıklarla inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonları tamamlanan MEL uygulanmış hücreler ve MEL uygulanmamış kontrol hücreleri tripsinizasyon yöntemi ile plak yüzeyinden kaldırılarak $1200\text{ g}'de$ 5 dakika santrifüj edilmiş ve pelet haline getirildikten sonra -80°C 'ye kaldırılmıştır.

3.6. Protein İzolasyonu

U118 hücrelerinden protein izolasyonu için tripsinize edilip 3 kere PBS ile yıkadıktan sonra pelet haline getirilen ve -80°C 'de saklanan hücreler; izolasyon yapılmak üzere -80°C 'den çıkarılarak hücre peletlerinin üzerine $100\ \mu\text{l}$ lizis tampon çözeltisi eklenmiştir. Her örnek 20-30 kez mikropipet ile nazikçe çekilip bırakılarak vortexle karıştırılmıştır. Sonikasyon cihazında hücreler buz üzerinde 30 amptitude'da 30 saniye sonike edilmiştir. Daha sonra buzda 30 saniye bekletildikten sonra arka arkaya aynı işlem 2 tekrar yapılarak hücreler parçalanmıştır. Örnekler $+4^\circ\text{C}$ 'de $20000\text{ g}'de$ 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden alınan örneklerin protein içeren süpernatantları yeni tüplere alınmıştır.

3.7. Protein Miktar Tayini

U118 hücresinden elde edilen proteinlerin konsantrasyonları ölçülerek protein miktarı standard eğri kullanılarak tayin edilmiştir. Protein standardı olarak Pierce sığır serum albumini (2 mg/ml) kullanılmış ve 2mg/ml 'lik ana stoktan seyreltilerek 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 mg/ml konsantrasyonlarda protein standardı tayinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bradford yöntemi kullanılarak 1:49 oranında Bradford reaktifi örnekle karıştırılarak spektrofotometre cihazında 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.[62].

3.8. Western Blotting

Elde edilen süpernatantlar, protein miktar tayininde elde edilen protein konsantrasyonlarına göre 1:4 oranında Laemmli yükleme tamponu süpernatantlara eklenerek 95°C 'de 7 dakika kaynatıldı.

3.8.1. Yürütme

Tank üzerinde gösterilen seviyeye kadar SDS'li jel için uygun yürütme tamponu eklemiş ve Clear Page marka hazır jeller yürütme kasetlerine yerleştirilmiştir. Jeller arasına yeni yürütme tamponu döküldükten kuyucuklara 25 µg/ml protein konsantrasyonunda 25 µl protein örneği jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Son olarak en baştaki kuyucuğa 5ul marker eklenmiştir. Tank güç kaynağına (Biorad, Power Pack™ Basic) bağlanmış ve proteinler 120 V'da yürütülmüştür.

3.8.2. Transfer

Transfer için belirli boyutlarda kesilmiş olan membran 30sn methanol, 1-2 dk dH₂O ve 15dk transfer buffer içerisinde çalkalanarak aktifleştirilmiştir. Transfer cihazında en alta transfer kağıtları önce Towbin transfer tamponunda ıslatılıp arada hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Transfer kağıdı üzerine aktifleştirilmiş membran yerleştirilmiştir. Yürüme bittikten sonra kasetten çıkarılan jeller gerekli boyutlarda kesilerek membran üzerine yerleştirilmiştir. En üste tekrar transfer kağıdı konulmuş ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Cihazın kapağı kapatılmış ve yuvasına yerleştirilmiştir. Transfer 30 dakika, 25 V ve 2.5 A'de transfer cihazında (Biorad, Trans-Blot Turbo) gerçekleştirilmiştir.

3.8.3. Bloklama

Transfer cihazından çıkarılan membranlar %5'lik (2,5 gr BSA + 50 ml TBS-T) içerisinde 1 saat oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir.

3.8.4. Primer Antikor (1. Ab)

MMP-9, TGF-β, ADAMTS-5 primer antikorlarımızı oluşturmaktadır. Çalışılan bu membranların internal kontrol çalışması GAPDH ile yapılmıştır. Her Ab için; 10 ml % 5'lik BSA'nın içine 1/1000 oranında 1. Ab ilave edilmiştir. Membran bir kaba konulup, 10 ml'lik Ab solüsyonu membranın üzerine dökülmüştür. Membranın yüzü 1. Ab ile temas edecek şekilde +4°C'de soğuk odada bir gece karıştırıcı üzerinde beklemeye bırakılmıştır. Ertesi gün antikor tekrar pipetle alınarak başka çalışmalarda tekrar kullanmak üzere +4°C'ye kaldırılmıştır. (Not: En fazla üç çalışma için tekrar kullanılabilir).

3.8.5. Sekonder Antikor (2. Ab)

Ertesi gün membranlarımız 3 kez 10'ar dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra membranın üzerine sekonder antikorumuz ilave edilmiştir. Sekonder antikor olarak anti rabbit kullanılmıştır. Sekonder antikor %5'lik BSA çözeltisinin içerisine 1/3000 oranında

eklendikten sonra membran üzerine eklenerek karıştırıcı da 1 saat inkübe edilmiştir. Bir saat sonra membran tekrar TBS-T ile 3x10 dakika yıkanmıştır. Yıkama bittikten sonra görüntüleme aşamasına geçilmiştir.

3.8.6. ECL solüsyonu ile görüntüleme

Pierce™ ECL Western solüsyonları 1:1 oranında karıştırılarak görüntüleme tablasına alınmıştır. Membranın ön yüzü ECL solüsyonuyla tam temas edecek şekilde 1.30 dakika bekletildikten sonra görüntüleme yapılmış ve elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir. IS programı kullanılarak bant yoğunluğu hesaplanmıştır.

3.9. İstatistiksel Analizler

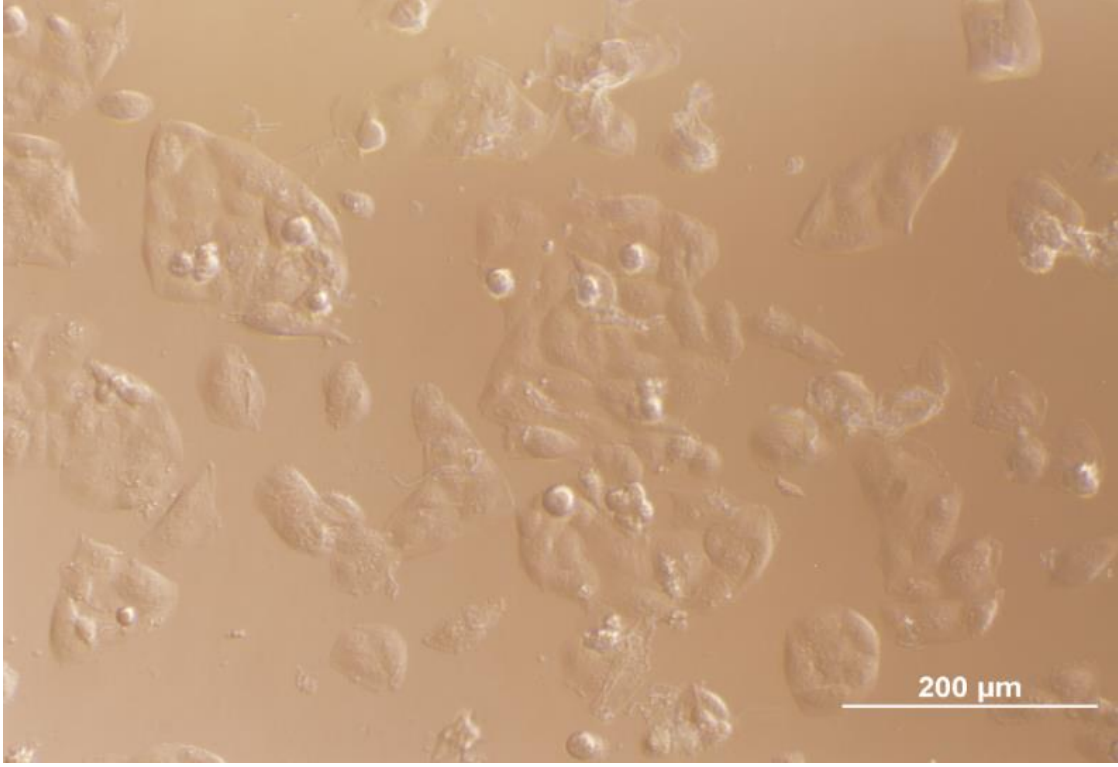
IC₅₀ değerinin belirlenmesi “Graphpad Prism 5.01” (California, ABD) hazır programı kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve deney grupları arasında uygulanan MEL dozlarının istatistiksel karşılaştırması parametrik Bonferonni testi ile, Western Blotting sonuçları eşit olmayan varyanslarda nonparametrik Mann-Whitney U testi ile veriler yapılmıştır. Western Blotting verileri normal dağılım şartını sağlamadığından, parametrik test kullanılmamıştır. Sonuçlar ortalama ± SEM (Standard ortalama hata) olarak verilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Hücre Hattının Kültürü

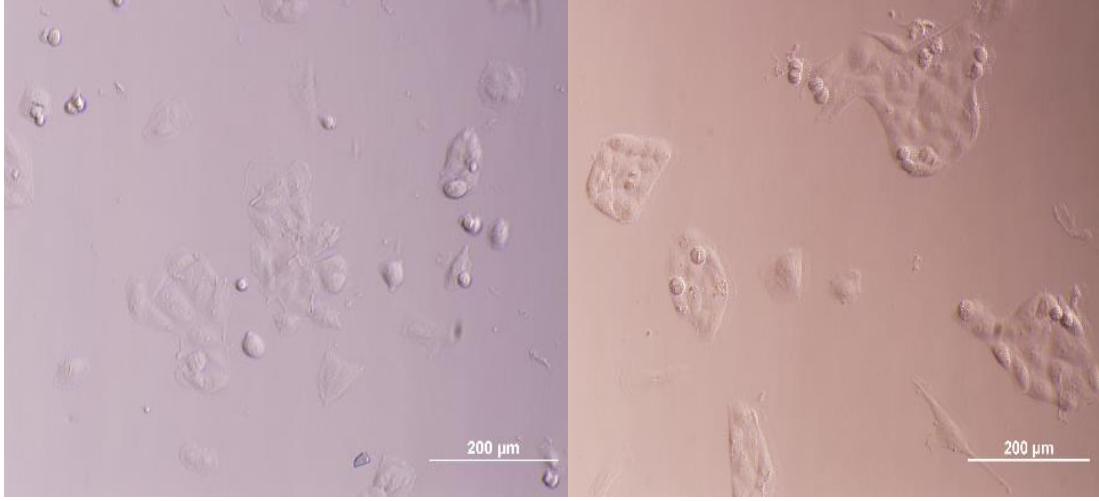
Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından temin edilen U118 hücrelerinin kültüre edilmesiyle hücreler pasajlanmış ve çalışmanın ileriki aşamalarında kullanılmak üzere canlılık kontrolleri yapıldıktan sonra stoklanmışır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. U118 hücre hattının ışık mikroskopunda görünümü, (Handan Sevim, Kübra Nur Güven)

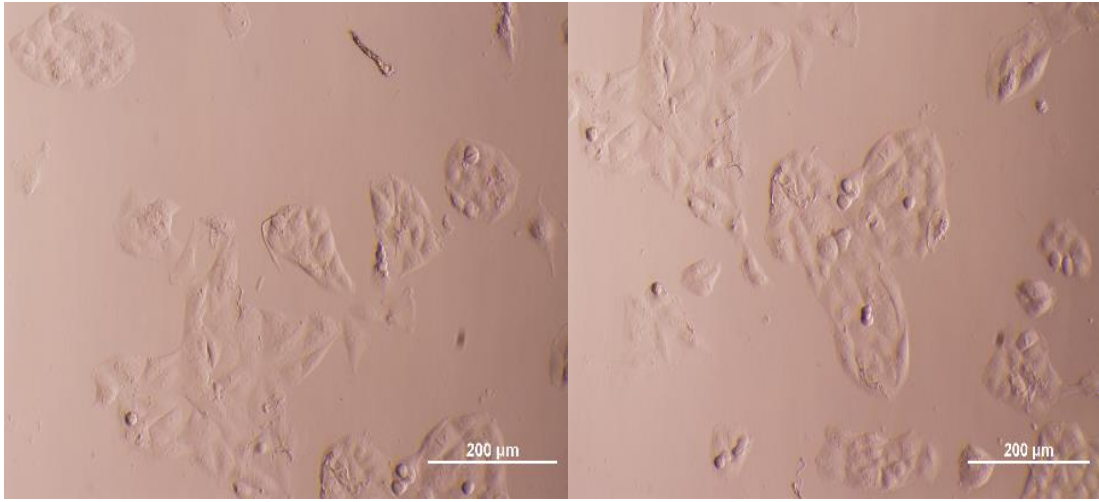
4.2. MTT İle Sitotoksikite Testi

U118 hücre hattı üzerindeki MEL'in toksisitesini değerlendirmek için yapılan çalışmada 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20 µg/ml'de MEL konsantrasyonunun 1, 3, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla U118 hücreleri üzerine uygulanarak MTT [3-(4, 5-dimetiltiazol- 2- il)-difeniltetrazolyum bromür] ile tayin edilmiştir. U118 hücre hattı üzerinde 0,5, 1, 3, 5 ve 10 µg/ml'de MEL konsantrasyonunun 1, 3, 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Şekil 4.5'te verilmiştir. 0,5, 1 ve 3 µg/ml'de uygulanan Melittin dozları hücrenin morfolojisine etki etmezken, 5 µg/ ml üzeri uygulanan dozlar hücrelerin morfolojilerinin bozulmasına neden olmuştur. 10 µg/ ml ve üzeri dozlarda uygulanan MEL hücrenin ölmesine sebep olmuştur.



(a)

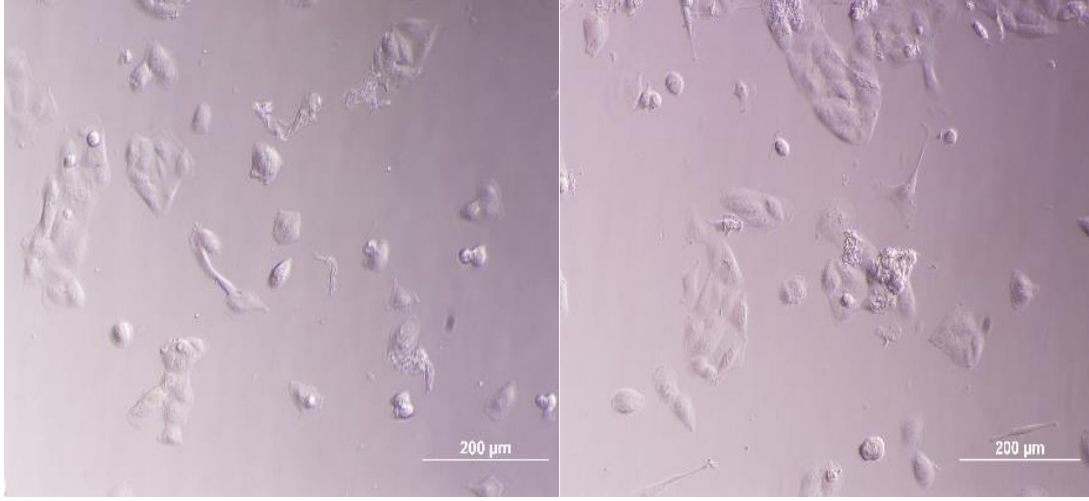
(b)



(c)

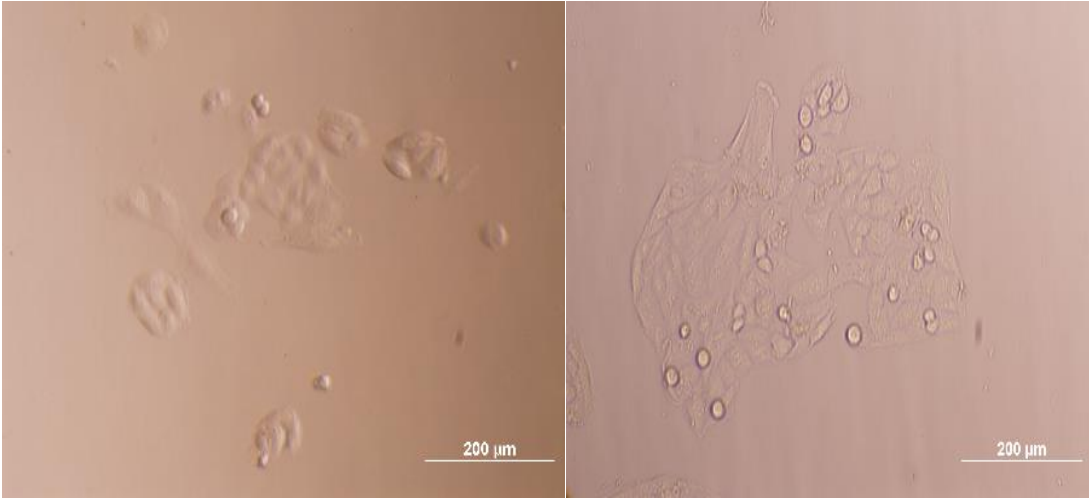
(d)

Şekil 4.2. 0,5 µg/ml Melittin'e maruz bırakılan U118 hücre hattının 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüleri (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)



(a)

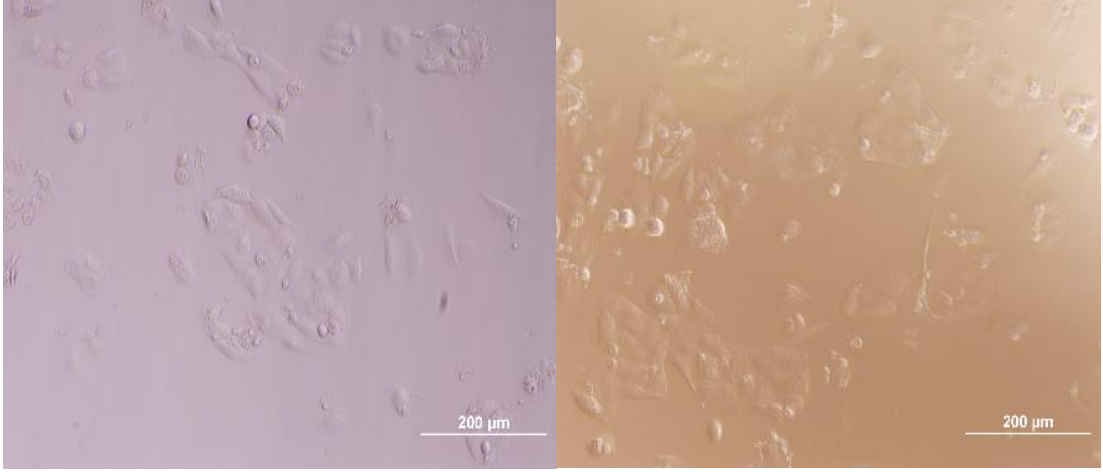
(b)



(c)

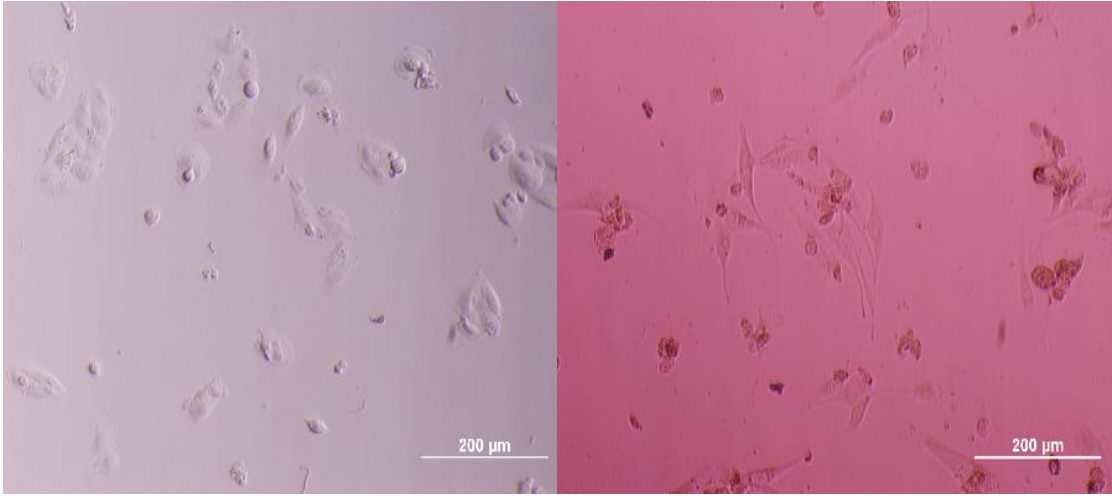
(d)

Şekil 4.3. 1 µg/ml Melittin'e maruz bırakılan U118 hücre hattının 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüsü (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)



(a)

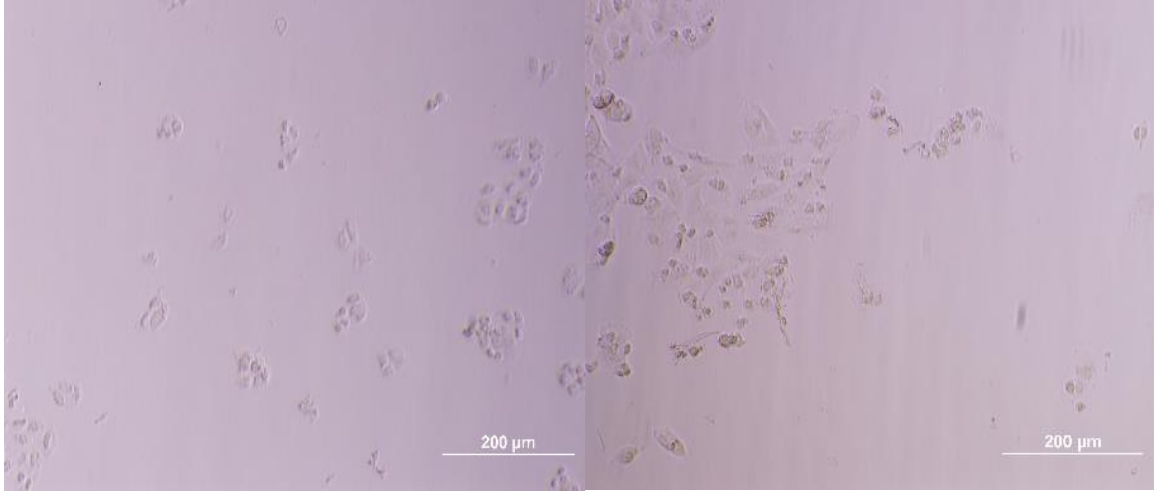
(b)



(c)

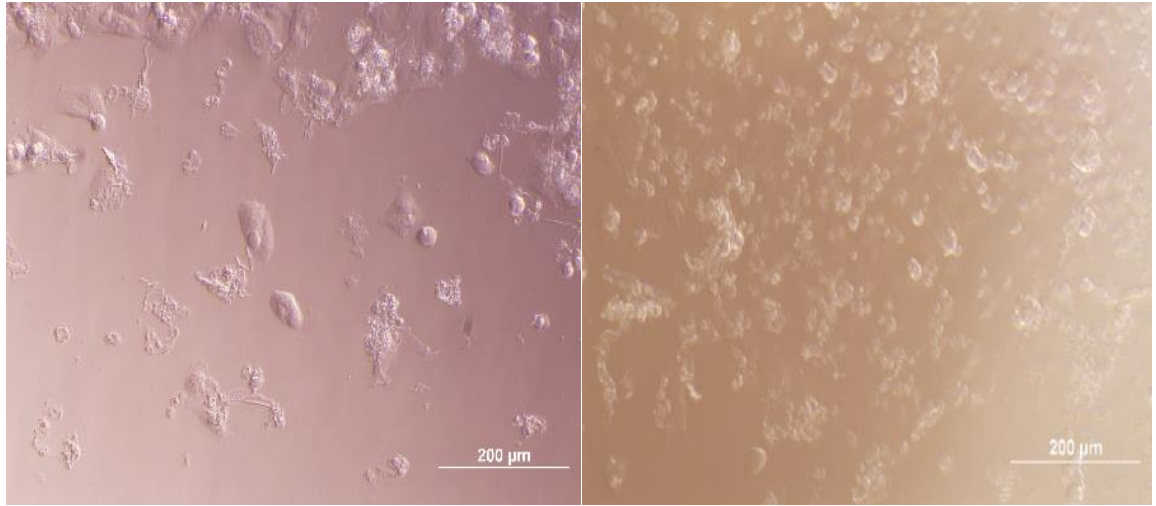
(d)

Şekil 4.4. 3 µg/ml Melittin'e maruz bırakılan U118 hücre hattının 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüleri (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)



(a)

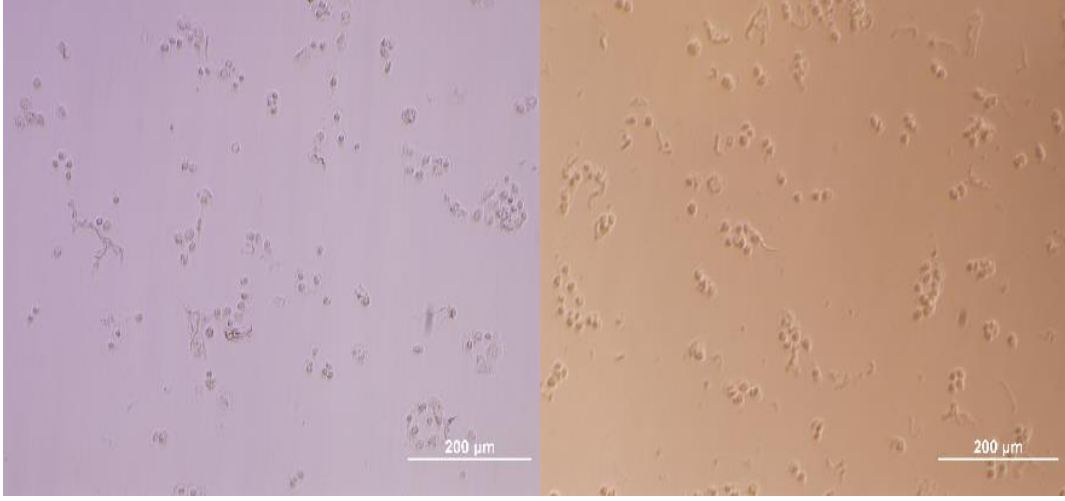
(b)



(c)

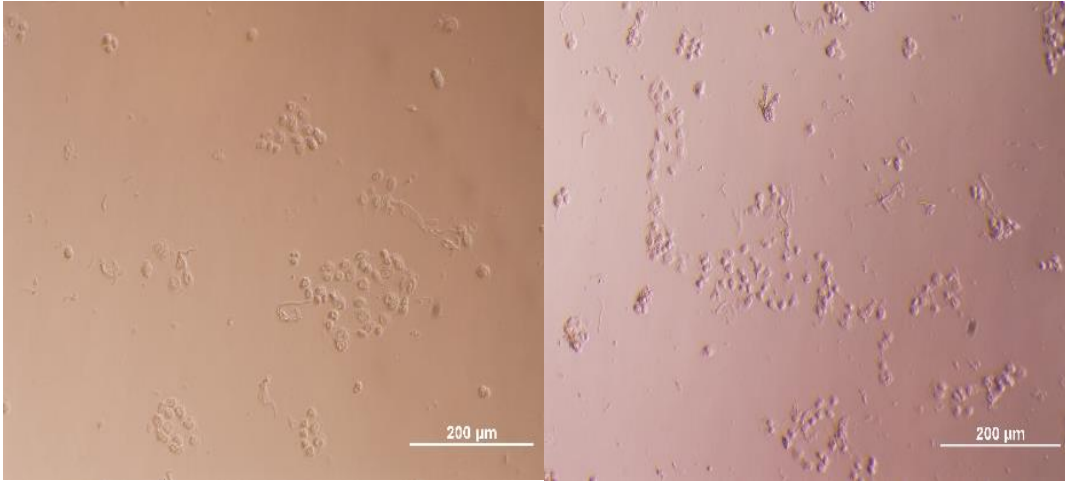
(d)

Şekil 4.5. 5 µg/ml Melittin'e maruz bırakılan U118 hücrenin 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüleri (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)



(a)

(b)



(c)

(d)

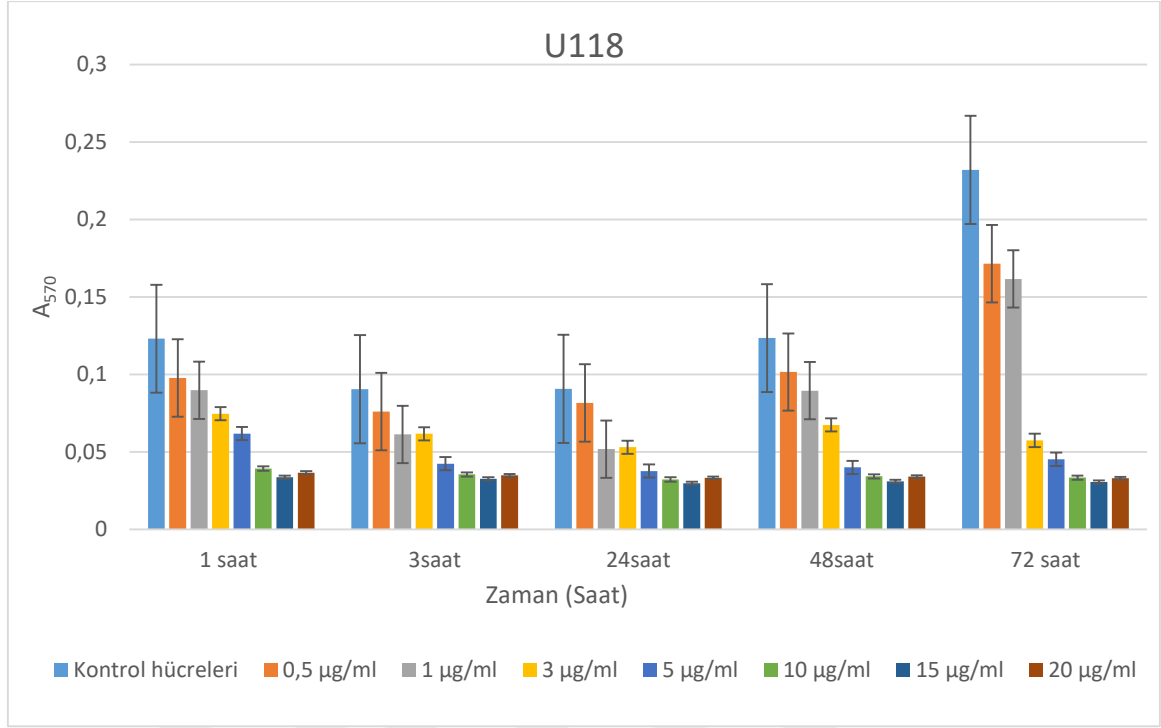
Şekil 4.6. 10 $\mu\text{g/ml}$ Melittin'e maruz bırakılan U118 hücre hattının 1. (a), 3. (b), 24. (c) ve 48. (d) saatlerdeki morfolojik değişiminin ışık mikroskobu görüntüleri (Fotoğraf: Handan Sevim, Kübra Nur Güven)

U118 hücre hattına uygulanan 0,5, 1, 3, 5, 10, 15 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda MEL'in 1, 3, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında MTT sonuçları değerlendirilmiştir. 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. U118 kontrol hücrelerinin absorbans değerleri diğer gruplara göre yüksek olduğu görülmüştür. Uygulanan Melittin konsantrasyonları arttıkça absorbans değerleri düşmektedir. En düşük absorbans değerleri 10, 15 ve 20 µg/ml dozlarda ölçülmüştür.

Çizelge 4.1. Melittin'in U118 hücre hattına farklı konsantrasyon ve farklı zamanlarda verildikten sonra 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri

MEL konsantrasyon değerleri (µg/ml) ve uygulanan zaman	Saatler				
	1	3	24	48	72
Kontrol	0,123	0,090	0,091	0,123	0,232
0,5	0,098	0,076	0,082	0,102	0,171
1 µg/ ml	0,090	0,061	0,052	0,090	0,162
3 µg/ ml	0,075	0,062	0,053	0,067	0,057
5 µg/ ml	0,062	0,042	0,038	0,040	0,045
10 µg/ ml	0,039	0,035	0,032	0,034	0,033
15 µg/ ml	0,034	0,033	0,030	0,031	0,031
20 µg/ ml	0,037	0,035	0,033	0,034	0,033

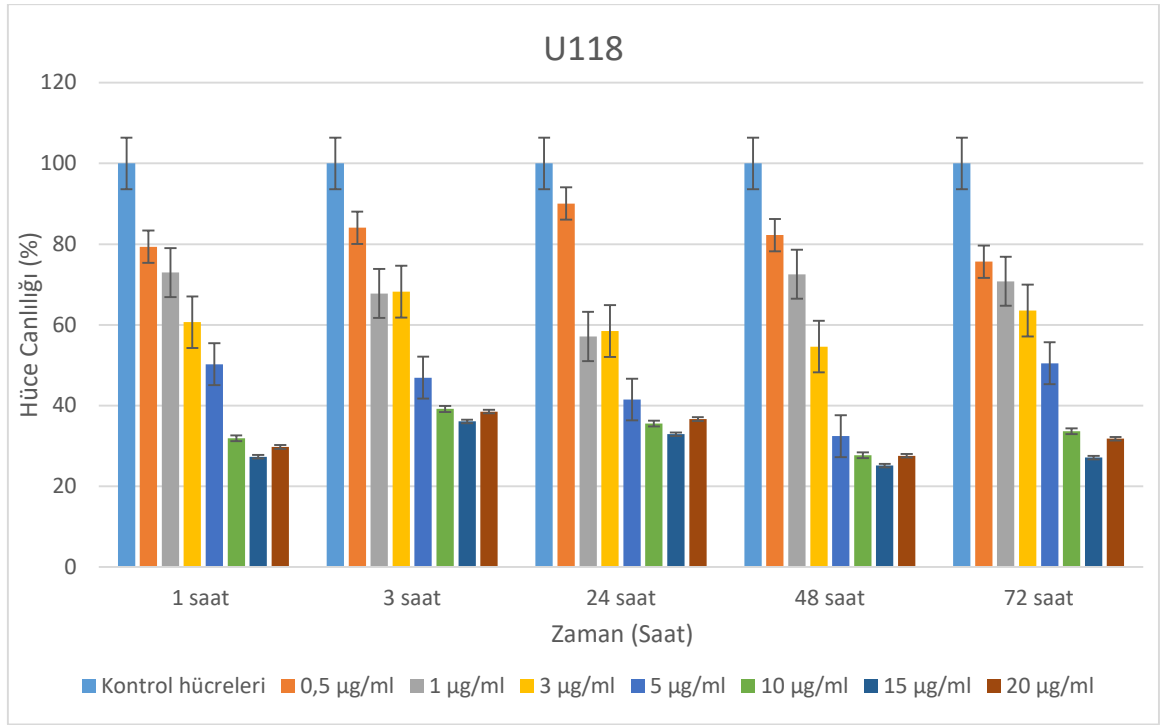
Sitotoksisite çalışmalarından elde edilen verilerin karşılaştırılmasında bar ve error-plot grafiği kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. U118 hücre hattı üzerinde Melittin'in farklı konsantrasyonlarının saatlere göre inhibisyonunun karşılaştırılması bar grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. MTT ile sitotoksitite testine ait U118 hücre hattının absorbans grafiği

Yapılan ölçümler sonucunda uygulama dozuna bağlı olarak ölçülen absorbans değerleri doz konsantrasyonu arttıkça kontrol grubuna göre zamana bağlı olarak azaldığı ve 10 µg/ml konsantrasyon sonrasında uygulanan diğer yüksek dozların zamana bağlı olmaksızın benzer oranlarda düştüğü görülmüştür.

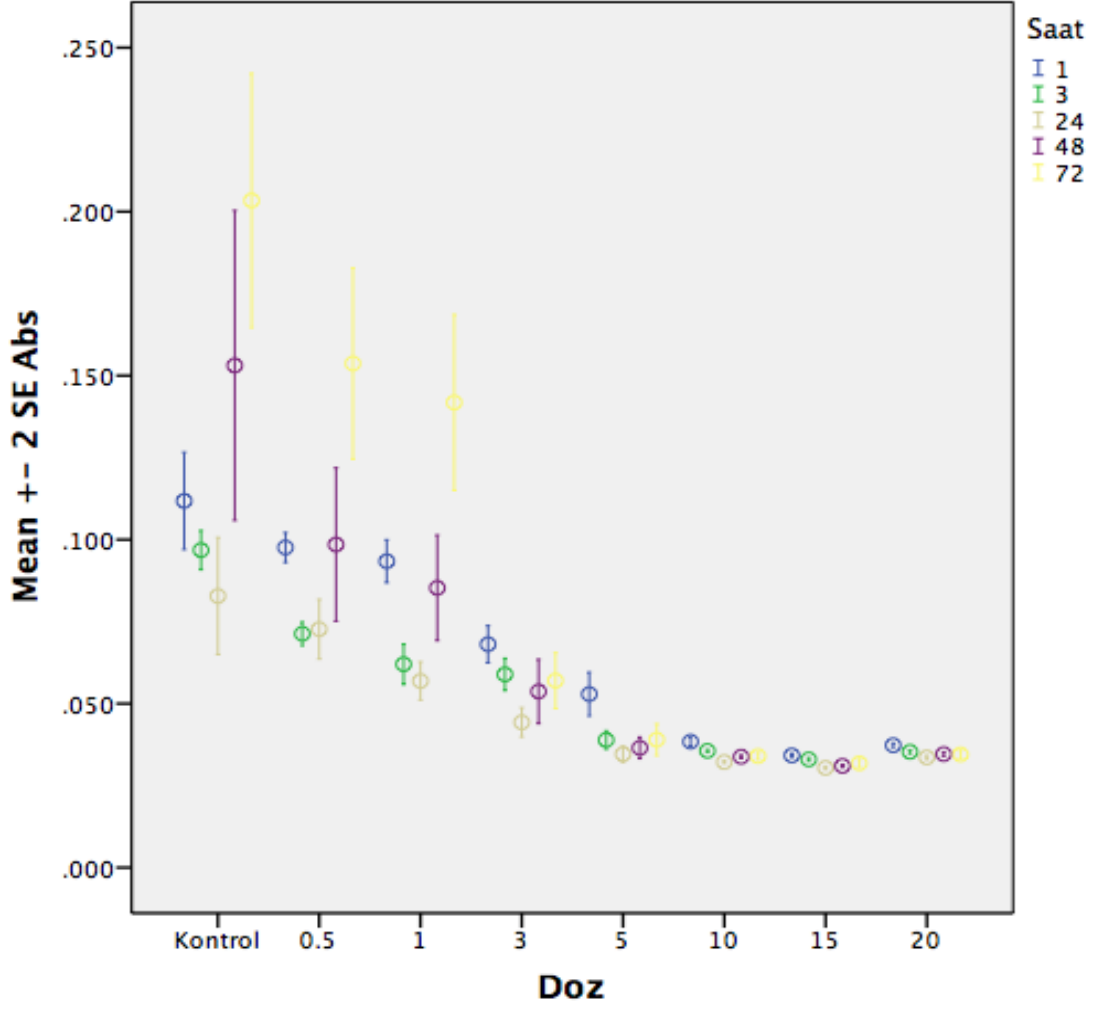
U118 hücre hattı üzerinde MEL'in farklı konsantrasyonlarının saatlere göre inhibisyonunun canlılık oranı karşılaştırılması bar grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. MTT ile sitotoksitite testine ait U118 hücre hattının canlılık oranları

Yapılan ölçümler sonucunda uygulama dozuna bağlı olarak uygulanan saatlere göre canlılık oranları 10 µg/ml ve üzerinde doz konsantrasyonu arttıkça kontrol grubuna göre zamandan bağımsız şekilde %30 oranında canlılığın yitirildiği görülmüştür. Uygulanan 0,5 , 1, 3 ve 5 µg/ml konsantrasyonlardaki MEL dozları hücre canlılığını kontrol grubuna göre orantılı bir şekilde azalttığı görülmüştür.

U118 hücre hattı üzerinde Melittin'in farklı konsantrasyonlarının 1, 3, 24, 48 ve 72 saat sonrası inhibisyonunun karşılaştırılması error-plot grafiği ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. U118 hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyondaki dozların 1, 3, 24, 48 ve 72 saat sonrası absorbans değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar arasında yapılan error-plot grafiğinde U118 kontrol hücrelerinin en yüksek absorbans değeri 72 saatte elde edilmiştir. Uygulanan dozlara bakıldığı zaman 0,5, 1 ve 3 µg/ml konsantrasyondaki dozların zamana bağlı olarak absorbans değerlerinin düştüğü 5 µg/ml ve üzeri uygulanan dozların zamana bağlı olmadan absorbans değerlerini etkilediği görülmüştür (Şekil 4.9.).

Hesaplanan IC50 değerlerini incelediğimizde uygulanan 0,5, 1, 3, 5, 10, 15 ve 20 µg/ml konsantrasyonda uygulanan MEL dozlarının 1, 3, 24, 48 ve 72 saatlerde ki değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. U118 hücre hattının farklı konsantrasyonda uygulanan MEL dozlarının IC₅₀ değerleri

Dozlar	Zaman (Saat)				
	1	3	24	48	72
0,5-20 µg/ml arası uygulanan tüm dozlar	3,068	3,726	0,376	2,897	2,788

U118 hücre hatlarının farklı konsantrasyonlarda 1, 3, 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada Bir grup kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Kontrol grubu ile farklı konsantrasyon değerleri Bonferroni testi kullanılarak karşılaştırılması yapılmıştır (Çizelge 4.3). Kontrole göre bütün dozlar anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$)

Çizelge 4.3. U118 hücre hattında Melittin' in kontrol grubunun farklı konsantrasyonlarda değerlendirilmesi (Bonferroni, $p < 0,05$)

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalamalar Arası Fark	SEM
0,5	.04504*	,006091
1	.06216*	,006091
3	.09076*	,006091
5	.10784*	,006091
10	.11836*	,006091
15	.12172*	,006091
20	.11892*	,006091

* $p < 0,01$; fark çok anlamlıdır.

4.3. Protein Ölçümleri

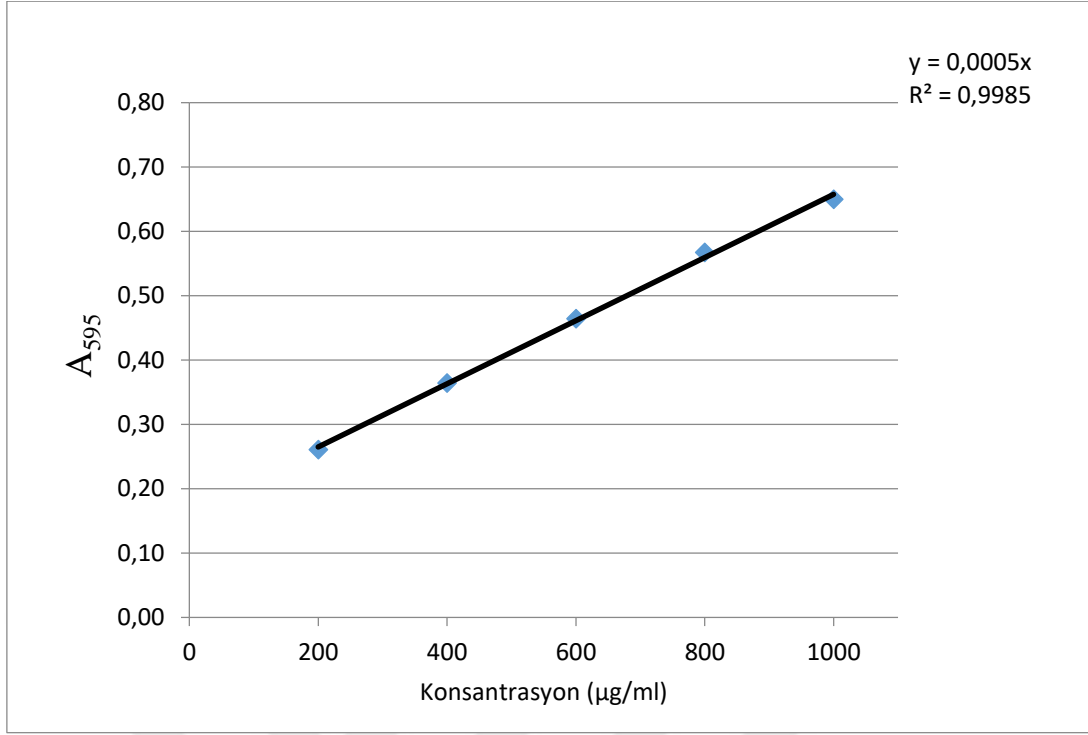
U118 hücre hattından elde edilmiş protein konsantrasyonlarını hesaplamak için spektrofotometre cihazında 595nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ölçülmüştür (Çizelge 4.3.). Bradford yöntemine göre protein ölçümleri için, referans proteinlerin ölçümü

sonrası çizilmiş olan Şekil 4.8.'deki grafikten elde edilmiş eğim formülü kullanılmıştır. Şekil 4.8'deki grafikten elde edilmiş formülde “y” yerine protein absorbans değeri konularak, “x” değeri olan protein konsantrasyonu elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Protein konsantrasyonları dilüsyon faktörü (5 kat) ile çarpılarak 1,58-3,89 µg/ml arasında hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. U118 hücrelerinin protein konsantrasyon değerleri

MEL konsantrasyonları		Absorbans Değeri	Protein Konsantrasyonu µg/ml
U118 Kontrol Hücresi		0,37	2,03
0,5 µg/ml	3saat	0,555	3,89
	24saat	0,545	3,78
	48saat	0,325	1,58
1 µg/ml	3saat	0,531	3,64
	24saat	0,484	3,17
	48saat	0,379	2,12
3 µg/ml	3saat	0,426	2,59
	24saat	0,422	2,55
	48saat	0,416	2,49

Protein ölçümleri için, referans proteinlerin ölçümünden elde edilen standard eğri Şekil 4.8'de verilmiştir. Grafikten elde edilmiş eğim formülünde R^2 0,9985'tir. Eğimi hesaplamak için Excel tabanlı grafikten yararlanılmıştır. Eğim çizgisi eklendikten sonra grafik üzerinde $y= 0,005x$ eşitliği belirlenmiştir.



Şekil 4.10: Standard olarak hazırlanmış proteinlerin Bradford yöntemiyle ölçümlerinden elde edilen referans grafiği y: absorbans, x: konsantrasyon

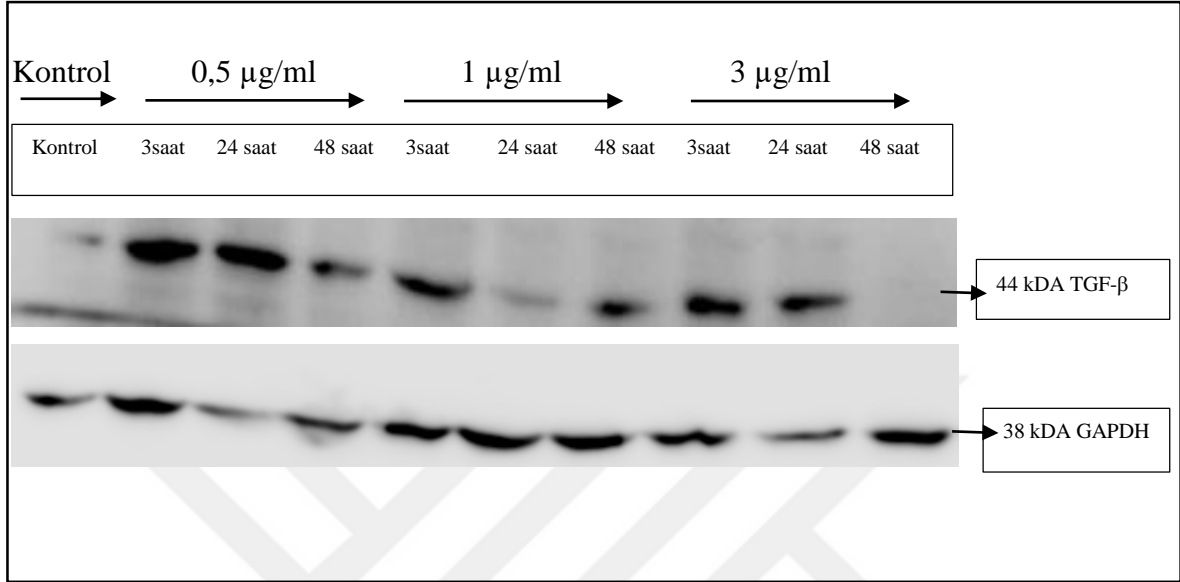
Ölçülen proteinlerin miktarları tayin edilirken; protein miktarları bilinen standart proteinler ile karşılaştırılmıştır. Ölçülen absorbans değerleri ile standart proteinlerin absorbans değerleri grafiklenerek R^2 değeri 1' yakın bulunmuştur.

4.4. Western Blotting

U118 hücre hattından elde edilmiş, total proteini 25 µg/ml yoğunluğa sahip hücre örneklerinin Western Blotting ile protein düzeyleri analiz edilmiştir. U118 hücrelerine 0,5, 1 ve 3 µg/ml konsantrasyonda uygulanan Melittin dozunun 3, 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonucu hücrelerdeki TGF-β, ADAMTS-5 ve MMP-9 protein seviyelerinin değişim görüntüleri Şekil 4.11., Şekil 4.14 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Görüntülenen bantların yoğunlukları Li-Cor programı ile hesaplanmıştır. U118 örneklerinin protein yoğunlukları internal kontrol olarak kullanılmış olan GAPDH proteininin yoğunluğuna göre normalize edilmiştir.

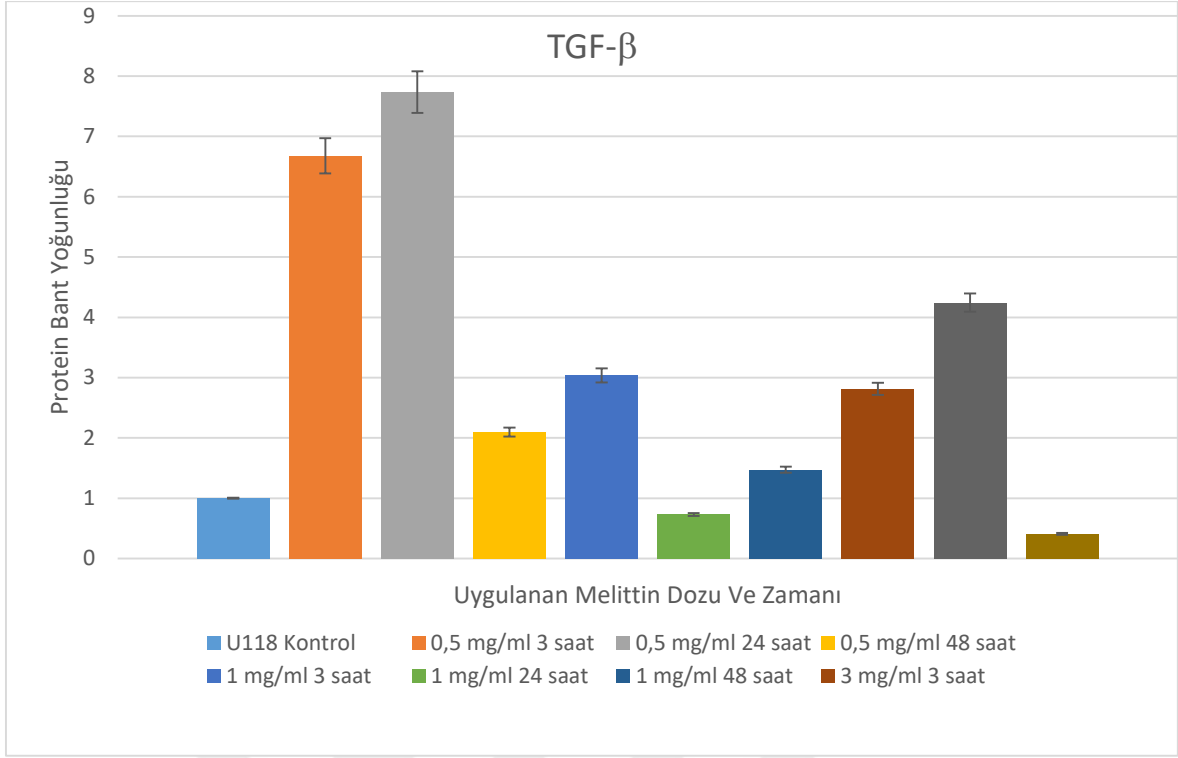
4.4.1. Melittin'in 0,5, 1 ve 3 µg/ml Konsantrasyonlarında U118 Hücrelerine 3, 24 ve 48 saat Uygulanması sonucu TGF-β Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

Li-Cor görüntüleme cihazı protein bant yoğunluğu tespit edilen 25 µg yüklenen hücre örneklerinin TGF-β protein görüntüsü Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. ECL solüsyonu ile muamele edilerek görüntüsü elde edilen TGF-β protein görüntüsü

Protein bant yoğunluğu tespit edilen TGF-β proteini incelendiğinde farklı konsantrasyonda uygulanan Melittin dozları arttıkça U118 hücrelerinin bant yoğunluğu kontrol hücrelerinin bant yoğunluğuna göre artmaktadır (Şekil 4.11).



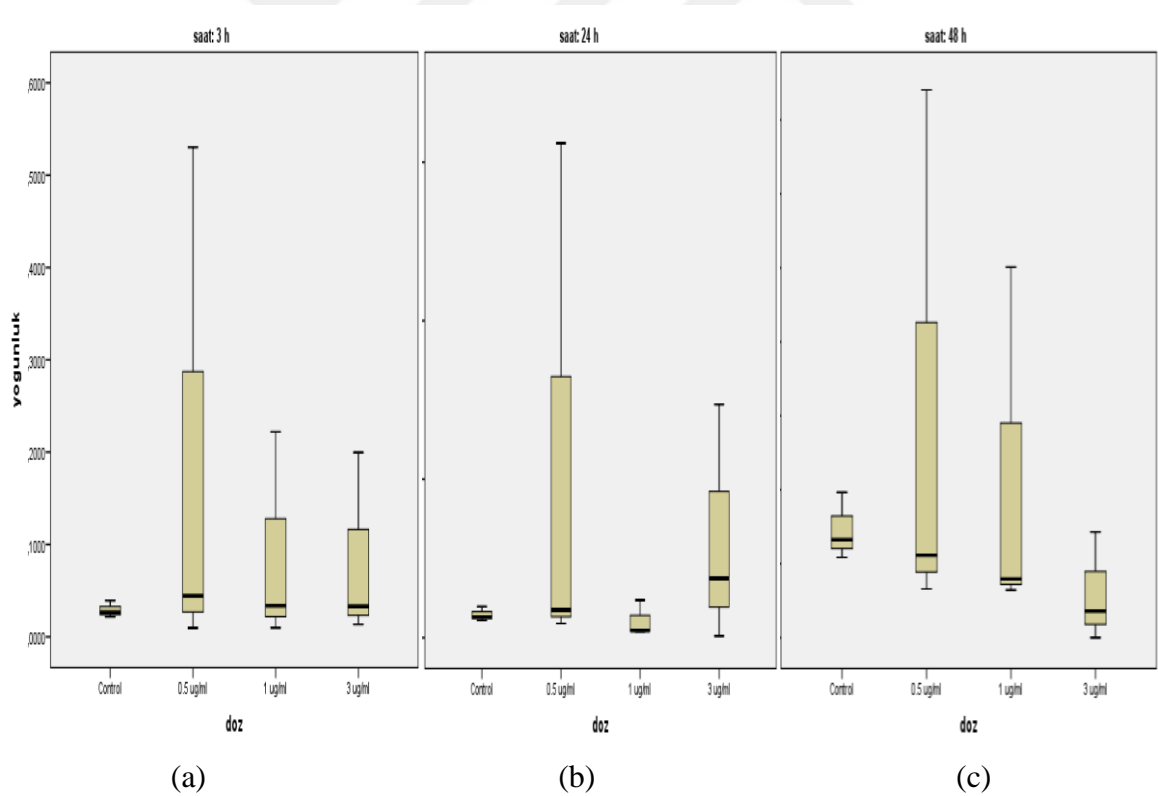
Şekil 4.12. TGF- β proteininin farklı doz ve zamandaki kat artışları grafiği

Anti-TGF- β primer antikoru (rabbit poliklonal, ab 92486) 1:1000 seyreltilerek, anti-rabbit sekonder antikor (Cell signaling 7074) ise 1:3000 seyreltilerek uygulanmıştır. U118 hücrelerinin kontrol grubunun TGF- β protein seviyeleri $0,292 \pm 0,005$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanırken, 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda Melittin'in 3 saatlik uygulaması sonucu TGF- β protein seviyeleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $1,195 \pm 0,0291$ (ort. \pm SEM), 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,885 \pm 0,0670$ (ort. \pm SEM), 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,820 \pm 0,059$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanmıştır. 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda Melittin'in 24 saatlik uygulaması sonucu TGF- β protein seviyeleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $2,256 \pm 0,0345$ (ort. \pm SEM), 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,213 \pm 0,0129$ (ort. \pm SEM), 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $1,237 \pm 0,0878$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanmıştır. 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda Melittin'in 48 saatlik uygulaması sonucu TGF- β protein seviyeleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,610 \pm 0,0435$ (ort. \pm SEM), 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,430 \pm 0,0286$ (ort. \pm SEM), 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,119 \pm 0,0085$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanmıştır.

U118 hücre hattına uygulanan Melittin dozlarının 3 saat uygulaması sonucunda kontrol grubuna göre artış görülmüştür. Melittin'in 0,5 $\mu\text{g/ml}$ dozunda 24 saatlik uygulanması sonucunda TGF- β protein düzeyinde da belirgin bir artış görülmüştür. 24 saat uygulanan 1

$\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda uygulanan Melittin dozu ve 48 saat uygulanan $3 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda uygulanan Melittin dozunun protein bant yoğunluğu U118 kontrol hücrelerine göre azalmıştır (Şekil 4.12). Uygulanan en yüksek doz olan $3 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ve en yüksek saat olan 48 saatte kontrole göre 0,7 kat düşüş görülmüştür. Uygulanan $0,5 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki MEL'in uygulama süresi arttıkça TGF- β protein düzeyi artmaktadır. Kontrol hücrelerine göre $0,5 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda MEL dozlarının 24 saatlik uygulamasında 6,5 kat artış, 48 saatlik uygulamasında 7,5 kat artış görülmüştür (Şekil 4.12). Kat artış ve azalışları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

U118 hücre hattına uygulanan farklı konsantrasyonda Melittin dozunun karşılaştırılması saatlere göre box-plot grafiği ile gösterilmiştir. TGF- β protein bant yoğunluğu U118 kontrol hücresinin ve U118 hücrelerine uygulanan $0,5, 1$ ve $3 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlardaki Melittin dozunun 3, 24 ve 48 saatlik uygulamaları Şekil 4.11'de box-plot grafiğinde karşılaştırılmıştır.

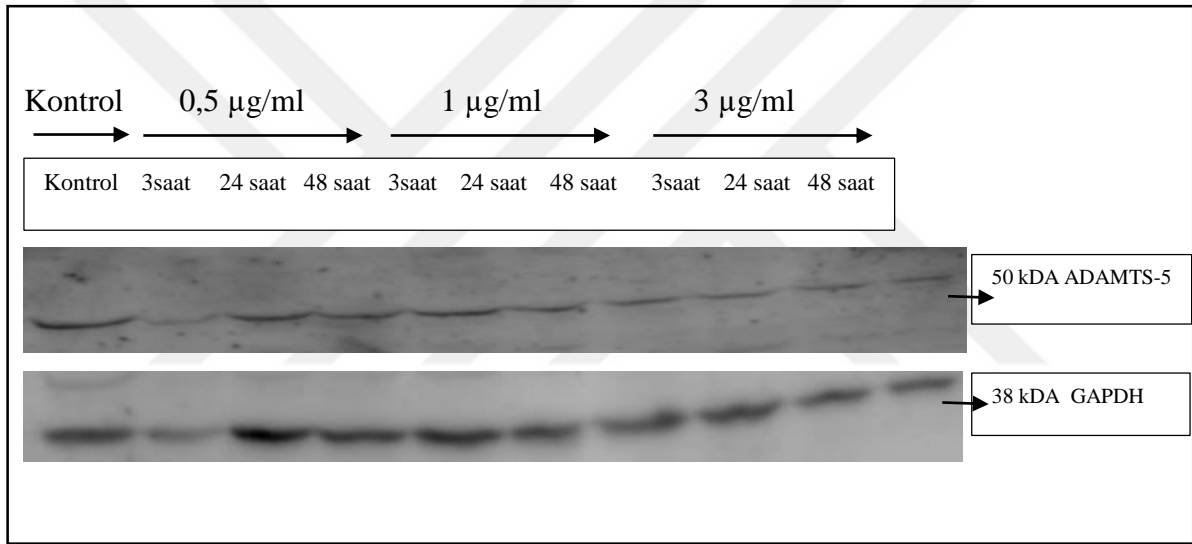


Şekil 4.13. TGF- β proteininin U118 kontrol hücresinin ve uygulanan $0,5, 1$ ve $3 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki Melittin dozunun 3 saatlik (a), 24 saatlik (b), 48 saatlik (c) uygulama box-plot grafiği

U118 kontrol hücreleri ve uygulanan 0,5, 1 ve 3 µg/ml konsantrasyondaki Melittin dozunun uygulanan 3 saatteki TGF-β proteininin bant yoğunluğuna göre karşılaştırıldığında; en yüksek varyans aralığı uygulanan her saatte 0,5 µg/ml konsantrasyondaki Melittin uygulanan U118 hücrelerinde, en düşük varyans aralığı kontrol grubunda görülmüştür (Şekil 4.13).

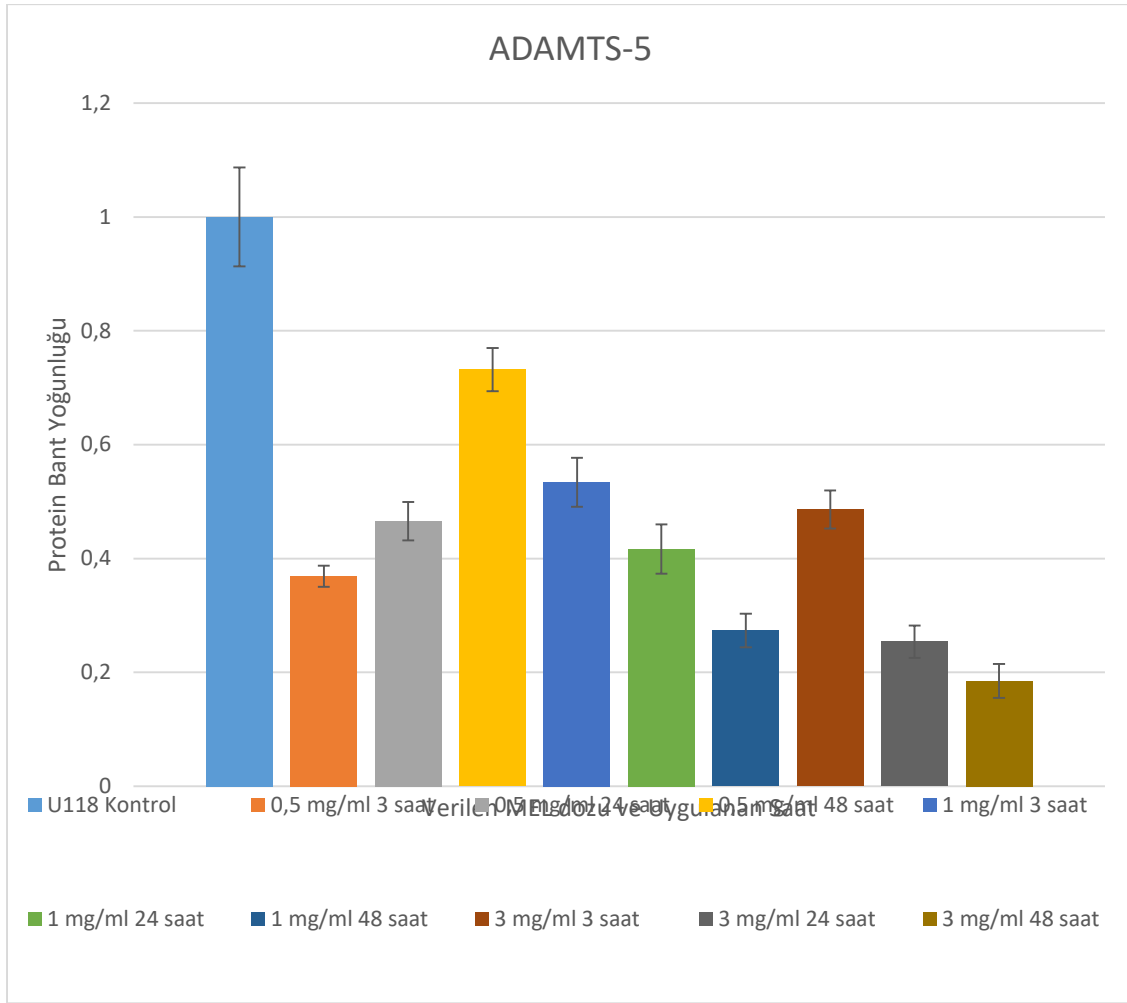
4.4.2 Melittin'in 0,5, 1 ve 3 µg/ml Konsantrasyonlarında U118 Hücrelerine 3, 24 ve 48 saat Uygulanması sonucu ADAMTS-5 Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

Li-Cor görüntüleme cihazı protein bant yoğunluğu tespit edilen 25 µg yüklenen hücre örneklerinin ADAMTS5 protein görüntüsü Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. ECL solüsyonu ile muamele edilerek görüntüsü elde edilen ADAMTS-5 protein görüntüsü

Protein bant yoğunluğu tespit edilen ADAMTS-5 proteini incelendiğinde farklı konsantrasyonda uygulanan Melittin dozları arttıkça U118 hücrelerinin bant yoğunluğu kontrol hücrelerinin bant yoğunluğuna göre azalmaktadır (Şekil 4.14).



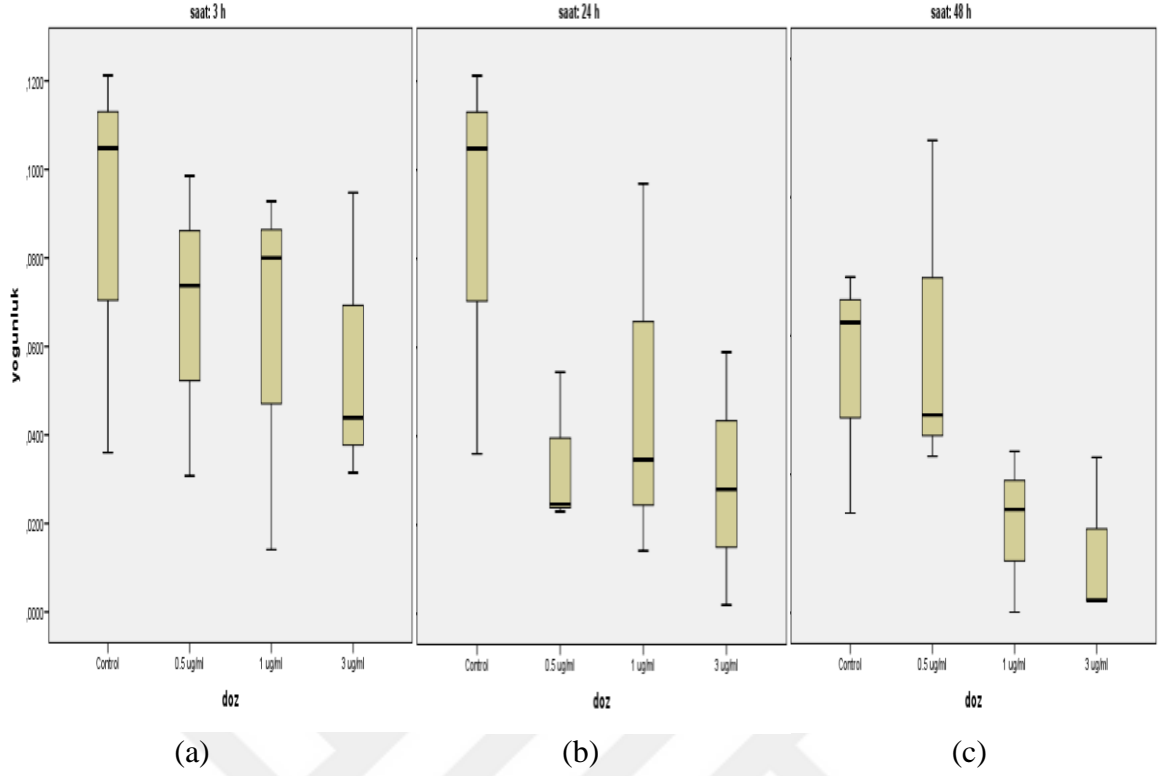
Şekil 4.15. ADAMTS-5 proteininin farklı doz ve zamandaki kat artışları grafiği

Anti-ADAMTS-5 primer antikor (rabbit poliklonal, ab 39202) 1:1000 seyreltilerek, anti-rabbit sekonder antikor (cell signaling 7074) ise 1:3000 seyreltilerek uygulanmıştır. U118 hücrelerinin kontrol grubunun ADAMTS-5 protein seviyeleri $0,873 \pm 0,0261$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanırken, 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda Melittin'in 3 saatlik uygulaması sonucu ADAMTS-5 protein seviyeleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,677 \pm 0,0198$ (ort. \pm SEM), 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,623 \pm 0,0244$ (ort. \pm SEM), 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,567 \pm 0,0193$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanmıştır. 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda Melittin'in 24 saatlik uygulaması sonucu ADAMTS-5 protein seviyeleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,340 \pm 0,0102$ (ort. \pm SEM), 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,486 \pm 0,0245$ (ort. \pm SEM), 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,296 \pm 0,0164$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanmıştır. 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda Melittin'in 48 saatlik uygulaması sonucu ADAMTS-5 protein seviyeleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,994 \pm 0,0358$

(ort. \pm SEM), 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,319 \pm 0,017$ (ort. \pm SEM), 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,216 \pm 0,0172$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanmıştır.

ADAMTS-5 protein bant yoğunluğunun kat artış grafiği incelediğinde U118 hücre hattına uygulanan Melittin dozlarının farklı saat uygulamalarında kontrol grubuna göre azalış görölmüştür. 3 saatlik doz uygulamasında yarı yarıya yoğunluk azalması tespit edilmiştir. Uygulanan Melittin dozu arttıkça protein bant yoğunluğu 3 saatlik uygulamaya göre gittikçe azalmıştır (Şekil 4.15). Uygulanan en düşük doz 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ve en düşük saat olan 3 saatte kontrole göre 0,65 kat düşüş görölmüştür. Uygulanan 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki MEL'in uygulama süresi arttıkça ADAMTS-5 protein düzeyi artmaktadır; ancak kontrol hücrelerine göre 24 saatlik uygulamada 0,5 kat düşüş, 48 saatlik uygulamada 0,2 kat düşüş görölmüştür (Şekil 4.15.). Kat artış ve azalışları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

U118 hücre hattına uygulanan farklı konsantrasyonda Melittin dozunun karşılaştırılması saatlere göre box-plot grafiği ile gösterilmiştir. ADAMTS-5 protein bant yoğunluğu U118 kontrol hücrelerinin ve U118 hücrelerine uygulanan 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlardaki Melittin dozunun 3, 24 ve 48 saatlik uygulamaları Şekil 4.16'da box-plot grafiğinde karşılaştırılmıştır.

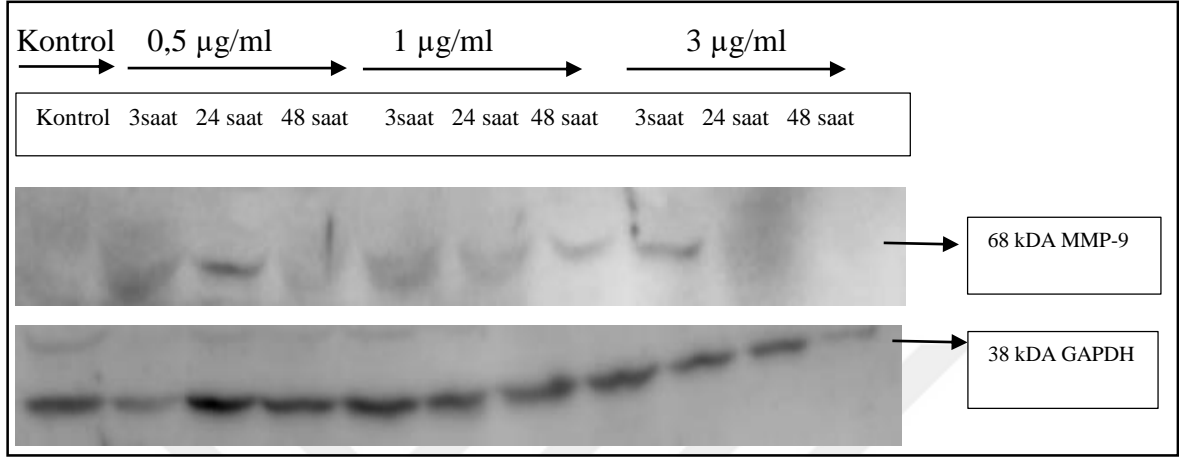


Şekil 4.16. ADAMTS-5 proteininin U118 kontrol hücrelerinin ve uygulanan 0,5, 1 ve 3 µg/ml konsantrasyondaki Melittin dozunun 3 saatlik (a), 24 saatlik (b), 48 saatlik (c) uygulama box-plot grafiği

U118 kontrol hücreleri ve uygulanan 0,5, 1 ve 3 µg/ml konsantrasyondaki Melittin dozunun uygulanan tüm saatlerdeki ADAMTS-5 proteininin bant yoğunluğuna göre karşılaştırıldığında en düşük varyans aralığı 24 saat uygulanan 0,5 µg/ml konsantrasyonda Melittin uygulanan U118 hücrelerinde ve 48 saat uygulanan 1 ve 3 µg/ml konsantrasyonda Melittin uygulanan U118 hücrelerinde görülmüştür. U118 kontrol hücreleri ile farklı dozda ve farklı saatlerde uygulanan ve farklı dozlarda muamele edilen hücrelerin bant yoğunluklarının varyans aralığı birbirine yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.16).

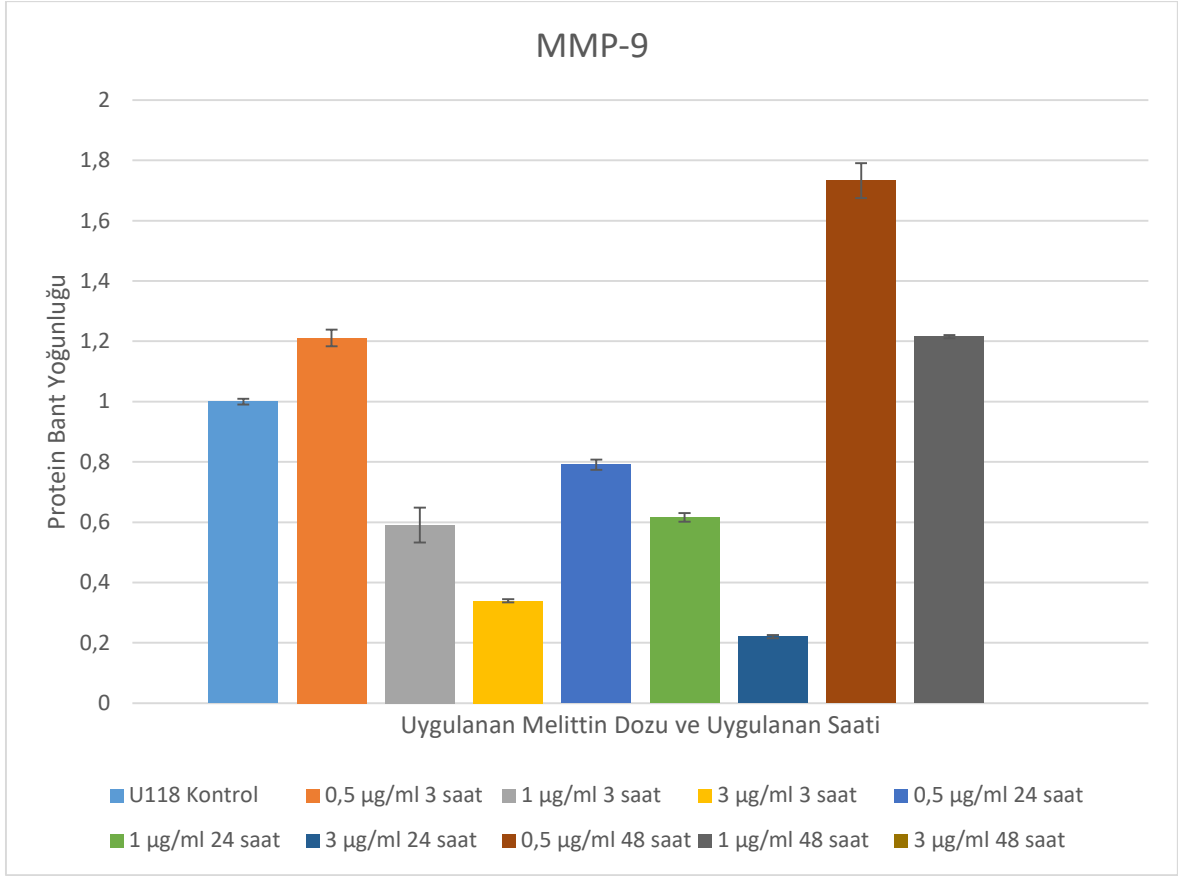
4.4.3. Melittin'in 0,5, 1 ve 3 µg/ml Konsantrasyonlarında U118 Hücrelerine 3, 24 ve 48 saat Uygulanması Sonucu MMP-9 Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

Li-Cor görüntüleme cihazı protein bant yoğunluğu tespit edilen 25 µg yüklenen hücre örneklerinin MMP-9 protein görüntüsü Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. MMP-9 proteininin farklı doz ve zamandaki kat artışları grafiği

Protein bant yoğunluğu tespit edilen MMP-9 proteini incelendiğinde farklı konsantrasyonda u MEL dozları arttıkça U118 hücrelerinin bant yoğunluğu kontrol hücrelerinin bant yoğunluğuna göre artmaktadır, ancak 3 µg/ml konsantrasyonda MEL'in 24 ve 48 saat uygulanması sonucu bant görülmemiştir (Şekil 4.17).

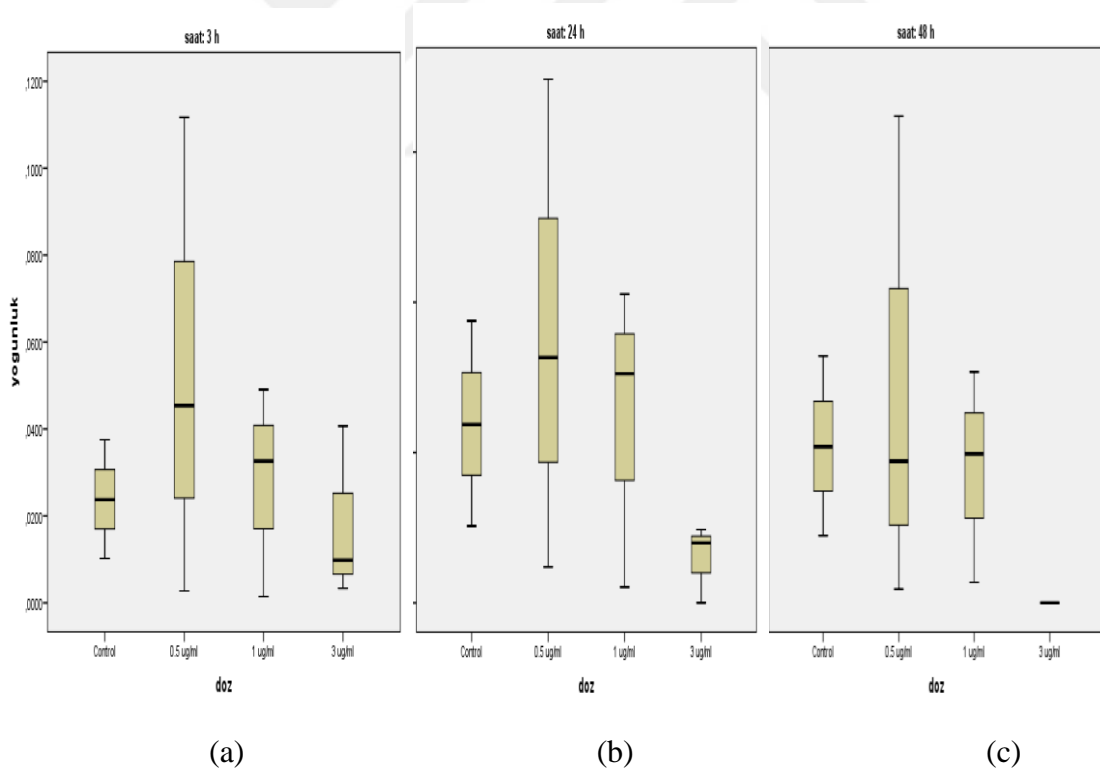


Şekil 4.18. MMP-9 proteininin farklı doz ve zamandaki kat artışları grafiği

Anti-MMP-9 primer antikoru (rabbit poliklonal, ab 38898) 1:1000 seyreltilerek, anti-rabbit sekonder antikor (cell signaling 7074) ise 1:3000 seyreltilerek uygulanmıştır. U118 hücrelerinin kontrol grubunun MMP-9 protein seviyeleri $0,238 \pm 0,07$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanırken, 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda Melittin'in 3 saatlik uygulaması sonucu MMP-9 protein seviyeleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,532 \pm 0,0317$ (ort. \pm SEM), 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,277 \pm 0,0139$ (ort. \pm SEM), 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,179 \pm 0,0115$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanmıştır. 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda Melittin'in 24 saatlik uygulaması sonucu MMP-9 protein seviyeleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,357 \pm 0,0188$ (ort. \pm SEM), 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,245 \pm 0,0116$ (ort. \pm SEM), 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,005 \pm 0,003$ (ort. \pm SEM) olarak hesaplanmıştır. . 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda Melittin'in 48 saatlik uygulaması sonucu MMP-9 protein seviyeleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,325 \pm 0,0214$ (ort. \pm SEM), 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için $0,203 \pm 0,09$ (ort. \pm SEM) hesaplanmıştır. 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için protein bandı olmadığı için ortalama değeri ve stadandart hata ortalaması hesaplanmamıştır.

MMP-9 protein bant yoğunluğunun kat artış grafiği incelediğinde U118 hücre hattına uygulanan Melittin dozlarının 3 saat uygulamasında kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. Doz ve uygulanan dozun süresi arttıkça bant yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir ve 48 saat 3 µg/ml Melittin uygulanan hücrelerden bant görüntüsü alınamamıştır. Uygulanan en düşük doz 0,5 µg/ml konsantrasyonda ve en yüksek saat olan 48 saatte kontrole göre 0,7 kat artış görülmüştür. Uygulanan 3 µg/ml konsantrasyondaki MEL'in 24 saatlik uygulamasında MMP-9 protein düzeyi kontrol hücrelerine göre 0,8 kat düşüş görülmüştür (Şekil 4.18). Kat artış ve azalışları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

U118 hücre hattına uygulanan farklı konsantrasyonda Melittin dozunun karşılaştırılması saatlere göre box-plot grafiği ile gösterilmiştir. MMP-9 protein bant yoğunluğu U118 kontrol hücrelerinin ve U118 hücrelerine uygulanan 0,5, 1 ve 3 µg/ml konsantrasyonlardaki Melittin dozunun 3, 24 ve 48 saatlik uygulamaları Şekil 4.16'da box plot grafiğinde karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.19. MMP-9 proteininin U118 kontrol hücrelerinin ve uygulanan 0,5, 1 ve 3 µg/ml konsantrasyondaki Melittin dozunun 3 saatlik (a), 24 saatlik (b), 48 saatlik (c) uygulama box-plot grafiği

U118 kontrol hücreleri ve uygulanan 0,5, 1 ve 3 µg/ml konsantrasyondaki Melittin dozunun farklı zaman ve farklı dozlardaki uygulaması MMP-9 proteininin bant yoğunluğuna göre

karşılaştırıldığında bant görülmediği için 3 µg/ml konsantrasyonda Melittin uygulanan U118 hücrelerinin varyans aralığı hesaplanmamıştır. Bant elde edilen örnekler karşılaştırıldığında en düşük varyans aralığı 24 saat 3 µg/ml konsantrasyonda Melittin uygulanan U118 hücrelerinde, en yüksek varyans aralığı farklı saatlerde 0,5 µg/ml konsantrasyonda uygulanan örneklerde görülmüştür (Şekil 4.19).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen birçok madde, kanser gibi hastalıkları tedavi etmek için yeni ilaçların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. İnsan hücre fizyolojisine müdahale edebilen farmakolojik olarak aktif maddeleri üreten hayvanlar arasında akrep, yılan ve arılar gibi hayvanlar bulunur. Bu hayvanların zehirlerinde bulunan aktif maddeler, anti-tümör ajanı olarak büyük bir potansiyel sunmaktadır. Zehirde bulunan aktif maddeler olan bazı peptitlerin anti kanser terapisinde kullanılması alternatif bir yöntem olarak düşünülmektedir. Biyotoksinler arasında en yaygın olarak incelenen arı zehridir. Arı zehrinin kuru ağırlığının %40-60'ını oluşturan Melittin; hücre membranındaki metabolik yollarda sentez bozukluğu ve enzim hasarı meydana getirirken anti-mikrobiyal aktivite ve pro-inflamatuar etki gösterir [63,64]. Ayrıca, kanser hücresi zarlarına spesifik olarak bağlanabilir ve bu hücrelerin migrasyonunu ve çoğalmasını etkiler [65]. Lösemi, böbrek, akciğer, karaciğer, prostat, mesane ve meme kanseri hücreleri de dahil olmak üzere birçok kanser hücresi melittin tarafından etkilenebilir [66]. MEL'in anti-tümör etkisi birçok çalışmada görülmüş, bu tez çalışmasında da U118 kanser hücresindeki (Şekil 4.1.) etkinliği incelenmiştir.

Bu çalışmada; MEL'in U118 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine ve invazyonda etkili olan MMP-9 ve ADAMTS-5 proteazları ve TGF- β sitokininin protein düzeylerine bakılmıştır. U118 hücre hattındaki hücrelerin morfolojik yapıları ve MEL'in U118 hücreleri üzerindeki mitokondriyal aktivitesinin etkisi MTT ile belirlenmiştir. Hücrelerin 1, 3, 24, 48 ve 72 saat süreyle MEL ile 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında inkübasyona bırakılması sonucunda; 0,5, 1 ve 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında uygulanan saatlerde hücrelerin morfolojik yapısında değişiklik olmadığı görülmüştür (Şekil 4.2, 4.3, 4.4). MEL'in 5 $\mu\text{g/ml}$ dozda morfolojik yapıda bozulma meydana getirdiği (Şekil 4.5), 10 $\mu\text{g/ml}$ ve üzeri uygulanan dozlarda ise hücrelerin morfolojilerini tamamen yitirdiği görülmüştür (Şekil 4.6). Park ve ark.'ı [67] Caki-1 hücrelerine 1, 2, 3 ve 4 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında MEL dozunu 24 saat uygulayarak MTT ile sitotoksisite testi uygulamış ve yapılan çalışma sonucunda; MEL' in 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ 'de uygulanan dozlarda hücre canlılığının %10 oranında yitirildiği, 3 ve 4 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda hücre canlılığının %30'a yakın yitirildiğini tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada MTT ile sitotoksisite testinde canlı hücre yoğunlukları 570 nm'de absorbans değerleri hesaplanmıştır. Uygulanan MEL konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. Absorbans değerleri en düşük 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$

konsantrasyonlarında elde edilmiştir (Çizelge 4.1.). Düşük konsantrasyonlarda uygulama süresinin etkili olduğu görülürken, konsantrasyon arttıkça uygulanan zamanın etkili olmadığı ve ilk uygulama zamanından itibaren hücre canlılığının 10 µg/ml’de uygulanan dozdan itibaren aynı oranda azaldığı görülmüştür (Şekil 4.7.). Yaptığımız çalışma Park ve ark.’nın [67] Caki-1 hücreleri ile yaptığı çalışmayla paralellik göstermiş ve U118 hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlarındaki MEL dozlarında 0,5 ve 1 µg/ml’de 3 saatlik uygulamada %20 oranında ve 3µg/ml’de 3saatlik uygulamada %30 oranında hücre canlılığının yitirildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Bu da Melittin’in U118 hücreleri üzerinde daha kısa sürede toksik etki gösterdiğini düşündürmüştür.

TGF-β, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve hücre dışı matriks üretimini düzenleyen çok fonksiyonlu bir sitokindir [68,69]. TGF-β sekresyonun veya sinyalizasyonun düzenlenmesi, kanser ve fibroz da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır. Normal epitel hücrelerinin ve astrositlerin çoğalması için güçlü bir inhibitördür ve bir tümör baskılayıcı faktör olarak düşünülmektedir [70]. TGF-β; hücrelerin büyümesine, invazyonuna ve metastazına katkıda bulunur, kanser vakalarının ilerleyen aşamalarında tümör hücreleri tarafından aktif olarak salgınır ve tümöre karşı konakçı bağışıklık yanıtlarını azaltır. Yapılan çalışmada U118 hücrelerinde MEL’in etkisine ve TGF-β’nın MEL ile aktivitesine bakılmıştır.

TGF-β, yüksek dereceli glioma tarafından üretilen büyük bir sitokindir ve tümör mikro ortamında proteazların düzenlenmesinde etkilidir. Lindholm ve ark. [71] TGF-β’nın fizyolojik koşullar altında beyinde çok düşük bir seviyede eksprese edildiğini ancak ekspresyonun yaralanmadan sonra arttığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada TGF-β proteazının protein düzeyi Western Blotting ile incelenmiştir. Çalışmamızda MEL verilmemiş U118 kontrol grubunda TGF-β düzeyi düşük görülürken MEL’in düşük doz olarak hücreye verilmesiyle TGF-β’nın aktif hale geldiği görülmüştür. MEL’in toksik etkisiyle TGF-β’nın aktivasyonu artmıştır. Ancak uygulama zamanı arttıkça ve MEL’in U118 hücresi üzerindeki toksik etkisi de artarak; TGF-β’nın baskılandığı görülmüştür (Şekil 4.11). Yaptığımız çalışmada TGF-β’nın en fazla 48 saat sonunda ve 3 µg/ml MEL konsantrasyonunda baskılandığı görülmüştür. Uygulanan en yüksek doz olan 3 µg/ml konsantrasyonda ve en yüksek saat olan 48 saatte kontrole göre 0,7 kat düşüş görülmüştür. Uygulanan 0,5 µg/ml konsantrasyondaki MEL’in uygulama süresi arttıkça TGF-β protein düzeyi artmaktadır. Kontrol hücrelerine göre 0,5 µg/ml konsantrasyonda MEL dozlarının 24

saatlik uygulamasında 6,5 kat artış, 48 saatlik uygulamasında 7,5 kat artış görülmüş (Şekil 4.12); ancak artış ve azalışlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Sadece 3 örnekle yapılan Western Blotting deneyi sonucunda böyle bir yorum yapılmaktadır.

TGF- β protein bant yoğunluklarının varyans analizleri hesaplanmıştır. 3, 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonucunda MEL uygulanan hücrelerin bant yoğunluklarının varyans aralığı en geniş aralıkta 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda görülmüş (Şekil 4.13). MEL'in hücrelere uygulanan dozunun artması ile hücrelerinin canlılığını yitirdiği tespit edilmiştir.

MMP'ler, çinko bağımlı enzimler olan endopeptidazları indirgeyen bir protein ailesidir. Bu ailenin 28 üyesi tanımlanmıştır. Bunlar arasında kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilysinler ve membran tipi MMP'ler bulunur [72,73]. MMP-9 ana bir ECM degradasyon proteazıdır ve kanser hücrelerinin migrasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. MMP-9; ECM degradasyonu için exprese olduktan sonra tümör hücrelerinin progresyonu ve invazyonu kolaylaştırır. Literatürde Lein ve ark.'nın [74] yaptığı çalışmada; MMP-9'un aşırı ekspresyonunun renal karsinom hücrelerinin progresyonu ve invazyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Benelli ve ark.'nın [75] yaptığı çalışmada ise; MMP-9 inhibitörlerinin, yeni damar gelişiminde esas olan endotel hücre aktivitelerini bloke ettiğini ve motiliteye ve invazyona yol açtığını göstermişlerdir. Literatürdeki önemli çalışmalardan olan ve MEL'in ECM degradasyonunu önleyerek kanserli hücrede anti-metastaz ve invazyon ajanı olduğunu ortaya koyan ilk çalışma Park ve ark.'nın [67] yapmış olduğu çalışmadır ve MEL'in Caki-1 böbrek kanseri hücrelerinde MMP-9 ekspresyonu ve kanser hücresi invazyonu üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Caki-1 hücreleri arı zehiri, melittin ve apamin ile muamele edilmiş ve sonuç olarak arı zehiri ve melittin ile uyarılan Caki-1 hücrelerinin invazyonun ve migrasyonunu ve bu hücreler tarafından salınan MMP-9'un enzimatik aktivitesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Aynı zamanda MEL'in tümör invazyonunun bastırılmasının renal karsinoma Caki-1 hücrelerinde AP-1 ve NF- κ B'nin inaktivasyonuna atfedilen MMP-9 ekspresyonuna bağımlı olduğunu bulmuşlardır [67]. Yapılan başka bir çalışmada Hagemann ve ark. [76] farklı GBM hücrelerinde MMP proteazlarının protein düzeyinde ifadelerini kıyaslamıştır. MMP-9'un GBM hücrelerinde ifadesinin arttığını ve TNF- α ile TGF- β 'nin MMP-9 ifadesini up regüle ettiğini göstermişlerdir ve hücre yoğunluğu arttıkça MMP-9'un ifadesinin arttığını tespit etmişlerdir [76]. Yaptığımız çalışmada yoğunluk arttıkça MMP-9'un ifadesinin arttığı; ancak MEL'in uygulama süresinin ve dozunun arttıkça MMP-9 protein seviyesinin azaldığı görülmüştür. 48 saat 3 $\mu\text{g/ml}$ Melittin uygulanan hücrelerden

bant görüntüsü alınamamıştır. (Şekil 4.17). Uygulanan en düşük doz 0,5 µg/ml konsantrasyonda ve en yüksek saat olan 48 saatte kontrole göre 0,7 kat artış görülmüştür. Uygulanan 3 µg/ml konsantrasyondaki MEL'in 24 saatlik uygulamasında MMP-9 protein düzeyi kontrol hücrelerine göre 0,8 kat düşüş görülmüştür. (Şekil 4.18). Artış ve azalışlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Bant elde edilen örnekler karşılaştırıldığında en düşük varyans aralığı 24 saat 3 µg/ml konsantrasyonda Melittin uygulanan U118 hücrelerinde, en yüksek varyans aralığı farklı saatlerde 0,5 µg/ml konsantrasyonda uygulanan örneklerde görülmüştür (Şekil 4.19). MEL'in toksik etkisi, uygulanan saat ve doz arttıkça etkili olmuştur ve bu sonuca göre MEL'in MMP-9'un salgılanmasını inhibe ettiği düşünülmüştür. MMP-9'un salgılanmasında MEL'in etkili olduğu doz 3 µg/ml ve zaman 48 saat olarak görülmüştür.

Literatürde Behzadian ve ark.'ı [77] retina endotel hücrelerinde ve Müller glial hücrelerinde TGF-β ve MMP-9 protein ilişkisini araştırmışlardır. Endotel hücrelerinin; büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınması yoluyla enzim ekspresyonunun düzenlenmesinde veya doğrudan hücre-hücre etkileşiminde önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir. Müller hücreleri ya da astrositler ile birlikte kültürlenmiş endotel hücrelerinin MMP-9'u eksprese ettiği için, hücre-hücre iletişiminin TGF-β'yi aktive ettiğini gözlemlemişlerdir. Glial hücre ilişkisi, TGF-β aktivasyonunu ve MMP-9 oluşumunu uyararak endotel hücrelerinin permeabilitesini arttırdığını, hem glial hem de endotel hücreleri latent TGF-β'yı serbest bırakarak TGF-β'yi etkinleştirdiğini; bunun sonucu olarak MMP-9 ekspresyonunu indüklediğini tespit etmişlerdir [77].

MMP-9 sitokinler, büyüme faktörleri veya forbol esterler tarafından uyarıldığı bilinmektedir [78,79]. Yapılan çalışmada, Behzadian ve ark.'nın [77] yaptığı çalışmaya paralel olarak TGF-β ve MMP-9 proteinleri arasında etkileşim olduğu ve bu etkileşim sonucu TGF-β'nin MMP-9 salınımında görevli olduğunu düşündürmektedir. MEL ile hücreler muamele edilmeden önce kontrol hücrelerinde TGF-β ve MMP-9 protein seviyelerinin az olduğu; ancak hücreler MEL ile 0,5 ve 3 µg/ml ve 3 saat muamele edildikten sonra TGF-β'nin artmasıyla MMP-9'un da arttığı görülmüştür. Her iki protein seviyesinin de 3µg/ml konsantrasyonda 48 saat sonunda MEL uygulanmasıyla düştüğü görülmüştür (Şekil 4.11., Şekil 4.17.). Bu sonuca göre yapılan çalışma diğer çalışmalarla paralellik göstererek, TGF-β ve MMP-9 proteinleri arasında etkileşim olduğu ve bu etkileşim sonucu TGF-β'nin MMP-9 salınımında görevli olduğu düşünülmüştür.

21. kromozom uzun kolunda yer alan (21q21.3) ADAMTS-5 genine ADAMTS11 adı da verilmektedir. Gen, 8 ekzondan oluşmaktadır ve 830 aa'lık bir protein kodlamaktadır. ECM yıkımından sorumlu önemli bir proteaz olan ADAMTS-5'in; osteoartrit ve inflamatuvar olaylarında önemli rolü olduğu düşünülmektedir [80]. Ayrıca GBM'de invazyon; hücre dışı matriksi sindiren proteazların artan ekspresyonuna dayanır. Bu davranışlar, hücre dışı matriksin belirli bileşenleri (ECM) ile tümör hücresi etkileşiminin bir sonucu olarak beyin ECM bileşenleri arasında Glikozaminoglikan hiyalüronik asit (HA) hücre proliferasyonunda merkezi bir rol oynar. Bu mekanizmada etkili olan brevikan; HA bağlayıcı proteindir [81,82,83]. Brevikan ifadesi özellikle glial hücre çoğalması ve migrasyon dönemlerinde, merkezi sinir sisteminde gelişimsel olarak düzenlenir. Buna göre, brevikan, cerrahi glioblastomaların büyük çoğunluğunda ve ekspresyon seviyeleri proteolitik olarak upregüle olur [84]. Glioblastomalarda upregüle edilmiş önemli bir hücre dışı proteoglikan olan brevikan, bazı proteazlar tarafından bozunabilir. Literatürde Nakada ve ark.'nın [85] yapmış olduğu bir çalışmada GBM ile normal beyin dokusu kıyaslanmış ve bu çalışmada ilk kez ADAMTS 5'in aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Nakada ve ark.'nın [85] çalışmalarında ADAMTS-5'in, işlevsel olarak brevikanın parçalanması yoluyla glioma invazyonunda rol oynadığını görmüşlerdir. Held-Feint ve ark.'nın [86] yaptığı çalışmada da ADAMTS-5'in GBM'de sekresyonunun arttığını tespit etmişlerdir.

Yapılan çalışmada; farklı doz ve farklı zamanda MEL ile muamele sonucu U118 hücrelerinin protein seviyelerinin kontrol grubu hücrelerine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14). Uygulanan en düşük doz ve en düşük saatte kontrole göre 0,65 kat düşüş görülmüştür. Uygulanan 0,5 µg/ml konsantrasyondaki MEL'in uygulama süresi arttıkça ADAMTS-5 protein düzeyi artmaktadır; ancak kontrol hücrelerine göre 24 saatlik uygulamada 0,5 kat düşüş, 48 saatlik uygulamada 0,2 kat düşüş görülmüştür (Şekil 4.15.). Artış ve azalışlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). 3, 24 ve 48 saatlik, 1 ve 3 µg/ ml konsantrasyonlarda MEL uygulanan hücrelerde ADAMTS-5 protein düzeyinin kontrol hücrelerine ve 0,5 µg/ ml konsantrasyonda MEL uygulanan hücrelere göre düştüğü görülmüştür. 48 saat 3 µg/ml konsantrasyonda MEL uygulanan hücrelerde ADAMTS-5 protein düzeyinin en düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.15).

U118 kontrol hücreleri ve uygulanan 0,5, 1 ve 3 µg/ ml konsantrasyondaki Melittin dozunun uygulanan tüm saatlerdeki ADAMTS-5 proteininin bant yoğunluğuna göre karşılaştırıldığında en düşük varyans aralığı 24 saat uygulanan 0,5 konsantrasyonda Melittin

uygulanan U118 hücrelerinde ve 48 saat uygulanan 1 ve 3 µg/ml konsantrasyonda Melittin uygulanan U118 hücrelerinde görülmüştür. U118 kontrol hücreleri ile farklı dozda ve farklı saatlerde uygulanan ve farklı dozlarda muamele edilen hücrelerin bant yoğunluklarının varyans aralığı birbirine yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.16). Yapılan çalışma Nakada ve ark. [85] ile Held-Feint ve ark.'nın [86] çalışmalarıyla paralellik göstermiş; ADAMTS-5 protein düzeyi kontrol hücrelerinde yüksek görülmüş ve MEL'in hücrelere verilmesiyle ADAMTS-5 protein seviyesinin düştüğü görülmüştür.

GBM hücreleri üzerinde MEL'in toksik etkisi üzerine bir çalışma daha önce yapılmadığından dolayı; bu çalışma ile farklı kanserli hücrelerle yapılmış çalışmalar karşılaştırılmıştır. MEL'in kanserli hücre invazyonunda etkili olan MMP-9 ve ADAMTS-5 proteazları ve TGF-β sitokininin protein seviyelerini düşürmesi nedeniyle GBM hücrelerinin tedavisinde alternatif bir yol olabileceği düşünülmüştür. MEL toksik özelliğinden dolayı ilaç endüstrisinde tek başına yüksek dozda uygulanamayacağından; MEL'in kanserli hücreler üzerinde kontrollü salınımını gösterebileceği başka yapılarla birlikte uygulanabilirliği araştırılmalıdır. Bu yönleriyle çalışmamız bilime katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., Paz-Ares L., Current challenges in cancer treatment, *Clinical Therapeutics*, 38 (7), 1551-1556, **2016**.
- [2] Liu, C.C, Yang, H, Zhang, L.L, Zhang, Q., Chen, B., Wang, Y., Biotoxins for cancer therapy, *Asian Pacific Journal Cancer Prevention* 15, 4753–4758, **2014**.
- [3] Kohno, M., Horibe, T., Ohara, K., Ito, S., Kawakami, K., The membrane-lytic peptides K8L9 and melittin enter cancer cells via receptor endocytosis following subcytotoxic exposure, *Chemistry and Biology*, 21, 1522–1532, **2014**.
- [4] Schweizer F., Cationic amphiphilic peptides with cancerselective toxicity, *European Journal of Pharmacology*, 625, 190–194, **2009**.
- [5] Avgeropoulos, N.G., Batchelor, T.T., New treatment strategies for malignant gliomas, *Oncologist* 4, 209–224, **1999**.
- [6] Paw, I., Carpenter, RC., Watabe, K., Debinski, W., Lo, HW., Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Letters*, 362 (1), 1–7, **2015**.
- [7] Goldbrunner, R.H., Bernstein, J.J., Tonn, J.C., Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion, *Acta Neurochirurgica*, 141, 295–305, **1999**.
- [8] Mentlein, R., Hattermann, K., Held-Feindt, J., Lost in disruption: Role of proteases in glioma invasion and progression, *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1825 (2), 178–185, **2012**.
- [9] Orsolio N., Bee venom in cancer therapy, *Cancer Metastasis*, Review 31, 173–194, **2012**.
- [10] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, DM., Forman, D., Bray, F., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International Journal of Cancer* 136, E359–E386, **2015**.
- [11] Lai, D., Visser-Grieve, S., Yang, X., Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response, *Bioscience Reports*, 32, 361–374, **2012**.
- [12] Liu, C.C., Hao, DJ., Zhang, Q., An, J., Zhao, J.J., Chen, B., Zhang, L.L., Yang, H., Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78, 1113-1130, **2016**.
- [13] Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A.K., Dasgupta, S.C., Giri, B., Anticancer potential of animal venoms and toxins, *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 93–103, **2010**.
- [14] Orsolio, N., Possible molecular targets of bee venom in the treatment of cancer: application and perspectives, *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*, 4, 275–315, **2013**.
- [15] Premratanachai, P., Chanchao, C., Review of the anticancer activities of bee products, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 337–344, **2014**.

- [16] Moreno, M., Giralt, E., Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan, *Toxins*, 7, 1126–1150, **2015**.
- [17] Jeong, Y.J., Shin, J.M., Bae, Y.S., Cho, H.J., Park, K.K., Choe, J.Y., Han, S.M., Moon, S.K., Kim, W.J., Choi, Y.H., Melittin has a chondroprotective effect by inhibiting MMP-1 and MMP-8 expressions via blocking NF-kappaB and AP-1 signaling pathway in chondrocytes, *International Immunopharmacology*, 25, 400–405, **2015**.
- [18] Lee, J.A., Son, M.J., Choi, J., Jun, J.H., Kim, J.I., Lee, M.S., Bee venom acupuncture for rheumatoid arthritis: a systematic review of randomised clinical trials, *British Medical Journal Open*, 4, **2014**, <http://bmjopen.bmj.com/content/4/11/e006140>.
- [19] Son, D.J., Lee, J.W., Lee, Y.H., Song, H.S., Lee, C.K., Hong, J.T., Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds, *Pharmacology & Therapeutics*, 115, 246–270, **2007**.
- [20] Habermann, E., Bee and wasp venoms, *Science* 177:314–322, **1972**.
- [21] Gaijski, G., Garaj-Vrhovac, V., Melittin: A lytic peptide with anticancer properties, *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 36 (2), 697-705, **2013**.
- [22] Do, N., Weindl, G., Grohmann, L., Salwiczek, M., Kokschi, B., Korting, H.C., Schafer-Korting, M., Cationic membrane-active peptides-anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin, *Experimental Dermatology*, 23, 326–331, **2014**.
- [23] Skalickova, S., Heger, Z., Krejcova, L., Pekarik, V., Bastl, K., Janda, J., Kostolansky, F., Vareckova, E., Zitka, O., Adam, V., Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus, *Viruses*, 7, 5428–5442, **2015**.
- [24] Adade, C.M., Oliveira, I.R., Pais, J.A., Souto-Padron, T., Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways, *Toxicon*, 69, 227-239, **2013**.
- [25] Pereira, AV., Gustavo de B., Pinto E.G., Tempone A.G., Orsi, R. de O., Santos D. L.D., Calvi S., Ferreira, R.S. Jr., Pimenta, D.C., Barraviera, B., Melittin induces in vitro death of *Leishmania (Leishmania) infantum* by triggering the cellular innate immune response, *Journal Venomous Animals Toxins Incl Tropical Disease*, 22, 1, **2016**.
- [26] Hait, W.N., Grais, L., Benz, C., Cadman, E.C., Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: henothiazines and melittin, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 14, 202–205, **1985**.
- [27] Jamasbi, E., Ciccotosto, G.D., Tailhades, J., Robins-Browne, R.M., Ugalde, C.L., Sharples, R.A., Patil, N., Wade, J.D., Hossain, M.A., Separovic, F., Site of fluorescent label modifies interaction of melittin with live cells and model membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848, 2031–2039, **2015**.
- [28] Katsu, T., Kuroko, M., Morikawa, T., Sanchika, K., Fujita, Y., Yamamura, H., Uda, M., Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 983, 135–141, **1989**.

- [29] Lee, S.Y., Park, H.S., Lee, S.J., Choi, M.U., Melittin exerts multiple effects on the release of free fatty acids from L1210 cells: lack of selective activation of phospholipase A2 by melittin, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 389, 57–67, **2001**.
- [30] Woodman, N., Pinder, SE., Tajadura, V., Le Bourhis, X., Gillett, C., Delannoy, P., Burchell, J.M., Julien, S., Two E-selectin ligands, BST-2 and LGALS3BP, predict metastasis and poor survival of ER-negative breast cancer, *International Journal of Oncology*, 66, 11802-11807, **2016**.
- [31] Liotta, L.A., Gene products which play a role in cancer invasion and metastasis, *Breast Cancer Research Treatment*, 11, 113–124, **1988**.
- [32] Paduch, R., The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis, *Cell Oncology* 39 (5), 397–410, **2016**.
- [33] Louis, DN., Perry, A., Reifenberger G., The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary, *Acta Neuropathology*, 13, 803–20, **2016**.
- [34] Sheline, G.E., Tumors of the Brain, *Springer-Verlag*, 83–99, **1986**.
- [35] Rao, J.S., Molecular Mechanisms Of Glioma Invasiveness: The Role Of Proteases, *Nature Reviews Cancer* 3, 489-501, **2003**.
- [36] Ostrom, QT., Gittleman, H., Fulop, J., CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012, *Neuro-Oncology*, 17, 441–462, **2015**.
- [37] Lima, FR., Kahn, SA., Soletti, RC., Biasoli, D., Alves, T., Fonseca da A.C., Garcia, C., Romao, L., Brito, J., Holanda-Afonso, R., Faria, J., Borges, H., Moura-Neto, V., Glioblastoma: 528 therapeutic challenges, what lies ahead, *Biochim Biophys Acta*, 1826 (2), 338-349, **2012**.
- [38] Michaelsen, SR., Christensen, IJ., Grunnet, K., Clinical variables serve as prognostic factors in a model for survival from glioblastoma multiforme: an observational study of a cohort of consecutive non-selected patients from a single institution, *BioMedCentral Cancer*,13:402-413, **2013**.
- [39] Stupp, R., Hegi, ME., Mason, WP., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial, *Lancet Oncology*, 10, 459–466, **2009**.
- [40] Urbanska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M., Sysa, P., Glioblastoma multiforme – an overview, *Contemporary Oncology*,18 (5), 307–312, **2014**.
- [41] Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, ME., Westphal, M., Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment, *Journal of Clinical Oncology*, 21, 1624-1636, **2003**.
- [42] Alexander, S., Friedl, P., Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure, *Trends Molecular Medicine*, 18, 13-26, **2012**.

- [43] Vehlow, A., Cordes, N., Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, Reviews on Cancer, 1836, 236-244, **2013**.
- [44] Cordes, N., Meineke, V., Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR) extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells in vitro, *Strahlenther Onkology*. 179, 337-344, **2003**.
- [45] Chintala, S.K., Rao, J.K., Invasion of human glioma: role of extracellular matrix proteins, *Frontiers in Bioscience*, 1, 324-339, **1996**.
- [46] Paulus, W., Baur,., Beutler, A.S., Reeves, S.A., Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins, *Laboratory Investigation*, 75, 819-826, **1996**.
- [47] Nicholson C., Sykova E., Extracellular space structure revealed by diffusion analysis, *Trends Neuroscience*, 21, 207-215, **1998**.
- [48] Novak, U., Kaye, A.H., Extracellular matrix and the brain: components and function, *Journal of Clinical Neuroscience*, 7, 280-290, **2000**.
- [49] Giese, A., Westphal, M., Glioma invasion in the central nervous system, *Neurosurgery*, 39, 235-250, **1996**.
- [50] Mohanam, S., Gladson, C.L., Rao, C.N., Rao, J.S., Biological significance of the expression of urokinase-type plasminogen activator receptors (uPARs) in brain tumors, *Frontiers in Bioscience* 4, 178-187, **1999**.
- [51] Raghu H., Gondi C.S., Dinh D.H., Gujrati M., Rao J.S., Specific knockdown of uPA/uPAR attenuates invasion in glioblastoma cells and xenografts by inhibition of cleavage and trafficking of Notch-1 receptor, *Molecules and Cancer* 10, 130-145, **2010**.
- [52] Levicar N., Strojnik T., Kos J., Dewey R.A., Pilkington G.J., Lah T.T., Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion, *Journal of Neurooncology*, 58, 21-32, **2000**.
- [53] Demchik, L.L., Sameni, M., Nelson, K., Mikkelsen T., Sloane B.F., Cathepsin B and glioma invasion, *International Journal of Development Neuroscience*, 17, 483-494, **1999**.
- [54] Mikkelsen, T., Yan, P.S., Ho, K.L., Sameni, M., Sloane, B.F., Rosenblum, M.L., Immunolocalization of cathepsin B in human glioma: implications for tumor invasion and angiogenesis, *Journal of Neurosurgery*. 83, 285-290, **1995**.
- [55] Sivaparvathi, M., Sawaya, R., Wang, S.W., Rayford, A., Yamamoto, M., Liotta, L.A., Nicolson, G.L., Rao, J.S., Overexpression and localization of cathepsin B during the progression of human gliomas, *Clinical and Experimental Metastasis*, 13, 49-56, **1995**.
- [56] Rempel, S.A., Rosenblum, M.L., Mikkelsen, T., Yan, P.S., Ellis, K.D., Golembieski, W.A., Sameni, M., Rozhin, J., Ziegler, G., Sloane, B.F., Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion, *Cancer Research*, 54, 6027-6031, **1994**.
- [57] Gondi, C.S., Lakka, S.S., Yanamandra, N., Olivero, W.C., Dinh, D., Gujrati, M., Tung, C.H., Weissleder, R., Rao, J.S, Adenovirus-mediated expression of antisense urokinase plasminogen activator receptor and antisense cathepsin B inhibits tumor

- growth, invasion, and angiogenesis in gliomas, *Cancer Reserach*, 64, 4069-4077, **2004**.
- [58] Lakka, S.S., Gondi, C.S., Yanamandra, N., Olivero, W.C., Dinh, D.H., Gujrati, M., Rao, J.S., Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis, *Oncogene*, 23 (27), 4681-4689, **2004**.
- [59] Mohanam, S., Jasti, S.L., Kondraganti, S.R., Chandrasekar, N., Lakka, S.S., Kin, Y., Fuller, G.N., Yung, A.W.K., Kyritsis, A.P., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M., Francis, A.O., Rao J.S., Down-regulation of cathepsin B expression impairs the invasive and tumori-genic potential of human glioblastoma cells, *Oncogene*, 20, 3665-3673, **2001**.
- [60] Nakada, M., Okada Y., Yamashita J., The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion, *Frontiers in Bioscience*. 8 261-269, **2003**.
- [61] Hagemann, C., Anacker, J., Ernestus, R.I., Vince, G.H., A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas, *World Journal of Clinical Oncology*, 10, 67-79, **2012**.
- [62] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochemistry*. 72, 248-254, **1976**.
- [63] Habermann, E., Bee and wasp venom: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science* 177, 314–322, **1972**.
- [64] Wade, D., Boman, A., Wahlin, B., Drain, C.M., Andreu, D., Boman, H.G., Merrifield, R.B., All-D amino acid-containing channel forming antibiotic peptides, *Proceedings of the National Academy of Science of the Unites States of America*, 87, 4761–4765, **1990**.
- [65] Tiago, E.H., Gorini da Veiga, A.B., Arthropod venoms and cancer, *Toxicon*. 57, 497–511, **2011**.
- [66] Son, D.J., Park, M.H., Chae, S.J., Moon, S.O., Lee, J.W., Song, H.S., Moon, D.C., Kang, S.S., Kwon, Y.E., Hong, J.T., Inhibitory effect of snake venom toxin from *Vipera lebetina turanica* on hormonerefractory human prostate cancer cell growth: induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor kappaB, *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 675–683, **2007**.
- [67] Park, J.H., Jeong, Y.J., Park, K.K., Cho, H.J., Chung, I.K., Min, K.S., Kim M., Lee K.G., Yeo J.H., Chang, Y.C., Melittin suppresses PMA-induced tumor cell invasion by inhibiting NF-kappaB and AP-1-dependent MMP-9 expression, *Molecules and Cells*, 29, 209–215, **2010**.
- [68] Jennings, M.T., Pietenpol, J.A., The role of transforming growth factor beta in glioma progression. *Journal of Neurooncology*, 36 (2), 123–140, **1998**.
- [69] Verrecchia, F. and Mauviel, A., Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation, *Journal of Investigation Dermatology*, 118, 211–215, **2002**.
- [70] Seoane J., The TGFBeta pathway as a therapeutic target in cancer, *Clinical Translational Oncology*, 92, 1014–1019, **2008**.

- [71] Lindholm, D., Castren, E., Kiefer, R., Zafra, F., Thoenen, H., Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation, *Journal Cell Biology*, 117, 395-400, **1992**.
- [72] Chambers, A.F., and Matrisian, L.M., Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis, *Journal of The National Cancer Institute*, 89, 260-270, **1997**.
- [73] Stetler-Stevenson, WG., Brown, PD., Onisto M., Levy, AT., and Liotta, L.A., Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues, *The Journal of Biological Chemistry*. 265, 13933-13938, **1990**.
- [74] Lein, M., Jung, K., Laube, C., Hubner, T., Winkelmann, B., Stephan, C., Hauptmann, S., Rudolph, B., Schnorr, D., Loening S.A., Matrix- metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma, *International Journal of Cancer* 85, 801-804, **2000**.
- [75] Benelli, R., Adataia, R., Ensoli, B., Stetler-Stevenson, W.G., Santi, L., Albini, A., Inhibition of AIDS-Kaposi's sarcoma cell induced endothelial cell invasion by TIMP-2 and a synthetic peptide from the metalloproteinase propeptide: implications for an antiangiogenic therapy, *Oncology Research*, 6, 251-257, **1994**.
- [76] Hagemann, C., Anacker, J., Haas, S., Riesner, D., Schömig, B., Ernestus, RI., Vince, GH., Comparative expression pattern of Matrix-Metalloproteinases in human glioblastoma cell-lines and primary cultures, *BioMedCentral Research Notes*, 3, 293, **2010**.
- [77] Behzadian, M.A., Wang X.L., Windsor L.J., Ghaly, N., Caldwell, R.B., , TGF- β Increases Retinal Endothelial Cell Permeability by Increasing MMP-9: Possible Role of Glial Cells in Endothelial Barrier Function, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 853-859, **2001**.
- [78] Cho, H.J., Kang, J.H., Kwak, J.Y., Lee, T.S., Lee, I.S., Park, N.G., Nakajima, H., Magae, J., and Chang, Y.C., Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK- and Ap1-dependent mechanisms, *Carcinogenesis* 28, 1104-1110, **2007**.
- [79] Woo, M.S., Jung, S.H., Kim, S.Y., Hyun, J.W., Ko, K.H., Kim, W.K., and Kim, H.S., Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells, *Biochemistry & Biophysical Research Communications*, 335, 1017-1025, **2005**.
- [80] Bateman, J.F., Rowley, L., Belluoccio, D., Chan, B., Bell, K., Fosang, A.J., Transcriptomics of wild-type mice and mice lacking ADAMTS-5 activity identifies genes involved in osteoarthritis initiation and cartilage destruction, *Arthritis & Rheumatology*, 65, 1547-1560, **2013**.
- [81] Aspberg A, Miura R, Bourdoulous S, Shimonaka M, Heinegrad D, Schachner M, Ruoslahti E, Yamaguchi Y. The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94, 10116-10121, **1997**.

- [82] Seidenbecher, C.I., Smalla, K.H., Fischer, N., Gundelfinger, E.D., Kreutz, M.R., Brevican isoforms associate with neural membranes. *Journal of Neurochemistry*, 83, 738–746, **2002**.
- [83] Gary, S.C., Kelly, G.M., Hockfield, S., BEHAB/brevican: a brain-specific lectican implicated in gliomas and glial cell motility. *Current Opinion Neurobiology*, 8, 576–581, **1998**.
- [84] Gary, S.C., Zerillo, C.A., Chiang, V.L., Gaw, J.U., Gray, G., Hockfield, S., cDNA cloning, chromosomal localization, and expression analysis of human BEHAB/brevican, a brain specific proteoglycan regulated during cortical development and in glioma. *Gene*, 256, 39–147, **2000**.
- [85] Nakada, M., Miyamori, H., Kita, D., Takahashi, T., Yamashita, J., Sato, H., Miura, R., Yamaguchi, Y., Okada, Y., Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican, *Acta Neuropathol*, 110 (3), 239-46, **2005**.
- [86] Held-Feindt, J., Paredes, E.B., Blomer, U., Seidenbecher, C., Stark, A.M., Mehdorn, H.M., Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *International Journal of Cancer*, 118, 55-61, **2006**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Kübra Nur Güven

Doğum Yeri ve Yılı : İstanbul/1985

Medeni Hali : Evli

E-posta : nurguven2@gmail.com.

Adresi : Altınpark Mah. Mahmut Şevket Paşa Cd. No:32/11 Altındağ/Ankara

Eğitim

Lisans : 2003-2007 Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : 2014-2017 Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri

Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Uygulamalı Biyoloji ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : 5,5 (IELTS) Advanced

Almanca : C1 (Vorstudienlergang Uni Wien Dil Sertifikası)

İş Deneyimi

1. Haziran 2007-Eylül 2007 Memorial hastanesi Genetik Tanı Merkezi teknisyeni
2. Mayıs 2014-Aralık 2014 ABM-Business Satış Pazarlama İş Geliştirme Uzmanı

Deneyim Alanları

Memeli hücre kültürü, temel biyokimya protokolleri, gen ekspresyon çalışmaları, real-time PCR, IHC, ELISA, Western Blotting

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 27/11/2017

Tez Başlığı / Konusu:

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 50 sayfalık kısmına ilişkin, 23/11/2017 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %1dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik 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

27/11/2017

Adı Soyadı: Kübra Nur Güven
Öğrenci No: N14124856
Anabilim Dalı: BİYOLOJİ
Programı: UYGULAMALI BİYOLOJİ
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. NEVİN KESKİN