



T.C.

KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**MELİTTİNİN SİSPLATİN DUYARLI VE DİRENÇLİ
MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
ANTİKANSER ETKİLERİ İLE *BRMS1/CTR1* GEN
EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Esmâ SÜMER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR- HAZİRAN/2026



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**MELİTTİNİN SİSPLATİN DUYARLI VE DİRENÇLİ
MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
ANTİKANSER ETKİLERİ İLE *BRMS1/CTR1* GEN
EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Esmâ SÜMER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Habibe Sema ARSLAN ÜNAL

KIRŞEHİR- HAZİRAN/2026

KABUL VE ONAY

“Melittinin Sisplatin Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinde Antikanser Etkileri ile *BRMS1/CTRI* Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi” adlı bu çalışma, 02.06.2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Habibe Sema ARSLAN ÜNAL

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Serdar SARITAŞ

Malatya Turgut Özal Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Elif SEVİM

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Tıp Fakültesi

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde hazırlanarak yapıldığını, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. 02/06/2026

Esmâ SÜMER

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince değerli bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, yapıcı eleştirileri, sabrı ve desteğiyle her zaman yanımda olan danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Habibe Sema ARSLAN ÜNAL'a, katkılarını ve içtenliğini hiç esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN'a; değerli vaktini ayırıp laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Mehmetan YILDIRIM'a hayatımın her döneminde olduğu gibi bu süreçte de yanımda olan, desteğini hiç eksik etmeyen canım arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Gül AKDUMAN'a; yüksek lisans yapma yolunda beni yüreklendiren ve her zaman arkamda duran sevgili eşim Kenan SÜMER'e; varlığıyla bana güç ve umut veren biricik oğlum Kerem'e ve her zaman sevgilerini ve desteklerini hissettiğim canım ailem Yıldız ailesine gönülden teşekkür ederim.

Haziran, 2026

Esma SÜMER

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser ve Moleküler Temelleri.....	5
2.1.1. Kanserin Temel Özellikleri	7
2.1.2. Meme Kanseri: Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	10
2.1.3. Meme Kanseri Türleri ve Sınıflandırması.....	15
2.1.4. MDA-MB Kanser Hücre Hattı.....	18
2.1.5. Meme Kanseri Tedavisinde Kemoterapi ve Direnç Mekanizmaları	19
2.2. Sisplatin: Etki Mekanizması ve Direnç Problemi.....	20
2.3. BRMS1 ve CTR1 Geni.....	25
2.3.1. BRMS1 Geni.....	25
2.3.2. CTR1 Geni	28

2.4. Apiterapi ve Arı Zehri Bileşenleri.....	30
2.5. Amaç ve Hipotezler	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Gereç	37
3.1.1. Hücre Hattı	37
3.1.2. Kimyasal ve Reaktifler.....	38
3.1.3. Makine ve Teçhizat	39
3.2. Metot.....	40
3.2.1. Hücre Hattı ve Kültür Koşulları	40
3.2.2. MDA-MB-231 Hücre Hattına Sisplatin Direncinin Kazandırılması.....	41
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	41
3.2.4. Trypan Mavisi ile Hücre Sayımı	42
3.2.5. Test Maddesinin Temini ve Hazırlanması	43
3.2.6. Melittin Çözelti Hazırlığı ve Doz Hesaplamaları.....	43
3.2.7. Sitotoksosite (XTT) Analizi	44
3.2.8. Hücre Göçü (Wound Healing-Scratch) Analizi.....	46
3.2.9. İnvazyon Analizi	47
3.2.10. Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile Gen Ekspresyon Analizi.....	48
3.2.10.1. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında RNA İzolasyonu.....	48
3.2.10.2. NanoDrop ile İzole Edilen RNA'ların Ölçülmesi	49
3.2.10.3. cDNA Sentezi ve Gen Ekspresyon Analizi.....	50
3.2.11. İstatistiksel Analiz	51

4. BULGULAR	52
4.1. Sitotoksisite Sonuçları	52
4.2. Hücre Göçü Bulguları	53
4.3. İnvazyon Analizi Sonuçları	58
4.4. BRMS1 ve CTR1 Gen Ekspresyon Bulguları	62
4.4.1. BRMS1 Ekspresyon Bulguları	62
4.4.2. CTR1 Ekspresyon Bulguları	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	72
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Hücre döngüsü modeli (13).	6
Şekil 2.2: Kanseri oluşum aşamaları; başlatma, promosyon, progresyon ve metastaz (25)..	7
Şekil 2.3: Kanseri 10 temel özelliği (26).	7
Şekil 2.4: Apoptozis ve Kanseri (29).	9
Şekil 2.5: Her iki cinsiyet ve her yaşta 2022'deki yeni vaka sayısı (5).....	11
Şekil 2.6: Her iki cinsiyet ve her yaşta 2022'deki ölüm sayısı (5)	11
Şekil 2.7: 2020 yılı Türkiye kanseri insidansı (35).	12
Şekil 2.8: 2020 yılında ülkemizde en sık görülen ilk 5 kanseri türü (35).	13
Şekil 2.9: Tüm yaş gruplarında cinsiyete göre en sık görülen kanserlerin yüzde dağılımları (6).	13
Şekil 2.10: Memeinin anatomik yapısı (37).	15
Şekil 2.11: Meme kanseri sınıflandırması (41).	17
Şekil 2.12: MDA-MB-231 hücreleri mikroskop görüntüsü (10X, ışık mikroskobu).	19
Şekil 2.13: Sisplatinin moleküler yapısı ([PtCl ₂ (NH ₃) ₂]) (51).	21
Şekil 2.14: Sisplatin ile oluşan DNA-adduct formları (52).	22
Şekil 2.15: Sisplatinin çeşitli moleküler etki mekanizmaları (55).	24
Şekil 2.16: BRMS1 geninin kromozomal lokalizasyonu (57).	26
Şekil 2.17: BRMS1 geninin farklı insan dokularındaki RNA ekspresyon profili (59).	26
Şekil 2.18: CTR1 geninin kromozomal lokalizasyonu (69).	28
Şekil 2.19: CTR1 geninin farklı insan dokularındaki RNA ekspresyon profili (70).	28

Şekil 2.20: Arı İğnesi/Arı Zehri.	31
Şekil 2.21: Arı zehrinin bileşenleri.	32
Şekil 2.22: Arı zehiri ve melittinin kansere karşı ön görülen etki mekanizmaları (85).	34
Şekil 3.1: MDA-MB-231 hücreleri mikroskop görüntüsü (10X, ışık mikroskobu).	40
Şekil 3.2: Melittinin sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında sitotoksik etkisinin XTT testi ile değerlendirilmesine ait görüntü.	45
Şekil 3.3: Sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında gerçekleştirilen hücre göçü ve invazyon analizlerine ait temsili görüntüler.	47
Şekil 4.1: Melittinin MDA-MB-231 sisplatin duyarlı ve dirençli hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisinin XTT analizi ile değerlendirilmesi (72 saat). IC ₅₀ değerleri sırasıyla 0,89 µM ve 2,1 µM olarak hesaplanmıştır (p <0,01).	53
Şekil 4.2: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattı kontrol grubuna ait (melittin uygulanmamış) yara iyileştirme analizinin sonuçları (A. Kontrol 24. saat; B. Kontrol 48. saat; 10x mikroskop görüntüsü).	54
Şekil 4.33: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattında melittin uygulanmış gruba ait yara iyileştirme analizinin sonuçları (IC ₅₀ : 0,89 µM) (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).	55
Şekil 4.4: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattında melittin uygulanmış gruba ait yara iyileştirme analizinin sonuçları (IC ₅₀ ×2: 1,78 µM) (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).	55
Şekil 4.5: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattı kontrol grubuna ait (melittin uygulanmamış) yara iyileştirme analizinin sonuçları (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).	56
Şekil 4.6: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattında melittin uygulanmış gruba ait yara iyileştirme analizinin sonuçları (IC ₅₀ : 2,1 µM) (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).	57

Şekil 4.7: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattında melittin uygulanmış gruba ait yara iyileştirme analizinin sonuçları ($IC_{50} \times 2$: 4,2 μM) (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).....	57
Şekil 4.8: Melittinin sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon grafiği (* $p < 0,05$). (MDA-MB-231: duyarlı; MDA-MB-231/Kontrol: duyarlı kontrol; MDA-MB-231/R/Kontrol: dirençli kontrol; MDA-MB-231/R: dirençli).	58
Şekil 4.9: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattı kontrol grubuna ait invazyon analizinin sonuçları (48. Saat 10X mikroskop görüntüsü).	59
Şekil 4.10: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattında melittin uygulanmış gruplara ait invazyon analizinin sonuçları (IC_{50} : 0,89 μM (A); $IC_{50} \times 2$: 1,78 μM (B); 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).....	59
Şekil 4.11: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattı kontrol grubuna ait invazyon analizinin sonuçları (48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).....	60
Şekil 4.12: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattında melittin uygulanmış gruplara ait invazyon analizinin sonuçları (IC_{50} : 2,1 μM (A); $IC_{50} \times 2$: 4,2 μM (B); 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).....	60
Şekil 4.13: Melittinin sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon analizi grafiği (* $p < 0,05$).	61
Şekil 4.14: BRMS1 gen ekspresyonuna ait qRT-PCR amplifikasyon eğrileri.....	64
Şekil 4.15: Beta-aktin referans genine ait qRT-PCR amplifikasyon eğrileri.	64
Şekil 4.16: BRMS1 gen ekspresyonunun 24 saat sonunda sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde karşılaştırılması.	65
Şekil 4.17: BRMS1 gen ekspresyonunun 48 saat sonunda sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde karşılaştırılması.	66
Şekil 4.18: CTR1 gen ekspresyonuna ait qRT-PCR amplifikasyon eğrileri.	68
Şekil 4.19: CTR1 gen ekspresyonunun 24 saat sonunda sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde karşılaştırılması.	68

Şekil 4.20: CTR1 gen ekspresyonunun 48 saat sonunda sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde karşılaştırılması.	69
Şekil 4.21: qRT-PCR analizine ait türev (derivative) erime eğrisi grafiği.	70
Şekil 4.22: qRT-PCR analizine ait normalize edilmiş erime eğrisi grafiği.	71

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: MDA-MB-231 hücre hattına ait temel özellikler.	37
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasal, reaktif ve kitler.	38
Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar.	39
Tablo 3.4: Melittin dozlarına ait stok ve çalışma konsantrasyonları.	44
Tablo 3.5: XTT testi sonucu oluşturulan deney grupları.....	46
Tablo 3.6: BRMS1 ve CTR1 genlerine ait primerler.	51
Tablo 4.1: Sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında BRMS1 genine ait relatif ekspresyon sonuçları.	63
Tablo 4.2: Sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında CTR1 genine ait relatif ekspresyon sonuçları.	67

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler : Açıklama

p : Olasılık değeri (istatistiksel anlamlılık düzeyi)

p<0,05 : İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı

μL : Mikrolitre

Kısaltmalar : Açıklama

BRMS1 : Meme Kanseri Metastaz Baskılayıcı 1

BRMS1L : BRMS1 Benzeri Protein (*Breast Cancer Metastasis Suppressor 1-Like*)

BV : Arı Zehri (*Bee Venom*)

CTR1 : Bakır Taşıyıcı 1 (*Copper Transporter 1*)

DCIS : İn Situ Duktal Karsinom

DSÖ (WHO) : Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization*)

ER : Östrojen Reseptörü

FAK : Fokal Adezyon Kinaz

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

GETAT : Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp

HER2 : İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

IC₅₀ : Yarı Maksimal İnhibitör Konsantrasyon

IARC : Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (UKAA)

IDC : İnvaziv Duktal Karsinom

ILC : İnvaziv Lobüler Karsinom

IL-17 : İnterlökin-17

LCN2 : Lipokalin-2

MDA-MB-231 : İnsan Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücre Hattı

MMP : Matriks Metalloproteinazlar

NES	:	Nükleer İhracat Sinyali
NLS	:	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
PR	:	Progesteron Reseptörü
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
TNBC	:	Üçlü Negatif Meme Kanseri (<i>Triple-Negative Breast Cancer</i>)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melittinin Sisplatin Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinde Antikanser Etkileri ile *BRMS1/CTR1* Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Esma SÜMER

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Habibe Sema ARSLAN ÜNAL

Meme kanseri, özellikle üçlü negatif alt tipi ile yüksek metastatik potansiyel ve kemoterapiye direnç geliştirme eğilimi nedeniyle tedavisi güç maligniteler arasında yer almaktadır. Sisplatin gibi platin bazlı kemoterapötik ajanlar etkin olmakla birlikte, zamanla gelişen direnç mekanizmaları tedavi başarısını sınırlamaktadır. Bu nedenle, daha etkili ve daha az toksik alternatif veya tamamlayıcı tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda, bal arısı (*Apis mellifera*) zehrinin ana bileşeni olan ve biyolojik olarak aktif bir peptit yapısına sahip melittinin antikanser potansiyeli dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, melittinin sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerindeki antikanser etkileri ile *BRMS1* ve *CTR1* gen ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *BRMS1* geninin metastazı baskılayıcı rolü ve *CTR1* geninin sisplatin hücre içi taşınmasında kritik bir düzenleyici olması nedeniyle bu genler hedef olarak seçilmiştir. Hücre canlılığı XTT yöntemi ile değerlendirilmiş; hücre göçü yara iyileştirme analizi ile, invazyon kapasitesi ise invazyon analizi ile incelenmiştir. Gen ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, melittinin her iki hücre hattında da doza

bağlı olarak belirgin sitotoksik etki oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca melittin uygulamasının hem sisplatin duyarlı hem de dirençli hücrelerde hücre migrasyonunu ve invazyon kapasitesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu bulgular, melittinin metastatik süreçler üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Gen ekspresyon analizleri değerlendirildiğinde, melittin uygulamasının *BRMS1* gen ekspresyonunu özellikle sisplatin duyarlı hücrelerde anlamlı düzeyde artırdığı ($p<0,05$), sisplatin dirençli hücrelerde ise doz ve uygulama koşullarına bağlı olarak değişken yanıtlar oluşturduğu (bazı gruplarda $p>0,05$) gözlenmiştir. *CTR1* gen ekspresyonunda ise melittin uygulamasının özellikle sisplatin duyarlı hücrelerde yüksek dozlarda belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı artışlara yol açtığı ($p<0,05$), buna karşın dirençli hücrelerde ekspresyon yanıtının heterojen olduğu ve çoğu koşulda istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Sonuç olarak, melittinin yalnızca sitotoksik etki göstermekle kalmayıp aynı zamanda hücre göçü ve invazyonu anlamlı düzeyde baskılayarak antimetastatik potansiyel sergilediği ve *BRMS1/CTR1* gen ekspresyonu üzerinden moleküler düzeyde etkiler oluşturabileceği ortaya konulmuştur. Bu durum, melittinin hücre içi ilaç taşınımı ve dolayısıyla kemoterapi yanıtı üzerinde düzenleyici bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, melittinin özellikle sisplatin direncinin aşılmasına yönelik geliştirilecek yeni tedavi stratejilerinde potansiyel bir yardımcı ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Haziran 2026, 112 Sayfa.

Anahtar Kelimeler: BRMS1, CTR1, Melittin, Meme Kanseri, Sisplatin Direnci

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

Evaluation of the Anticancer Effects of Melittin and *BRMS1/CTR1* Gene Expression in Cisplatin-Sensitive and Cisplatin-Resistant MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

Esma SÜMER

Kırşehir Ahi Evran University

Institute of Health Sciences

Department of Medical Biology

Supervisor: Assistant Professor Habibe Sema ARSLAN ÜNAL

Breast cancer, particularly the triple-negative subtype, is among the malignancies that are difficult to treat due to its high metastatic potential and tendency to develop resistance to chemotherapy. Although platinum-based chemotherapeutic agents such as cisplatin are effective, resistance mechanisms that develop over time limit treatment success. Therefore, there is a need for more effective and less toxic alternative or complementary therapeutic approaches. In this context, melittin, the main component of honeybee (*Apis mellifera*) venom and a biologically active peptide, has attracted attention due to its anticancer potential. In this study, the anticancer effects of melittin on cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant MDA-MB-231 breast cancer cell lines, as well as its effects on *BRMS1* and *CTR1* gene expression, were investigated. These genes were selected because of the metastasis-suppressing role of *BRMS1* and the critical regulatory function of *CTR1* in intracellular cisplatin transport. Cell viability was evaluated using the XTT assay; cell migration was assessed by the wound healing assay, and invasion capacity was analyzed by the invasion assay. Gene expression levels were determined using the qRT-PCR method. The obtained

results showed that melittin exerted a pronounced dose-dependent cytotoxic effect in both cell lines. In addition, melittin treatment significantly reduced cell migration and invasion capacities in both cisplatin-sensitive and resistant cells ($p < 0.05$). These findings indicate that melittin has a suppressive effect on metastatic processes. When gene expression analyses were evaluated, melittin treatment was observed to significantly increase *BRMS1* gene expression, particularly in cisplatin-sensitive cells ($p < 0.05$), whereas variable responses were observed in cisplatin-resistant cells depending on dose and treatment conditions (in some groups, $p > 0.05$). In terms of *CTR1* gene expression, melittin treatment led to a marked and statistically significant increase, especially at higher doses in cisplatin-sensitive cells ($p < 0.05$). In contrast, the expression response in resistant cells was heterogeneous, and in most conditions did not reach statistical significance ($p > 0.05$). In conclusion, melittin was shown not only to exert cytotoxic effects but also to significantly suppress cell migration and invasion, thereby demonstrating anti-metastatic potential, and to exert molecular-level effects through *BRMS1/CTR1* gene expression. This suggests that melittin may play a regulatory role in intracellular drug transport and, consequently, in the chemotherapeutic response. These findings indicate that melittin may be considered a potential adjunct agent in the development of new therapeutic strategies aimed at overcoming cisplatin resistance.

June 2026, 112 Pages.

Keywords: Breast Cancer, BRMS1, Cisplatin Resistance, CTR1, Melittin

1. GİRİŞ

Kanser hem dünya genelinde hem de Türkiye'de genç yaş ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir. Biyolojik temelleri henüz tam olarak aydınlatılamamış, çok faktörlü ve karmaşık bir hastalık grubunu temsil etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, kanseri “anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak vücudun hemen her organ veya dokusunda başlayabilen, komşu dokuları istila edebilen ve/veya uzak organlara yayılabilen bir hastalıklar bütünü” olarak tanımlamaktadır (1).

Kanserin temelinde ve gelişiminde hücre DNA'sında meydana gelen genetik mutasyonlar yer almaktadır. Bu mutasyonlar hücre büyüme ve kontrol mekanizmalarını bozar, böylece hücreler tümör adı verilen yapılar oluşturur. Bu yapılar, çoğalma yeteneklerini kaybetmeden çevre dokulara yayılabilir, hatta metastaz yoluyla uzak organları da istila edebilir hale gelebilirler (2,3).

Kanser iç ve dış etkenlere bağlı multifaktöriyel bir hastalıktır. Yaş, cinsiyet, kalıtım, ırk ve bağışıklık iç etkenler olup değiştirilememektedir. Dış etkenler ise değiştirilebilir etkenler olup sigara ve alkol kullanımı, coğrafi bölgeler, stres, radyasyona maruz kalma, beslenme alışkanlıkları, virüsler vb. sebepleri kapsamaktadır. Bu nedenle kanser, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu gelişen en yaygın ölüm nedenlerinden biridir (4).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansına (UKAA, International Agency for Research on Cancer [IARC], 2022) göre, 2022 yılında dünya genelinde yaklaşık 20 milyon yeni kanser vakası görülmüş ve 9,7 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Tahminler, yaklaşık her beş bireyden birinin yaşamı boyunca kansere yakalandığını, her dokuz erkekte birinin ve on iki kadından birinin bu hastalık nedeniyle öldüğünü göstermektedir. Aynı yıl içinde, küresel düzeyde akciğer kanseri en sık teşhis edilen kanser olup küresel olarak tüm kanserlerin %12,4'ünden sorumlu tutulmakta; bunu kadınlarda %11,6 oranıyla meme kanseri izlemektedir (5).

Türkiye'de kanser sıklığı erkeklerde küresel ortalamanın üzerinde, kadınlarda ise görece daha düşük seyretmektedir. Kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir ve tanı konulan her dört kadından biri bu hastalıkla karşı karşıya kalmaktadır (6). Hastalık, çoğu zaman belirti vermeden ilerlediğinden vakalar genellikle rutin tarama testleri sırasında teşhis edilmektedir. Erken teşhis, hastalığın seyri ve sağkalım oranı açısından kritik öneme sahiptir (7).

Meme kanserine ilişkin en eski kayıtlar M.Ö. 1500 yılına kadar uzanmakta olup, bu hastalığın antik çağlardan beri var olduğu anlaşılmaktadır (8). Günümüzde ise yüksek gelirli ülkelerde görülme sıklığı düşük gelirli ülkelere göre daha fazladır (9).

Uygulanan tedavi stratejileri; tümörün tipi, evresi, metastaz durumu ve hastanın genel sağlık durumu gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Cerrahi müdahale, radyoterapi, hormon tedavisi ve kemoterapi en yaygın tedavi yöntemleridir (10). Kemoterapi, özellikle yayılma riski taşıyan hücreleri hedef almak amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir. Sisplatin gibi platin bazlı ajanlar, DNA üzerinde çapraz bağlar oluşturarak hücrelerde apoptotik yanıtı tetikler. Ancak, bu ajanın terapötik etkisine karşı gelişen direnç ve yüksek düzeyde toksisite (özellikle böbrek ve karaciğer hasarı) kullanımı sınırlayan önemli dezavantajlardandır (4, 11).

Tedaviye direnç geliştiren meme kanseri hücreleri, geleneksel kemoterapötik ajanların etkinliğini azaltmakta ve bu durum, daha az toksik yeni tedavi alternatiflerine olan ihtiyacı artırmaktadır (12). Bu kapsamda, doğal kaynaklı bileşiklerin potansiyel terapötik etkileri dikkat çekmektedir. Özellikle çalışmamızın odak noktası olan arı zehri (Bee Venom-BV) bileşenlerinden melittin, seçici sitotoksik özellikleri sayesinde çok sayıda çalışmada umut verici bir antikanser ajan olarak öne çıkmıştır.

Son yıllarda, kemoterapötik ilaçlarla doğal moleküllerin birlikte kullanımı yaygınlaşmış ve bu kombinasyonların sinerjik etkilerinin hem tedavi edici etkisini artırabileceği hem de yan etkileri azaltabileceği gösterilmiştir (13). Örneğin, Nusair ve ark. [14] çalışmasında, arı zehrinin sık kullanılan bir kemoterapik ajan olan sorafenib ile kombinasyonunun potansiyel antikanser etkisi araştırılmıştır. BV'nin apoptotik ve otofajik mekanizmaların indüklenmesi

yoluyla Sorfun HepG2 hücreleri üzerindeki antikanser etkisini sinerjik olarak güçlendirdiği rapor edilmiştir.

2023 yılında Yan ve ark. [15] yapmış olduğu kastrasyona dirençli (testosteron seviyelerinin düşürülmesine rağmen hastalığın ilerlemeye devam etmesi) prostat kanseri üzerinde yapılmış çalışma ile melittinin, interlökin-17 (IL-17) sinyal yolu geni Lipokalin-2'yi (LCN2) baskılanması yoluyla sisplatin duyarlılığını artırdığı görülmüştür. Benzer şekilde, Ertlav ve ark. [16] glioblastoma hücrelerinde melittinin sisplatinin apoptotik ve oksidan etkilerini güçlendirdiğini göstermiştir. Bu bağlamda, melittin ile kemoterapi ajanlarının birlikte kullanımı ilaç direncini azaltma ve tümör progresyonunu engelleme açısından önemli bir araştırma konusu olmaktadır.

Bu bulgular ışığında, bu tez çalışmasının amacı; doğal bir biyolojik ajan olan melittinin, sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231, MD Anderson-Metastatik Meme- 231), üzerindeki moleküler etkilerini araştırmaktır. Bu kapsamda, melittinin *BRMS1* (Breast Cancer Metastasis Suppressor 1) ve *CTR1* (Copper Transporter 1) genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri değerlendirilerek, metastazın baskılanması ve sisplatin alımının düzenlenmesiyle ilişkili olası mekanizmalar ortaya konulmuştur. Çalışma sonucunda, melittinin sisplatine dirençli hücrelerde tedaviye duyarlılığı artırıp artırmadığı da analiz edilerek, daha etkili ve daha az toksik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sunması hedeflenmektedir.

BRMS1 geni, özellikle metastatik süreci baskılayıcı etkisiyle bilinen bir tümör baskılayıcı gendir. Yapılan çalışmalar, bu genin ekspresyonunun azaldığı durumlarda meme kanseri hücrelerinin daha yüksek metastatik potansiyel sergilediğini göstermektedir. Dolayısıyla, *BRMS1*'in ekspresyon düzeyleri, metastatik kapasite ve hastalığın kötü prognozuyla yakından ilişkilidir (17).

CTR1 ise sisplatin gibi platin bazlı kemoterapötik ajanların hücre içine taşınmasında görev alan anahtar bir taşıyıcı proteinlerden biridir. Bu genin ifade düzeyinin azalması, sisplatinin hücre içine girişini kısıtlayarak kemoterapiye karşı direnç gelişimine neden olabilmektedir. Bu durum, özellikle sisplatine dirençli meme kanseri hücre hatlarında tedaviyi zorlaştıran kritik bir sorundur (18).

Bu iki genin çalışmada seçilme nedeni, birinin tümör metastazını baskılayan, diğeri ise kemoterapötik ilaç alımını belirleyen temel mekanizmalarda görev almasıdır. Bu zellikler, kanser tedavisinde hem tümör yayılımını nleme hem de kemoterapötik etkinliğı artırma açısından önemli bir araştırma alanı sunmaktadır. Ayrıca, *BRMSI* ve *CTRL* genlerinin birlikte değeriendirilmesi, kanser hücrelerinin invaziv kapasiteleri ve ilaç yanıtı arasında moleküler düzeyde bir köprü kurarak; hedefe yönelik ve bireyselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Böylece elde edilecek bulguların, özellikle l negatif meme kanserinde doğal kaynaklı ajanların kemoterapiyle birlikte kullanımına yönelik deneysel kanıtların güçlendirilmesine katkı sağlayabileceğı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Moleküler Temelleri

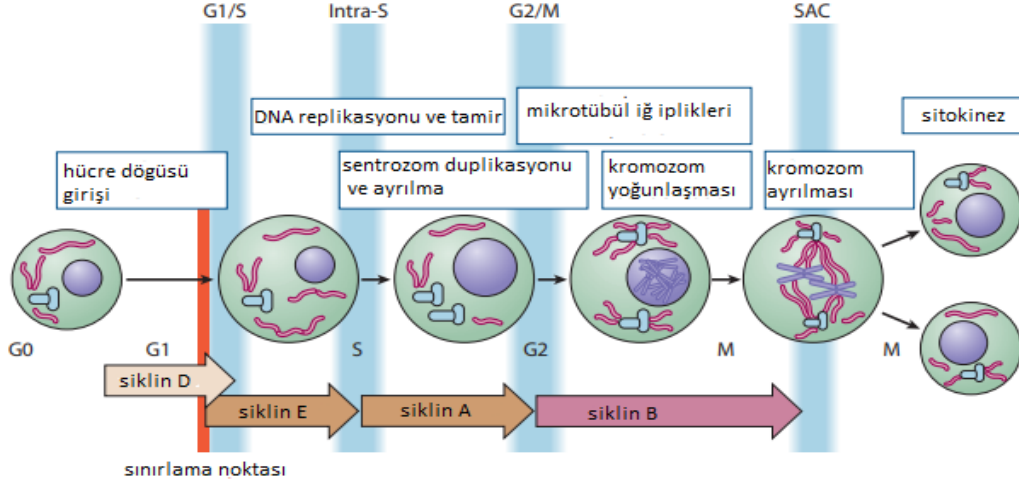
Kanser, genetik materyalde ve bu materyalin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişikliklerle karakterize edilen karmaşık bir hastalık grubudur. Bu değişikliklerin büyük kısmı, “mutasyon” olarak tanımlanan kalıcı genetik değişimlerle ilişkilidir (19).

İnsan vücudunda her saniye, birçok hücrede genetik mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu mutasyonların büyük çoğunluğu, DNA tamir mekanizmaları tarafından tanınarak düzeltilmektedir. Düzeltilemeyen mutasyonlar, hücre döngüsünün düzenlenmesini bozabilir. Böylece hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına ve sonuç olarak tümörlerin gelişimine neden olabilir (19).

İnsan sağlığına etkileri açısından değerlendirildiğinde, kanserler benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Benign tümörler, normal dokulara benzer yapıda olan; büyüme kabiliyeti düşük, metastaz yapmayan ve tekrarlama riski düşük lezyonlardır. Malign tümörler ise oldukça agresif özelliklere sahip, hızlı çoğalan, uzak noktalara metastaz yapabilen ve nüks etme eğiliminde olan kötü huylu tümörlerdir ve tüm malign tümörler kanser olarak nitelendirilmektedir. (2, 20).

Álvarez-Fernández [21], hücre döngüsünü, hücresel canlılığın devam etmesi için en önemli olaylardan biri olan DNA replikasyonunun, replikasyon öncesi ve esnasına kadar hücresel bileşenlerin iki katına çıkarıldığı, bunun sonucunda da hücre bölünmesinin gerçekleştiği süreçler zinciri olarak tanımlamıştır (Şekil 2.1). Hücreler temel olarak bölünme için iç ya da dış bir sinyal almadığı sürece G0 aşamasında sessiz (dinlenme fazı) olarak bekletilirler. Bu aşamada hücre biyokimyasal olarak aktiftir. Sinyal alımı gerçekleştiğinde hücre hacimce büyüdüğü ve genetik materyalin kopyalanması için gerekli materyallerin sentezlendiği G1 fazına geçer. DNA kopyalanmadan önce, hücrede RNA ve protein sentezi artmakta ve

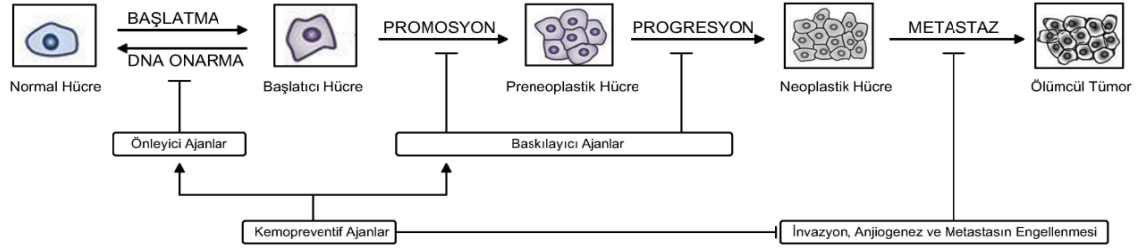
proteinlerin artması sonucu hücresel hacim iki katına çıkmaktadır. Bu evre G1 evresi olarak bilinmektedir. Burada DNA replikasyonundan önce hazırlık evresi söz konusudur (21).



Şekil 2.1: Hücre döngüsü modeli (13).

Normal hücrelerde DNA hasarı olduğunda, hücre siklusunu baskılayan bir protein tarafından genomik kararlılık sağlanır, hücre siklusu G1 'de inhibe edilir ve hücreye tamir için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptozise gider (22). DNA tamir genlerinde bir mutasyon oluştuğunda hücreler bir yandan bölünmeye devam ettiği için tümör baskılayıcı fonksiyonlarında kayıp olurken diğer yandan hücreler onkojenik fonksiyon sergilemektedir (23, 24).

Kanser oluşumunun ilk aşaması mutasyonla gerçekleşen ve başlangıç aşaması olarak bilinen inisiyasyon aşamasıdır. Bu aşamayı sırasıyla promosyon, progresyon, invazyon ve metastaz takip etmektedir (Şekil 2.2) (25).



Şekil 2.2: Kanser oluşum aşamaları; başlatma, promosyon, progresyon ve metastaz (25).

2.1.1. Kanserinin Temel Özellikleri

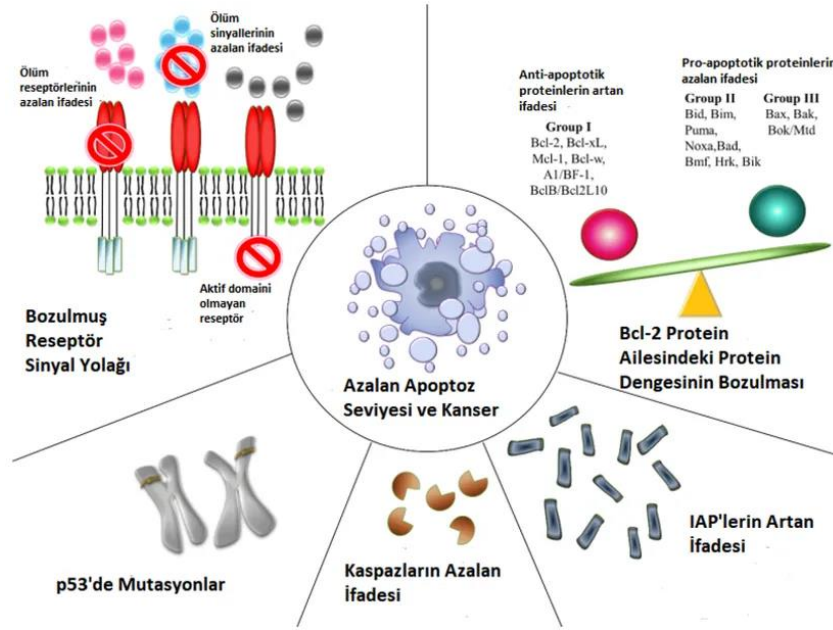
Kanserin gelişimi, normal hücrelerin fizyolojik kontrol mekanizmalarındaki bozulmaların bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu süreç, belirli biyolojik yeteneklerin kazanılmasıyla karakterizedir. Hanahan ve Weinberg [26] tarafından tanımlanan bu yetenekler, “kanserin temel özellikleri (hallmarks of cancer)” olarak adlandırılır. Bu kavram, tümör gelişiminin ardındaki ortak mekanizmaları açıklamak için evrensel bir çerçeve sunar. Şekil 2.3’te kanserin bu temel özellikleri şematik olarak gösterilmektedir. Aşağıda bu özelliklerin her biri kısaca açıklanmıştır.



Şekil 2.3: Kanserinin 10 temel özelliği (26).

- Sürekli Proliferatif Sinyal Sağlama: Kanser hücreleri, büyüme faktörlerine bağımlı olmadan çoğalmaya devam eder. Bu, büyüme sinyallerinin aşırı üretimi ya da sinyal yollarındaki mutasyonlarla gerçekleşir
- Büyüme Baskılayıcı Sinyallere Direnç: Normalde hücre döngüsünü durduran genler (örneğin RB ve TP53), kanser hücrelerinde etkisiz hale gelir ve bu da hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olur
- Bağışıklık Sisteminden Kaçış: Normalde bağışıklık sistemi tümör hücrelerini tanıyıp yok eder. Ancak kanser hücreleri, hayatta kalabilmek için konağın bağışıklık tepkisinden kaçır
- Sınırsız Replikatif Potansiyel: Normal hücreler sınırlı sayıda bölünürken, kanser hücreleri telomeraz enzimi sayesinde bu sınırı aşar ve “ölümsüzlük” kazanır
- Anjiyogenezi İndükleme: Tümörler, büyüebilmek için kendi kan damarlarını oluşturarak besin ve oksijen ihtiyacını karşılar. Bu süreçte *VEGF* gibi faktörler önemli rol oynar
- İnvazyon ve Metastaz: Metastaz, primer tümörden köken alan hücreler tarafından çevredeki konak dokuya lokal invazyon ile başlamaktadır. Tümör hücreleri dokuları istila ederek kan veya lenf damarlarına girer ve bu damar yoluyla uzak organlara yayılır. Bu özellik, kanserin ölümcül olmasındaki temel nedenlerden biridir
- Tümör Mikroçevresini Değiştirme (İnflamasyon ve Destekleyici Hücreler): Kanser, çevresindeki stromal hücreleri, bağışıklık hücrelerini ve damarları manipüle ederek kendine destekleyici bir mikroçevre oluşturur
- Genomik Dengesizlik ve Mutasyonların Birikimi: Kanser hücreleri, DNA onarım mekanizmalarının bozulmasıyla daha fazla mutasyon biriktirir. Bu durum, evrimsel olarak daha avantajlı varyantların seçilmesine yol açar
- Enerji Metabolizmasında Yeniden Programlama: Kanser hücreleri, Warburg etkisi olarak bilinen şekilde, oksijen varlığında bile glikolizi tercih eder. Bu sayede yapı taşlarını sentezleyerek hızlı büyümeyi sürdürür
- Programlanmış Hücre Ölümünden Kaçış: Hücre intiharı olarak bilinen apoptoz, “programlanmış hücrenin temel hücre kontrol süreci kuralsız hale geldiğinde harekete geçen ölüm” olarak adlandırılmaktadır. Kanser hücreleri DNA hasarı ya da

stres durumlarında bile apoptozdan kaçabilir (Şekil 2.4). Bu özellik, onların hayatta kalma ve tedaviye direnç kazanma yeteneğini artırır (26, 27, 28).



Şekil 2.4: Apoptozis ve Kanser (29).

Kanser, genetik mutasyonların neden olduğu anormal ve kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen hastalıklar topluluğudur (30). Bu genetik hasar, hücre çoğalmasını destekleyen proto-onkogenlerde, hücre çoğalmasını baskılayan tümör baskılayıcı genlerde, programlanmış hücre ölümünü düzenleyen genlerde ve gen replikasyon hatalarını onaran DNA tamir genlerinde meydana gelmektedir. Proto-onkogenler, normal hücrelerde büyüme ve farklılaşmayı düzenleyen genlerdir. Bir proto-onkogen, mutasyona uğradığında aktivasyon kazanırsa onkogen adını almaktadır. Tümör baskılayıcı genler (örneğin *TP53* ve *RB*) ise, hücre büyümesini regüle ederek tümör gelişimini önleyen genlerdir. Bu genlerin mutasyonlar sonucu heterozigot olma durumunu kaybetmesi; kontrolsüz hücre çoğalmasına, anormal hücre büyümesine ve apoptozise sebebiyet vermektedir. DNA tamir genleri, replikasyon sırasında DNA polimerazın kusurlu bir baz eklediği an hatalı baza müdahale edip düzeltmekten sorumludur. Bu genlerdeki mutasyonlar, mikrosatellit instabilitesi olarak bilinen genomik kararsızlığa neden olabilir. Tümör gelişimine katkı sağlayan bir diğer mekanizma ise, telomeraz aktivitesinin artmasıyla hücrelerin bölünme sınırının ortadan

kalkması ve böylece tümör hücrelerinin “ölümsüzlük” kazanmasıdır (13). Bu tür değişikliklerin birikimiyle birlikte tümör oluşumu ve gelişimi kaçınılmaz hale gelmektedir.

Tümör baskılayıcı veya onkogenlerdeki mutasyonlar ise bir fonksiyon kaybı veya kazanımı şeklinde ortaya çıkar ve bu anormal gen ekspresyonları kanserin başlangıcı ve progresyonu ile doğrudan ilişkilidir. Mutasyonlar gibi yalnızca genetik değişiklikler değil, epigenetik düzenlemelerin de gen ekspresyonunu etkileyerek genetik değişiklikleri tetikleyebileceği ve tümörün başlangıcı ile ilerlemesine katkı sağlayabileceği öne sürülmüştür (31).

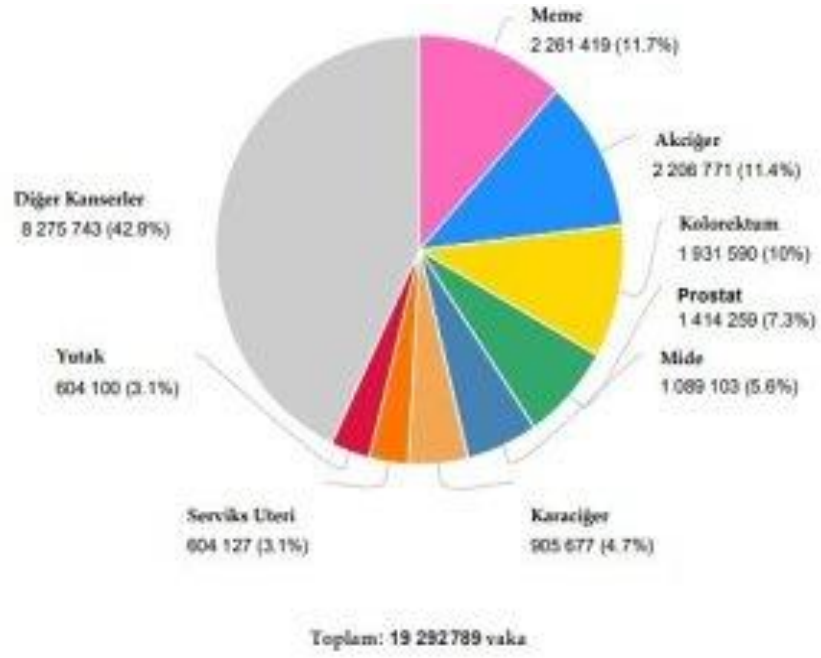
‘Epigenetik’ terimi 1940’ların başında geleneksel genetik mekanizmalarla tam olarak açıklanamayan olayları tanımlamak için ortaya atılmıştır (32). Epigenetik, DNA’nın orijinal diziliminde herhangi bir değişiklik olmaksızın, kromatin aracılı DNA şablon düzenlemesini içeren bir dizi biyolojik süreç olarak tanımlanır. Bu süreçler arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yeniden şekillenmesi yer alır. Ancak bu mekanizmaların anormalleşmesi, gen fonksiyonunun bozulmasına veya susturulmasına yol açarak tümör oluşumunu kolaylaştırabilir (33).

Sonuç olarak, kanserin moleküler temelleri yalnızca genetik mutasyonlarla sınırlı değildir; epigenetik düzenlemeler de gen ekspresyonunun değişmesine neden olarak tümör gelişiminde kilit rol oynar. Dolayısıyla, kanserin genetik ve epigenetik düzeyde anlaşılması, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir (34).

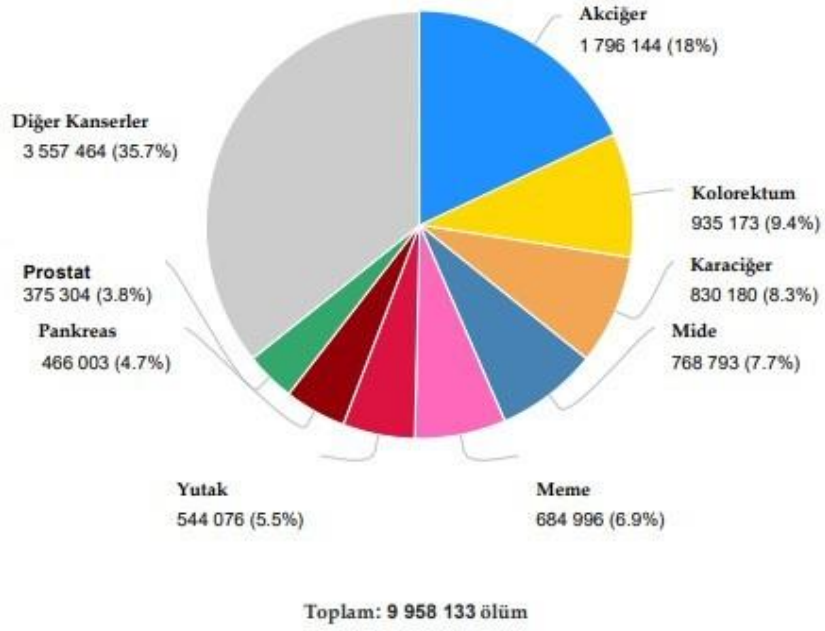
2.1.2. Meme Kanseri: Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Kanser, 21. yüzyılda önemli bir halk sağlığı ve ekonomik sorun olup, dünya genelinde ölümlerin yaklaşık her altısından birinden (%16,8) ve bulaşıcı olmayan hastalıklara bağlı ölümlerin yaklaşık her dördünden birinden (%22,8) sorumludur.

GLOBOCAN (2022) verilerine göre, 2050 yılında 35 milyondan fazla yeni kanser vakası öngörülmektedir; bu rakam 2022 yılındaki 20 milyon tahmini vakaya göre %77’lik bir artışa denk gelmektedir (5). Şekil 2.5 ve Şekil 2.6’da 2022 yılında dünyada her iki cinsiyet için yeni kanser vakası ve ölüm oranları gösterilmiştir.



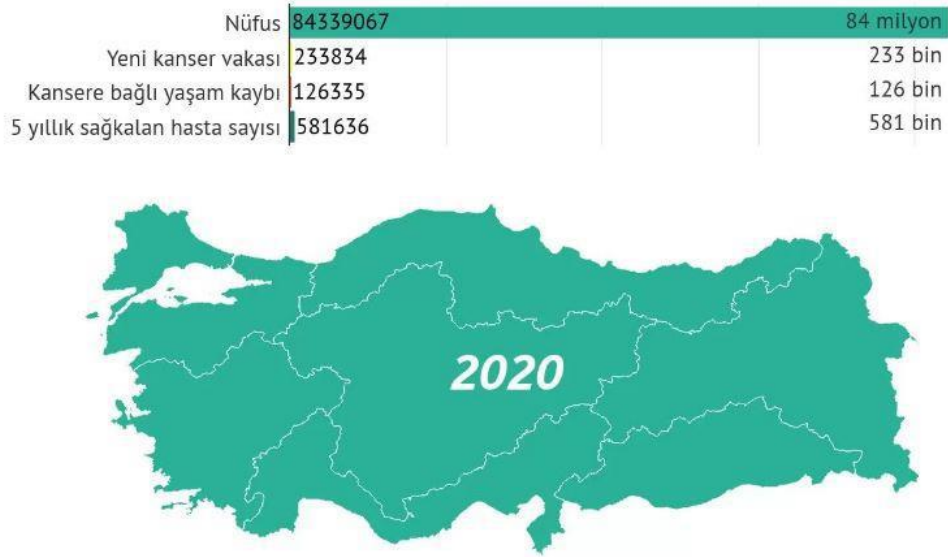
Şekil 2.5: Her iki cinsiyet ve her yaşta 2022'deki yeni vaka sayısı (5).



Şekil 2.6: Her iki cinsiyet ve her yaşta 2022'deki ölüm sayısı (5).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2022 yılının sonunda yayınladığı verilerde yaklaşık 20 milyon kişinin kanser hastası olduğu ve 9,7 milyon kişi kanser nedeniyle yaşamını yitirmiştir. Kadın bireylerde 2.296.840 kişiye meme kanseri teşhisi konulduğu belirtilmiştir. Tahminler, yaklaşık beş erkek veya kadından birinin yaşamı boyunca kansere yakalandığını, buna karşılık dokuz erkekten birinin ve on iki kadından birinin bu hastalık nedeniyle öldüğünü göstermektedir. Küresel düzeyde akciğer kanseri en sık teşhis edilen tür olup (%12,4), bunu meme kanseri (%11,6), kolorektal (%9,6), prostat (%7,3) ve mide kanseri (%4,9) izlemektedir (1).

Türkiye’de kanser sıklığı erkeklerde küresel ortalamanın üzerinde, kadınlarda ise görece daha düşüktür. T.C. Sağlık Bakanlığı (2020) verilerine göre, 2020 yılında Türkiye nüfusu 84.339.067 olup, yıllık yeni kanser vaka sayısı 233.834 ve kansere bağlı ölüm sayısı 126.335 olarak bildirilmiştir. 2018 yılında ise Türkiye nüfusu 81.916.866, yeni vaka sayısı 210.537 ve kansere bağlı yaşam kaybı 116.710 olarak rapor edilmiştir (35). Bu verilere göre Türkiye’nin kanser insidansı Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7: 2020 yılı Türkiye kanser insidansı (35).

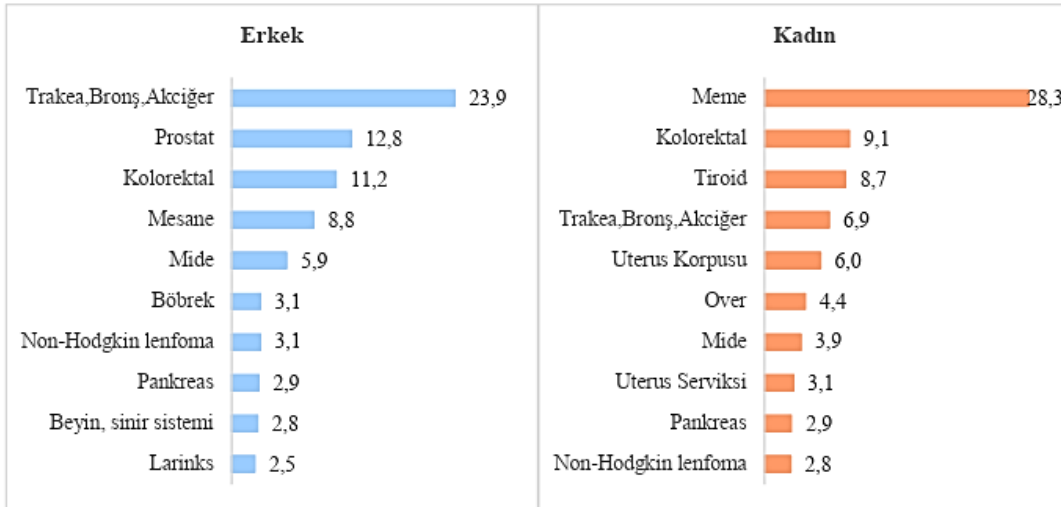
Ülkemizin nüfusu artmaya devam etmekte ve buna paralel olarak yıllık yeni tanı alan kanser hasta sayısı da artmaktadır. 2020 yılı itibarıyla en sık görülen ilk beş kanser türü Şekil 2.7’de

özetlenmiştir. Verilere göre, erkeklerde en sık görülen kanser türleri sırasıyla akciğer, prostat ve kolorektal kanserler iken; kadınlarda meme kanseri ilk sırada yer almaktadır (35).



Şekil 2.8: 2020 yılında ülkemizde en sık görülen ilk 5 kanser türü (35).

Cinsiyete göre dağılım incelendiğinde, tüm yaş gruplarında en sık görülen kanser türlerinin oranları Şekil 2.9'de sunulmuştur. Bu grafiğe göre, meme kanseri kadınlarda açık ara en sık görülen kanser tipidir (6).



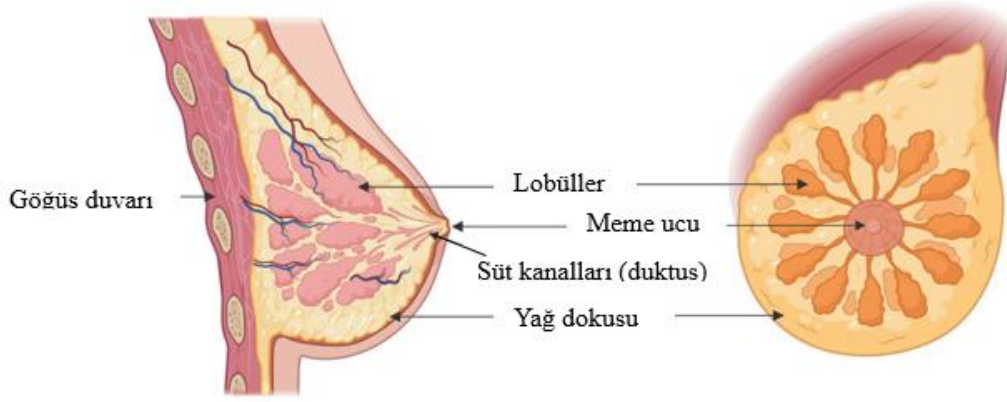
Şekil 2.9: Tüm yaş gruplarında cinsiyete göre en sık görülen kanserlerin yüzde dağılımları (6).

Türkiye’de yaş dağılımına bakıldığında, meme kanseri tanısı alan kadınların %44,5’inin 50-69 yaş aralığında, %40,4’ünün ise 25-49 yaş aralığında olduğu görülmektedir (36).

Kanserlerin yaklaşık %85’i epitelyal hücrelerden köken alır ve bu tür tümörler “karsinom” olarak adlandırılır. Mezoderm kaynaklı dokulardan (örneğin kemik veya kas) köken alanlar ise “sarkom”, meme bezi epitelinden köken alanlar ise “adenokarsinom” olarak tanımlanmaktadır (2).

Meme kanseri hem kadınlarda hem de erkeklerde meme dokusundaki hücresel düzensizlikler sonucu gelişen malign bir tümördür. Birçok doku ve organ embriyogenez sırasında şekillenir ve bu yapı yaşam boyunca büyük ölçüde sabit kalır. Buna karşın meme bezi, ergenlik, gebelik, laktasyon ve menopoz gibi fizyolojik dönemlerde belirgin yapısal değişiklikler geçiren dinamik bir organdır. Bu nedenle meme, hormonal değişimlere duyarlı bir yapıya sahiptir. Kadınlarda meme kanseri riski, meme dokusunun hacminin fazla olması ve östrojen maruziyetinin yüksekliği nedeniyle erkeklere göre çok daha yüksektir. Ayrıca, 50 yaşından önce meme kanseri öyküsü bulunan birinci derece akraba varlığı da önemli bir risk faktörü olarak bildirilmektedir (13).

Meme kanseri genellikle semptomsuz seyreder ve çoğu hasta hastalığını rutin taramalar sırasında öğrenir. Tanı sürecinde fizik muayene, mamografi ve biyopsi temel yöntemlerdir. Erken tanı, hastalığın seyri ve sağkalım oranları açısından kritik öneme sahiptir (7). Memenin anatomik yapısı Şekil 2.10’da gösterilmiştir.



Şekil 2.10: Memenin anatomik yapısı (37).

Memenin anatomik yapısı, göğüs duvarı üzerinde bulunan pektoralis major kası ile desteklenir ve yağ, bağ dokusu, epitel doku ve glandüler yapılardan oluşur. Her bir meme yaklaşık 15–20 lob içerir; bu loblar, süt üretiminden sorumlu lobüllerden meydana gelir. Lobüller, duktus adı verilen süt kanalları aracılığıyla meme başına açılır. Bu kanallar, süt akışını sağlayarak emzirme sürecinde işlev görür. Memenin bu yapısal özelliklerinin iyi anlaşılması, meme kanseri gibi hastalıkların tanı ve tedavi süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (38, 39).

2.1.3. Meme Kanseri Türleri ve Sınıflandırması

Moleküler ve klinik düzeyde farklılıklar gösteren biyolojik alt tiplerin geniş çeşitliliği nedeniyle, "meme kanseri" adı geniş bir kanser tipi grubunu tanımlamak için kullanılır (9).

Meme kanserinde tümörün büyüme hızı, yayılma kapasitesi ve metastatik potansiyeli, hastalığın evresiyle yakından ilişkili olduğu için anlamak çok önemlidir. Bu nedenle, hastalardan alınan biyopsi örnekleri histopatolojik olarak incelenir ve bazı özel parametrelere göre 0 (sıfır) ile IV (dört) arasında sınıflandırılır (36).

Meme kanserinin evresini tümörün boyutu ve meme kanserinin başka bir yere yayılıp yayılmaması belirler. Evre 0 (sıfır) aslında tam anlamıyla bir meme kanserini tanımlamaz. Meme kanserinin öncüsü olabilecek lezyonları tanımlamaktadır. Evre 1'de tümör boyutu 2 cm'den küçüktür ve tümör başka bir bölgeye yayılmamıştır. Evre 2'de tümör yayılım yapmamış ve boyutu 2 ile 5 cm arasındadır. Evre 1 ve 2'de kanser hücrelerinin erken

evre bir tümör oluşturdıklarını göstermektedir. Evre 3'te, tümör boyutu 5 cm'den büyük olabilir veya 5 cm'den küçük olup aynı zamanda koltuk altı lenf bezlerine (aksiller bezlere) yüksek derecede yapışık olabilir, göğüs kası duvarına tutunmuş olabilir veya boyundaki lenf düğümlerine yayılmış olabilir. Evre 4'te tümörler ileri evre meme kanseri olarak adlandırılmaktadır ve meme kanserinin diğer doku ve organlara büyük ölçüde yayıldığı gözlemlenir (36, 40).

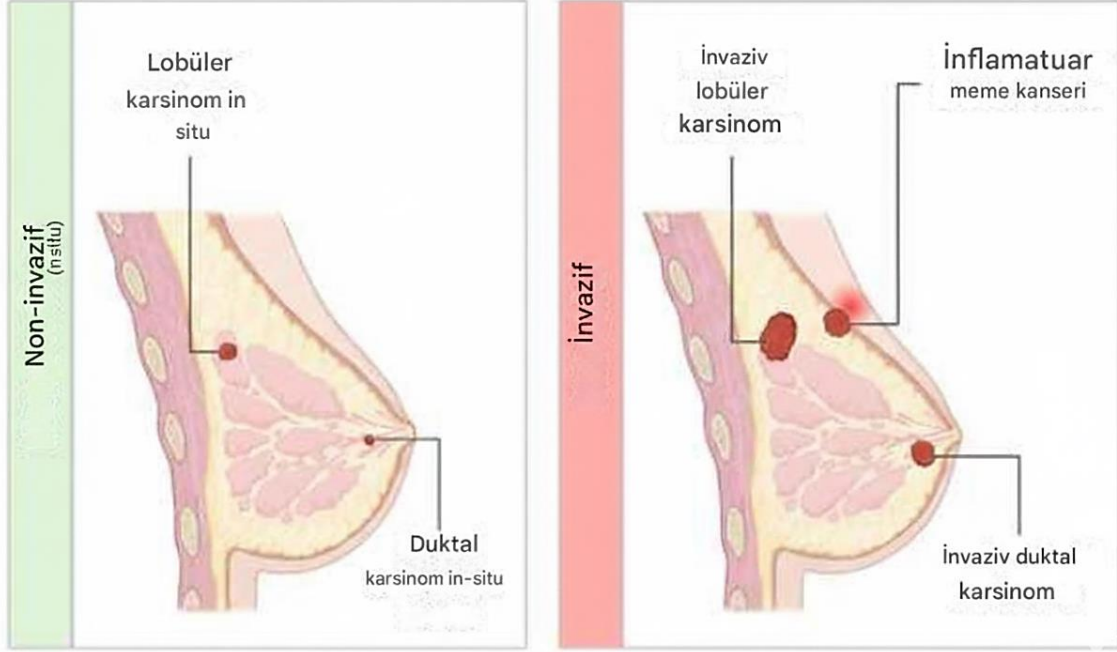
Meme rekonstrüksiyonu gibi plastik cerrahi teknikleri erken teşhiste kullanılmasına karşın; Evre IV gibi ileri derecedeki meme kanserlerinde kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemler olmasına rağmen yaygın metastaz ve yüksek nüks oranları nedeniyle hastaların prognozu hala kötüdür. Bu sebeple bu teknikler çoğu hastayı iyileştirmek için yetersiz kalmaktadır (40).

Meme kanserinin histolojik türü, tümörün köken aldığı doku ve yayılım potansiyeli hakkında önemli bilgiler sunar.

- Süt bezi lobüllerinden köken alanlar” lobüler karsinom”,
- Süt kanallarından köken alanlar “duktal karsinom” adını alır.

Bu iki ana grup ayrıca, kanserin süt kanalı veya lobül yapısı içinde sınırlı kalıp kalmamasına göre ikiye ayrılır (Şekil 2.11):

- Bez veya kanal içinde sınırlı ise “*in situ* (invaziv olmayan) karsinom”,
- Çevre dokulara yayılmışsa “*invaziv* (infiltratif) karsinom” olarak adlandırılır (36).



Şekil 2.11: Meme kanseri sınıflandırması (41).

En yaygın meme kanseri türleri, *duktal karsinoma in situ* (DCIS) ve *invaziv karsinom*dur.

Duktal Karsinoma in Situ (DCIS)

DCIS, invaziv olmayan veya pre-invaziv bir meme kanseri türüdür. Yeni tanı alan meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. “İntraduktal karsinom” veya Evre 0 meme kanseri olarak da bilinir. DCIS’te süt kanalı hücreleri kansere dönüşmüş ancak kanalın çevresindeki meme dokusuna yayılmamıştır. Meme dokusuna yayılma olmadığından metastaz gözlenmez (36, 41).

İnvaziv Meme Kanseri

Çevre meme dokusuna yayılan kanserler, invaziv meme kanseri olarak adlandırılır ve tanı konulan meme kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturur. Bu grup, farklı alt sınıflara ayrılır.

İnvaziv Duktal Karsinom (IDC):

En sık görülen meme kanseri türüdür. Tüm invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %70-80'ini oluşturur. Süt kanalındaki epitel hücrelerden başlar ve kanal duvarını aşarak çevre meme dokusuna yayılır. Lenf sistemi ve kan yoluyla vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilir.

İnvaziv Lobüler Karsinom (ILC):

İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %10'unu oluşturur. Süt üreten lobüllerden başlar. IDC gibi metastaz yapabilir. IDC'den farklı olarak, bilateral (her iki memede birden) görülme olasılığı daha yüksektir (yaklaşık her beş kadından birinde (36).

Nadir Görülen İnvaziv Meme Kanseri:

Bazı özel tip invaziv karsinomlar daha seyrek görülür. Bu gruba, müsinöz (kolloid), medüller, papiller, tübüler ve kribriform karsinomlar örnek verilebilir; her biri, tüm invaziv meme kanserlerinin %5'inden azını oluşturmaktadır (36, 42).

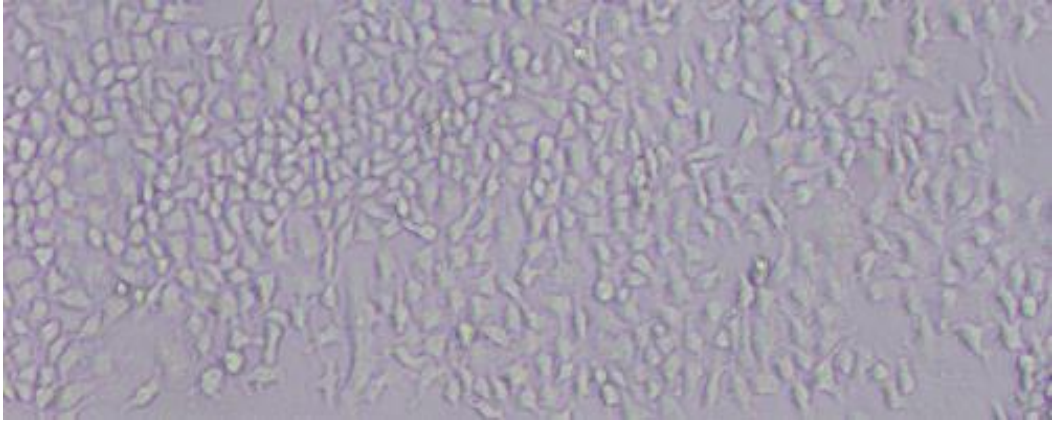
Üçlü Negatif Meme Kanseri (Triple-Negative Breast Cancer, TNBC)

TNBC, diğer invaziv meme kanseri alt tiplerine kıyasla daha agresif seyirli olup erken metastaz yapma eğilimi gösterir. TNBC'de östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonu bulunmaz. Bu nedenle hormon tedavisi ve HER2 hedefli tedavilere yanıt vermez. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %10–15'ini oluşturur. Prognozu genellikle olumsuzdur, nüks oranı yüksektir ve tedavi seçenekleri sınırlıdır (36).

2.1.4. MDA-MB Kanser Hücre Hattı

MDA-MB-231 (MD Anderson- Metastatik Meme- 231), 1973 yılında MD Anderson Kanser Merkezi'nde, 51 yaşındaki metastatik meme kanserli bir kadın hastanın plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Bu hücre hattı, üçlü negatif meme kanseri modellemesinde yaygın olarak kullanılmakta olup, özellikle metastatik potansiyeli yüksek ve invaziv fenotip sergilemesi nedeniyle terapötik araştırmalarda tercih edilmektedir (43, 44).

MDA-MB-231 hücreleri, yapışkan (adherent) özellik gösteren epitelyal morfolojiye sahiptir ve bu nedenle *in vitro* kültür çalışmalarında kolaylıkla çoğaltılabilir. Bu hücre hattı, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonu taşımadığı için üçlü negatif fenotipi temsil etmektedir. Ayrıca p53 tümör baskılayıcı geninin mutasyona uğramış formunu ifade etmekte olup, bu özelliğiyle tedaviye direnç ve metastatik kapasite araştırmalarında model sistem olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (44). Bu çalışmada, MDA-MB-231 hücre hattı, üçlü negatif meme kanserinin *in vitro* model sistemi olarak kullanılmıştır. Şekil 2.12’de çalışmamız kapsamında elde edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 10X büyütme oranında ışık mikroskobu görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 2.12: MDA-MB-231 hücreleri mikroskop görüntüsü (10X, ışık mikroskobu).

2.1.5. Meme Kanseri Tedavisinde Kemoterapi ve Direnç Mekanizmaları

Meme kanserinde, diğer kanser türlerinde olduğu gibi cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, endokrin ve hedefe yönelik tedavileri içeren kombine tedavi modaliteleri tedavinin temelini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, esas olarak tümör bölgelerine erişimdeki zorluk, hastalığın heterojen yapısı ve kullanılan ilaçların toksisitesi nedeniyle bu yaklaşımlar çoğu zaman istenilen terapötik başarıyı sağlayamamaktadır (45).

Meme kanseri hastalarında metastaz gelişimi sıklıkla karşılaşılan klinik bir durumdur. Hastalığın erken evrelerinde dahi görsel olarak tespit edilemeyecek kadar küçük, ancak immünohistokimyasal veya moleküler yöntemlerle saptanabilir düzeyde mikrometastazların

varlığı tespit edilmektedir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda kanserli bölgeyi ve olası metastatik odakları hedef alarak vücuttaki kanser hücrelerini zayıflatma ve yok etme amacıyla başvuru primer tedavi yöntemi kemoterapidir (46).

Kemoterapötik ilaçlar, DNA hasarına yol açarak veya hücre döngüsü ve replikasyon süreçlerini bozarak apoptozu indükler. Ancak yapılan araştırmalar, kemoterapinin yalnızca tedavi edici etkilerle sınırlı kalmadığını; aynı zamanda sağlıklı hücrelerde de belirgin toksisiteye neden olarak doku ve organ fonksiyonlarını olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, kemoterapi ajanlarının immün sistem üzerindeki baskılayıcı etkileri, tümör hücrelerinin tedaviye karşı direnç geliştirmesinde önemli bir rol oynamaktadır (47).

Kemoterapi ajanları, hücre döngüsünün belirli evrelerine müdahale ederek kanser hücrelerinin çoğalmasını engeller ve hücre ölümünü indükler. Farklı kemoterapötik ilaçlar, DNA replikasyonunu bozma, mitozu durdurma veya hücre metabolizmayı hedefleme gibi çeşitli mekanizmalar üzerinden antitümör etki gösterir (48). İlaç direnci, kanserden kaynaklanan ölümlerin yaklaşık %90'ından sorumlu olan temel bir klinik sorundur. Özellikle çoklu ilaç direnci, kemoterapötik ajanların etkinliğini azaltarak tedavi başarısızlığına, hastalığın nüksetmesine ve metastatik yayılımın artmasına yol açmaktadır (49).

Tedaviye direnç geliştiren meme kanseri hücreleri, geleneksel kemoterapötik ajanların etkinliğini önemli ölçüde azaltmakta, bu durum ise daha az toksik ve daha hedefe yönelik yeni tedavi stratejilerine olan ihtiyacı artırmaktadır (12).

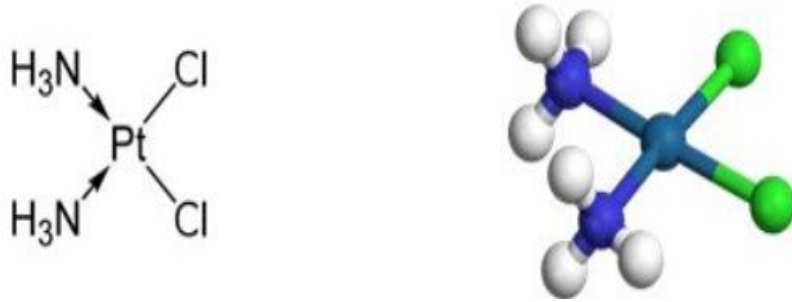
2.2. Sisplatin: Etki Mekanizması ve Direnç Problemi

Doksorubisin ve epirubisin gibi antrasiklin türevleri ile taksan grubu kemoterapötikler (örneğin paklitaksel ve dosetaksel), meme kanseri tedavisinde halen yaygın olarak kullanılan standart kemoterapi ajanlarıdır. Bununla birlikte kemoterapide etkinliği bilinen ilaçlardan biri de Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaç listesinde yer alan sisplatindir (4). Sisplatin (cis-diaminodikloroplatinyum (II)), klinikte en sık kullanılan platin bazlı antikanser ajanlardan biridir. Bu bileşik, meme, baş-boyun, over (yumurtalık) ve akciğer kanserleri dahil olmak

üzere çeşitli solid tümörlerin tedavisinde tek başına ya da diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde yaygın biçimde kullanılmaktadır (50).

Sisplatin, beyazımsı-sarı kristal yapıda, suda çözünebilen inorganik bir bileşiktir. Molekül ağırlığı 301,1 g/mol, yoğunluğu 3,74 g/cm³ ve erime noktası 270°C'dir. Molekül, platin atomuna cis konumunda bağlanmış iki klor (Cl) ve iki amonyak (NH₃) grubundan oluşmaktadır (4).

Sisplatinin kimyasal formülü [PtCl₂(NH₃)₂] olup moleküler yapısı Şekil 2.13'de gösterilmiştir.



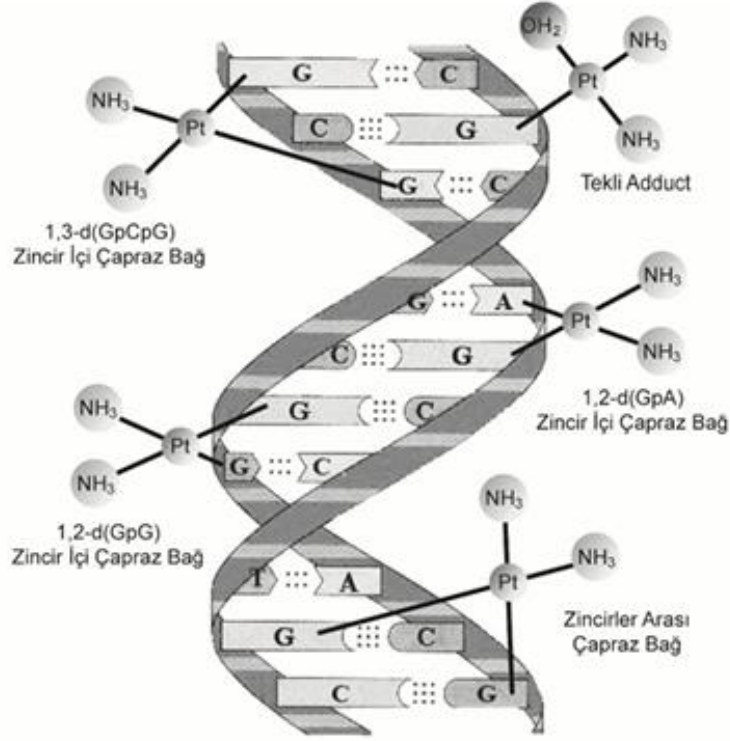
Şekil 2.13: Sisplatinin moleküler yapısı ([PtCl₂(NH₃)₂]) (51).

Sisplatin, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan platin bazlı bir kemoterapötik ajandır. Bu bileşik, ilk olarak 1844 yılında M. Peyrone tarafından sentezlenmiş, kimyasal yapısı ise 1893 yılında Alfred Werner tarafından tanımlanmıştır. Ancak, sisplatinin biyolojik ve terapötik etkileri ilk kez 1960'lı yıllarda Barnett Rosenberg tarafından ortaya konmuştur (4).

İlk defa 1970 yılında *Escherichia coli*'nin büyüme inhibitörü olarak keşfedilmiş, daha sonraki yıllarda anti kanser etkisi fark edilerek testis, over, serviks, baş ve boyun, akciğer ve lenfoma tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Testis kanserlerinde sisplatine genellikle iyi yanıt alınabilmesine karşılık diğer solid tümörlerde toksisite veya ilaç direnci nedeniyle terapötik etkinlik sınırlı kalmaktadır (52).

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), platin grubu içeren kemoterapötik ilaçların klinik kullanımını 1978 yılında onaylamıştır. Sisplatin, kanser hücrelerinin DNA'sına (pürin bazlarıyla) kovalent bağlar oluşturarak çapraz bağlantı meydana getirir ve böylece DNA

replikasyonunu ve transkripsiyonunu engeller (Şekil 2.13). Bu durum, özellikle hızla bölünen kanser hücrelerinde DNA hasarının birikmesine, dolayısıyla hücre döngüsünün durmasına ve apoptozun tetiklenmesine yol açar. Ancak sisplatinin hedef seçici olmaması, tedavi sürecinde çeşitli sistemik toksisitelerin ortaya çıkmasına neden olur (4).

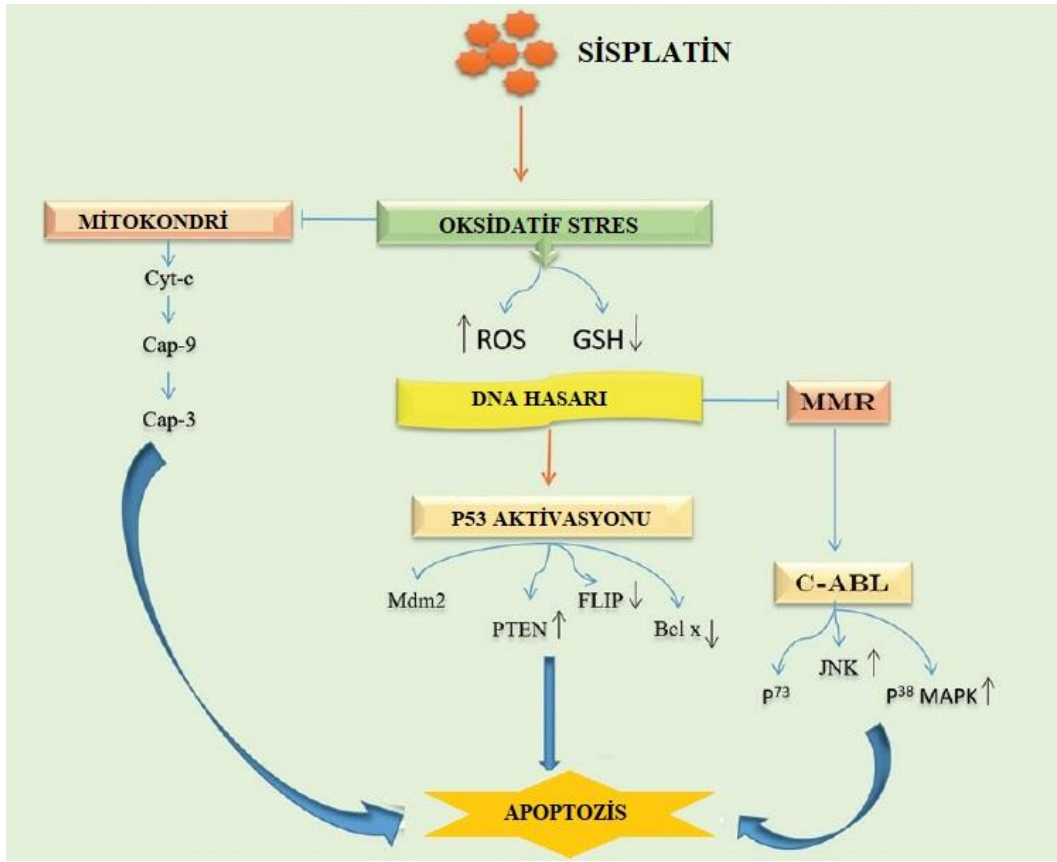


Şekil 2.14: Sisplatin ile oluşan DNA-adduct formları (52).

Bulantı, kusma, nörotoksisite ve nefrotoksisite sisplatine bağlı en sık bildirilen yan etkiler arasındadır. Bu toksisiteler içerisinde böbrek hasarı ile karakterize nefrotoksisite hem en yaygın hem de en ciddi yan etki olarak kabul edilmektedir (4). Sisplatin; germ hücreli tümörler, sarkomlar, karsinomlar ve lenfomalar gibi çeşitli kanser türlerine karşı yüksek etkinliğe sahip bir kemoterapötik ajandır. Bununla birlikte, sisplatinin biyolojik birikimi karaciğer, böbrek, kalp, sinir sistemi ve üreme sistemi başta olmak üzere birçok organda toksik etkilere yol açmakta; hepatotoksisite, nefrotoksisite, kardiyotoksisite, nörotoksisite ve üreme sistemi toksisitesi gibi çoklu organ hasarlarına neden olabilmektedir (53).

Sisplatin tedavisinin en ciddi dezavantajı, kanser hücrelerine karşı direncidir. Sisplatin direnci kanser türlerine bağlıdır. Örneğin, testis kanseri, yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri sisplatine karşı oldukça hassasken, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve kolorektal kanser sisplatine karşı oldukça dirençlidir. Sisplatin, prostat kanseri, yumurtalık kanseri, baş-boyun kanseri, mesane ve akciğer kanseri ve diğer bazı kanserler gibi katı kanserlerin tedavisinde şüphesiz en çok kullanılan antikanser ilaçlardan biridir. Sisplatinin testis kanserine karşı aşırı duyarlılığı, bazı proteinlerin aşırı ekspresyonu ve zincirler arası çapraz bağ onarım yeteneğinin düşük olmasından kaynaklanmaktadır. DNA'ya zarar vererek, çeşitli sinyal iletimlerini aktive ederek ve ardından apoptoza neden olarak apoptozu inhibe eden sitotoksik bir ilaçtır (54).

Şekil 2.15'te sisplatinin hücresel düzeyde oluşturduğu moleküler etki mekanizmaları şematik olarak gösterilmektedir (55). Sisplatin uygulaması, hücre içerisinde başlıca oksidatif stres oluşumuna neden olmakta; reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı ve glutatyon düzeylerinde azalma ile karakterize bir redoks dengesizliği meydana getirmektedir. Bu durum, DNA hasarını tetikleyerek hücresel yanıt mekanizmalarını aktive etmektedir. Oluşan DNA hasarı sonucunda tümör baskılayıcı protein p53 aktive olmakta ve bu aktivasyon; *PTEN* artışı, *FLIP* ve *Bcl-xL* düzeylerinde azalma gibi apoptotik süreçleri destekleyen değişikliklere yol açmaktadır. Bunun yanı sıra, DNA hasarına yanıt olarak mismatch repair (MMR) sistemi ve *c-Abl* sinyal yolları da aktive edilmekte; bu yollar üzerinden p73, JNK ve p38 MAPK gibi stres yanıtı proteinleri uyarılarak hücre ölüm süreci güçlendirilmektedir. Ayrıca, mitokondriyal yolk üzerinden sitokrom c salınımı gerçekleşmekte ve bunu takiben kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümü indüklenmektedir. Tüm bu mekanizmalar birlikte değerlendirildiğinde, sisplatinin hücrede çok yönlü sinyal yollarını etkileyerek apoptozu tetiklediği görülmektedir (55).



Şekil 2.15: Sisplatinin çeşitli moleküler etki mekanizmaları (55).

Kemoterapötik bir ajan olan sisplatine karşı tümör hücrelerinin geliştirdiği dirençte çok sayıda moleküler mekanizma rol almakta ve bu direnç farklı tümör tiplerinde farklı özellikler sergilemektedir. Kolon ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi tümörler sisplatine karşı kendilerine özgül veya yerleşik direnç gösterirlerken, baş ve boyun, testis, over ve küçük hücreli akciğer kanseri çoğunlukla sisplatine duyarlı olduğu bildirilmektedir. Ancak duyarlı tümörlerin çoğu tedavi başlangıcından sonra kazanılmış direnç geliştirebilmektedirler. Sisplatin direncinin gelişmesine neden olabilecek faktörler; hücrede ilaç birikiminin azalması, sülfür içeren bileşiklerin inaktivasyonu, sisplatin-DNA adduct formlarının onarımlarının artması, apoptozda görevli proteinlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler olarak sıralanabilmektedir.

Bakır transportunda görevli membran proteinlerinin de hücre içindeki sisplatin konsantrasyonunu etkiledikleri gözlenmektedir (52).

Sisplatin tedavisine karşı direnç gelişimi, başlangıçta güçlü klinik yanıtlar alınmasına rağmen, hastaların önemli bir kısmında tedavi başarısızlığına ve artan mortalite oranlarına yol açmaktadır. Direnç mekanizmaları, hücre içi ilaç birikiminin azalmasıyla ilişkilidir ve çeşitli biyokimyasal süreçleri içermektedir. Bunlar arasında:

- İlacın hücreye alımının azalması veya dışa akışının artması,
- Hücre içi detoksifikasyon ve ilaç inaktivasyonunun artması,
- DNA onarım mekanizmalarının güçlenmesi veya DNA hasarına tolerans gelişimi,
- Tümör mikroçevresindeki değişiklikler ve
- Bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini tanıma kapasitesinin azalması yer almaktadır (18).

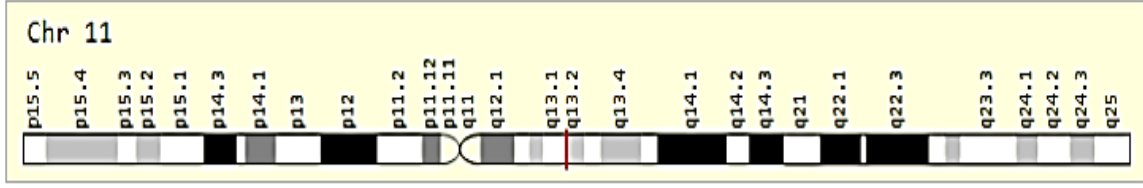
2.3. *BRMS1* ve *CTR1* Geni

Meme kanserinin progresyonu ve metastazı çoklu genetik ve moleküler yollarla düzenlenmektedir. Bu süreçte, bazı genler tümör baskılayıcı ya da ilaç direnciyle ilişkili rolleri nedeniyle özellikle dikkat çekmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda *BRMS1* (Breast Cancer Metastasis Suppressor 1) ve *CTR1* (Copper Transporter 1) genlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

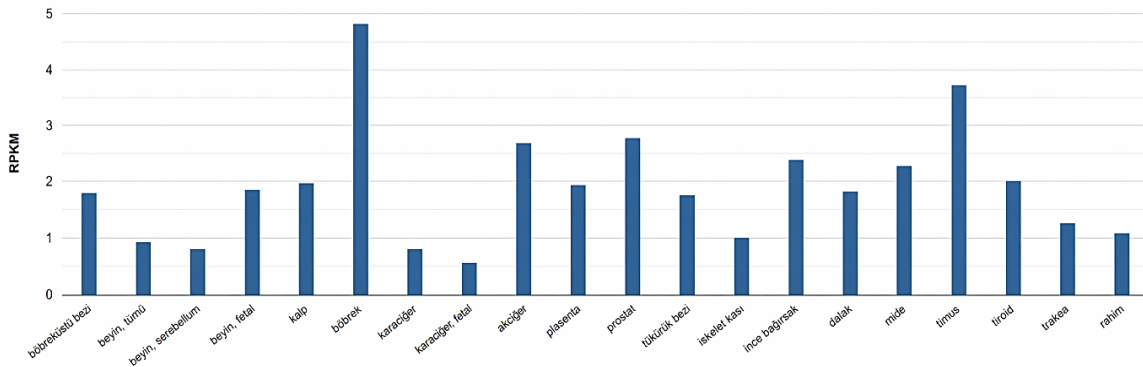
2.3.1. *BRMS1* Geni

BRMS1 (Breast Cancer Metastasis Suppressor 1), metastaz sürecini baskılayıcı etkisi ile tanımlanan önemli bir tümör baskılayıcı gendir. *BRMS1* geni, insan kromozomunun 11q13.1 bölgesinde yer almakta olup yaklaşık 8.5 kb uzunluğunda ve 10 ekzon içeren bir yapıya sahiptir (56). *BRMS1* geninin kromozomal lokalizasyonu Şekil 2.16'da farklı insan dokularındaki RNA ekspresyon profili ise Şekil 2.17'de gösterilmektedir (57). *BRMS1* geni, 246 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 28 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteini kodlamaktadır. *BRMS1* proteini, nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) ve nükleer ihracat

sinyalleri (NES) içermesi sayesinde çekirdek ve sitoplazma arasında taşınabilen bir transkripsiyonel düzenleyici olarak görev yapmaktadır (58).



Şekil 2.16: *BRMS1* geninin kromozomal lokalizasyonu (57).



Şekil 2.17: *BRMS1* geninin farklı insan dokularındaki RNA ekspresyon profili (59).

Fonksiyonel olarak *BRMS1*, özellikle metastatik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. *NF-κB* sinyal yollarını inhibe ederek invazyon, migrasyon ve anjiyogenez gibi metastazla ilişkili mekanizmaları baskılar. *BRMS1* ekspresyonunun azalması durumunda meme kanseri hücrelerinin daha yüksek metastatik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle *BRMS1* ekspresyon düzeyleri, metastatik kapasite ve hastalığın prognozu ile yakından ilişkilidir (17). Ayrıca, 2000 yılında yapılan ilk çalışmalarda *BRMS1* 'in primer tümör büyümesi üzerinde belirgin bir etkisi olmaksızın metastazı inhibe ettiği ortaya konmuştur (60).

Moleküler düzeyde *BRMS1*, mSin3:HDAC (histon deasetilaz) kompleksinin bir bileşeni olarak kromatin yeniden düzenlenmesini kontrol eder ve bu yolla metastazla ilişkili birçok genin ekspresyonunu baskılar (56). *BRMS1* 'in azalması durumunda, hücrelerin NF-κB ve

FAK (Focal Adhesion Kinase) yolları üzerinden invazyon ve migrasyon kapasitesinin arttığı bildirilmiştir (61). *BRMS1*, *NF-κB* sinyal yolunun p65 (RelA) alt birimi ile etkileşerek bu faktörün DNA'ya bağlanmasını engeller ve böylece *IL-6*, *MMP-9* ve *CXCR4* gibi metastazla ilişkili genlerin ekspresyonunu baskılar (62). Bunun yanı sıra miR-146a/b ekspresyonunu artırarak *EGFR* ve *IRAK1* düzeylerini düşürmekte ve hücre göçü ile invazyonunu sınırlamaktadır (63).

BRMS1 'in hücre iskeleti organizasyonu, adezyon kompleksleri ve apoptoz süreçleri üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir. *BRMS1* aşırı ekspresyonunun E-kaderin düzeylerini artırdığı ve fokal adezyon kinaz (FAK) aktivasyonunu azalttığı, buna bağlı olarak hücrelerin substrata tutunma özelliklerini değiştirerek metastatik yayılımı baskıladığı gösterilmiştir (64). Buna karşılık *BRMS1* kaybı, *CXCR4/NF-κB* aksının aktivasyonu ile anjiyogenez ve migrasyonun artmasına yol açmaktadır (65). Düşük *BRMS1* ekspresyonunun meme, akciğer, over, prostat ve melanom gibi birçok solid tümörde artmış metastatik potansiyel ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (66).

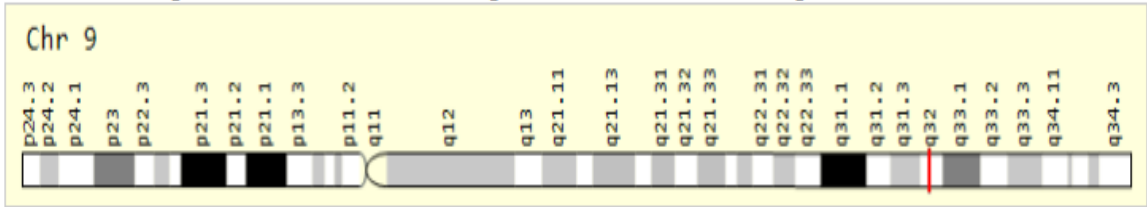
BRMS1 geninin epigenetik düzenlenmesine yönelik çalışmalar, promotör bölgesindeki metilasyon değişikliklerinin gen ekspresyonu üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir. Metge ve ark. [67] tarafından yapılan çalışmada, *BRMS1* promotör bölgesinde yer alan CpG adasının hipermetile olduğu ve bu durumun gen ekspresyonunun azalması ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, primer tümörlerin %45'inde ve lenf nodu metastazlarının %60'ında promotör hipermetilasyonu saptanmıştır. Bu bulgular, *BRMS1*'in epigenetik olarak baskılanmasının metastatik potansiyelin artmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Literatürde yer alan hücre hattı çalışmaları da bu bulguları desteklemektedir. Yang ve ark. [68] tarafından gerçekleştirilen çalışmada, yüksek metastatik potansiyele sahip MDA-MB-231HM hücrelerinde *BRMS1* 'in aşırı ekspresyonunun hücre göçünü anlamlı düzeyde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, *BRMS1*'in meme kanserinde metastaz baskılayıcı bir gen olarak önemli bir düzenleyici rol oynadığını ortaya koymaktadır.

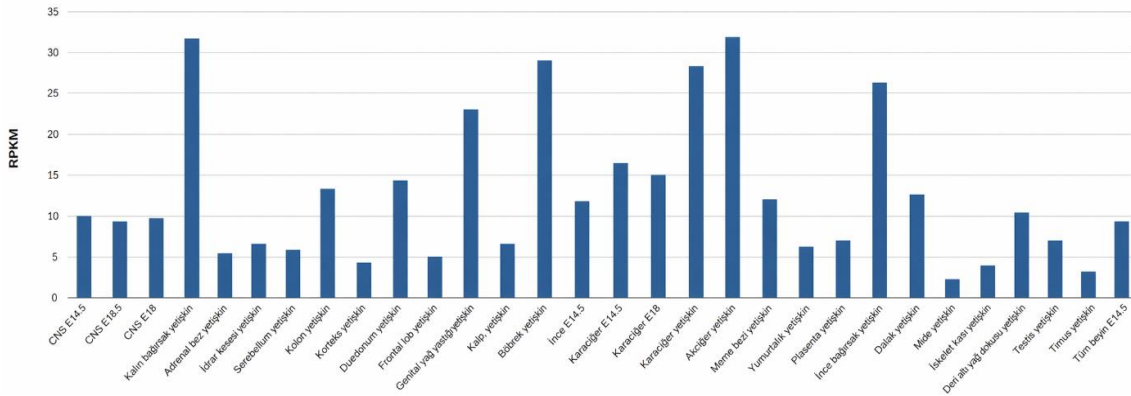
2.3.2. *CTR1* Geni

CTR1 geni, resmi adıyla *SLC31A1* (Solute Carrier Family 31 Member 1), hücre zarında bulunan yüksek afiniteli bir bakır taşıyıcı proteini kodlayan bir gendir. “*CTR1*” terimi hem genin kendisini hem de bu gen tarafından kodlanan proteini ifade etmek için kullanılmaktadır. *CTR1* proteini, hücre dışı ortamdan sitoplazmaya bakır taşınmasını sağlayarak hücre içi bakır homeostazının düzenlenmesinde temel bir rol oynamaktadır (69).

CTR1 geni, insan kromozomunun 9q31.1 bölgesinde yer almaktadır. Genin kromozomal lokalizasyonu Şekil 2.19’da farklı insan dokularındaki RNA ekspresyon profili ise Şekil 2.18’de gösterilmektedir (69, 70). Bu bölge, metal iyon taşınımı ve hücresel metabolik düzenleme ile ilişkili genleri içermesi açısından fonksiyonel olarak önemli bir genomik lokus olarak değerlendirilmektedir (71).



Şekil 2.18: *CTR1* geninin kromozomal lokalizasyonu (69).



Şekil 2.19: *CTR1* geninin farklı insan dokularındaki RNA ekspresyon profili (70).

CTR1 geni yaklaşık 0.04 Mb uzunluğunda olup, 190 amino asitten oluşan ve yaklaşık 21 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteini kodlamaktadır. *CTR1* proteini, hücre membranında

yer alan çok geçişli bir transmembran protein olup, bakır iyonlarının hücre içine taşınmasını sağlayan özgül ve yüksek afiniteli bir taşıyıcıdır. Yapısal olarak homotrimerik kompleksler oluşturabilen bu protein, bakır iyonlarını seçici olarak bağlayarak hücre içine aktarır ve böylece hücre içi metal iyon dengesinin korunmasına katkı sağlar (72).

Fonksiyonel olarak *CTR1*, bakırın hücre içine alımını düzenleyerek birçok temel biyolojik süreçte rol oynamaktadır. Bakır, enerji metabolizması, oksidatif stres yanıtı ve enzimatik reaksiyonlar için gerekli bir eser element olmakla birlikte, hücre içinde aşırı birikimi toksik etkilere yol açabilmektedir. Bu nedenle hücreler, bakırın alımı ve hücre içi dağılımını sıkı bir şekilde kontrol eden düzenleyici mekanizmalar geliştirmiştir. *CTR1* bu süreçte merkezi bir rol oynayan bir taşıyıcı olup, bakır homeostazının korunmasında temel bileşenlerden biri olarak kabul edilmektedir (71).

Bunun yanı sıra *CTR1*'in yalnızca fizyolojik bakır taşınımında değil, aynı zamanda platin bazlı kemoterapötik ajanların hücre içine girişinde de rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle sisplatin gibi ajanların hücre içine alımında *CTR1* 'in önemli bir taşıyıcı olduğu ve bu nedenle hücre içi ilaç konsantrasyonunu doğrudan etkilediği bildirilmektedir (52). *CTR1* ekspresyon düzeyindeki azalma, sisplatinin hücre içine girişini kısıtlayarak kemoterapiye karşı direnç gelişimine yol açabilmektedir. Bu durum, özellikle sisplatine dirençli meme kanseri hücre hatlarında tedavi etkinliğini sınırlayan önemli bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir (18).

Moleküler düzeyde *CTR1* ile sisplatin arasındaki etkileşim oldukça karmaşık ve dinamik bir yapı göstermektedir. Akerfeldt ve ark. [73] tarafından yapılan çalışmada, sisplatinin kısa süre içerisinde *CTR1* 'in hücre içi dağılımını değiştirdiği ve sitoplazmik serbest bakır havuzunda artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, sisplatinin hücre içi bakır homeostazı ile yakından ilişkili mekanizmalar üzerinden etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

CTR1 'in sisplatin taşınımındaki rolü ilk olarak deneysel modellerde ortaya konmuştur. Ishida ve ark. [74] yüksek afiniteli bakır taşıyıcısını kodlayan *CTR1* geninin delesyonunun hücre içi sisplatin birikimini azalttığını ve buna bağlı olarak sisplatine karşı direnç gelişimine yol açtığını göstermiştir. Ayrıca bakırın *CTR1* proteininin düzenlenmesini etkileyerek sisplatinin hücrel birikimini azalttığı ve hücrelerin hayatta kalma oranını artırdığı bildirilmiştir. Maya

ve memeli sistemlerinde yapılan çalışmalar, *CTRI*'in platin bileşiklerinin hücre içine alımına aracılık eden başlıca taşıyıcılardan biri olduğunu göstermektedir. Sisplatinin *CTRI*'in hızlı degradasyonuna yol açarak hücre içine girişini azaltması, ilaç direncinin gelişiminde önemli bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir. Buna karşılık, *CTRI* ekspresyonunun artması hücre içi platin birikimini artırmakta ve sisplatine duyarlılığı artırmaktadır (75). Howell ve ark. [76] tarafından yapılan çalışmalarda, platin bazlı ilaçların sitotoksik etkisinin büyük ölçüde hücre içine alınan ilaç miktarına bağlı olduğu gösterilmiş ve platin ilaçlara direnç kazanmış hücrelerde ilaç birikiminin belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Özellikle over kanseri hücre hatlarında *CTRI* ekspresyon düzeyleri ile kazanılmış sisplatin direnci arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *CTRI*'in genetik olarak devre dışı bırakılmasının hücreleri sisplatine dirençli hale getirdiği ve gen ekspresyonunun hem transkripsiyonel (Sp1 aracılığıyla) hem de post-translasyonel (proteozomal yıkım) düzeyde düzenlendiği ifade edilmiştir.

Bu çalışmada sisplatine duyarlı ve sisplatine dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında, *BRMS1* ve *CTRI* genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Böylece, sisplatine karşı gelişen moleküler adaptasyonlar ile bu genlerin rolleri arasındaki olası bağlantı ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Bu iki genin seçilmesinin temel nedeni, biri metastazı baskımlarken diğerrinin ilaç alımında belirleyici olmasıdır. Bu durum, kanser tedavisinde hem tümör yayılımını önleme hem de kemoterapötik etkinliği artırma açısından kritik bir araştırma alanı sunmaktadır. Ayrıca, *BRMS1* ve *CTRI*'in birlikte değerlendirilmesi, kanser hücrelerinin invaziv kapasiteleri ve ilaç yanıtları arasında moleküler bir köprü kurarak daha hedefe yönelik ve bireyselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

2.4. Apiterapi ve Arı Zehri Bileşenleri

Çeşitli kaynaklardan elde edilen doğal ürünlerin, kanser gibi hastalıklarda etkili olabilecek birçok fizyolojik yolağı uyarma potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Antikanser aktivite gösteren ve düşük toksisiteye sahip biyoaktif metabolitler içeren doğal ürünler, kanser dahil birçok hastalığın tedavisinde umut verici ilaç adayları olarak

değerlendirilmektedir. Kanserle karşı antikanser ilaçları ile doğal bileşiklerin birlikte kullanımını ilk kez 1990'lı yılların başında Di Bella tarafından önerilmiştir (77).

Yüzyıllardır farklı medeniyetler tarafından insan sağlığını korumak ve hastalıkları tedavi etmek amacıyla Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp (GETAT) uygulamaları kullanılmaktadır. Günümüzde ise mevcut tedavi yöntemlerinin yan etkileri, doğal tedavi yaklaşımlarına olan ilgiyi artırmıştır. Bu doğal tedavi yöntemlerinden biri de arı ürünlerinin kullanıldığı apiterapi uygulamalarıdır (78).

Apiterapi, bal arısının (*Apis mellifera* L.) ürettiği biyoaktif ürünlerin kullanılmasıyla akut ve kronik hastalıkların tedavi edilmesi veya önlenmesini amaçlayan bir yöntemdir (78). Apiterapinin kökeni yaklaşık 6000 yıl öncesine, eski Mısır tıbbına kadar uzanmaktadır. Hipokrat'ın (MÖ 460–370) kelliik tedavisinde bal ve arı zehrini (Bee Venom, BV) kullandığı bilinmektedir (79).

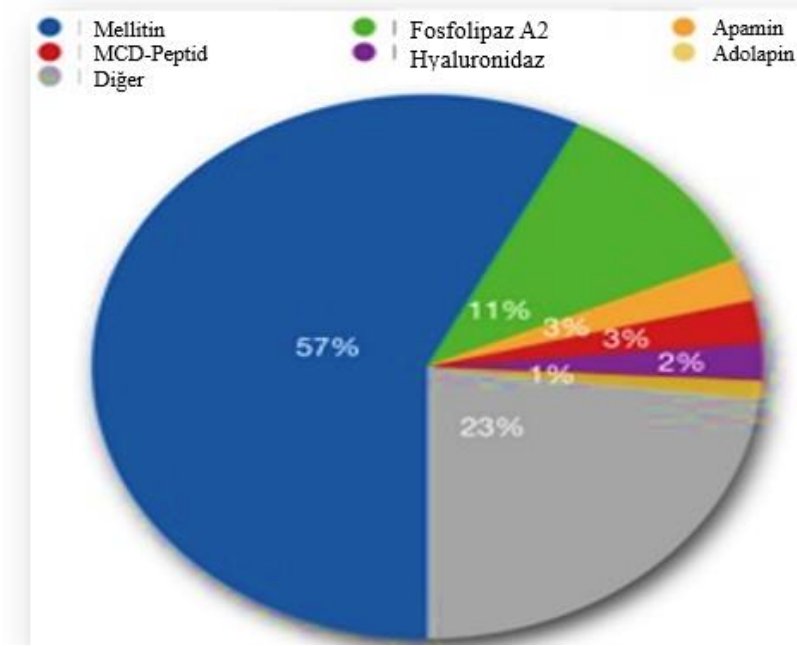
Apiterapide en yaygın kullanılan ürünler; bal, polen, arı ekmeği (perga), arı sütü, apilarnil, propolis ve arı zehridir. Arı zehri, arıların iğneleri aracılığıyla karın boşluğunda bulunan zehir bezlerinden salgılanmaktadır (Şekil 2.20). Arı bir canlıyı soktuğunda iğnesini geri çekemez; iğne, zehir bezi ile deride kalır ve buna bağlı olarak arı kısa süre içinde ölür (80).



Şekil 2.20: Arı İğnesi/Arı Zehri.

Arı zehri tedavisi artrit, romatizma, sırt ağrısı, kanserli tümörler ve cilt hastalıkları gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde geleneksel bir tıp yöntemi olarak kullanılmıştır. Arı zehri geleneksel olarak ağrıyı hafifletmek ve kronik ağrılı hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır. Arı zehrinin ağrı kesici etkilerinde, deri altı bölgesine uygulanan akupunktur noktası uyarımı tedavisinin önemli olabileceği düşünülmektedir (81).

Arı zehri; melittin, apamin, fosfolipaz A2, histamin, dopamin ve norepinefrin gibi çeşitli biyoaktif bileşenlerden oluşmaktadır (Şekil 2.21) (80). Bu bileşikler; antioksidan, antibakteriyel ve antitümör etkileri nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde araştırılmaktadır (82).



Şekil 2.21: Arı zehrinin bileşenleri.

Bununla birlikte, onlarca yıllık araştırmalara rağmen arı zehri bileşenlerinin antikanser etkilerinin moleküler mekanizmaları ve hücresel seçiciliği tam olarak aydınlatılamamıştır. Arı zehrinin kanser hücrelerine karşı moleküler etkilerinin ve özgüllüğünün anlaşılması, geniş erişilebilirliğe ve düşük maliyete sahip bu doğal üründen yeni terapötik ajanların geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (83).

Melittin, bal arısı zehrinin ana aktif bileşeni olup zehrin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Melittin, 26 amino asitten oluşan, pozitif yüklü ve amfipatik bir peptittir. Bu molekül, hücre zarındaki fosfolipit çift tabaka ile etkileşime girerek yaklaşık 4,4 nm çapında transmembran gözenekler oluşturur ve bu durum hücre ölümüne yol açar. Ayrıca bu

gözenekler, sitotoksik etkili küçük moleküllerin hücre içine girişini de kolaylaştırmaktadır (83).

Melittin, negatif yüklü hücre zarına bağlandıktan sonra zar bütünlüğünü bozarak iyonların ve diğer moleküllerin hücre dışına sızmasına neden olur. Bu süreç, hücre lizisi ile sonuçlanır ve fosfolipit çift tabakanın yapısal bütünlüğü ciddi şekilde zarar görür. Özellikle tümör hücrelerinin zar yapısının daha hassas olması, melittini kemoterapi açısından potansiyel bir aday haline getirmektedir. Ayrıca melittinin lipozomal sistemler gibi taşıyıcı sistemlere entegre edilmesi, hedefe yönelik tedavi stratejileri açısından önemli avantajlar sunmaktadır (84).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, melittinin yalnızca sitotoksik etkilerle sınırlı kalmadığını; aynı zamanda antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antiviral özelliklere de sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra melittinin hücre döngüsünü durdurabildiği, apoptozu tetiklediği ve çeşitli malign hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (85).

Arı zehrinin ana bileşeni olan melittinin bazı toksik etkileri (özellikle eritrosit lizisi) bilinmektedir. Ancak uygun dozlarda kullanıldığında bu molekülün terapötik etkilerinden yararlanılabileceği gösterilmiştir (80).

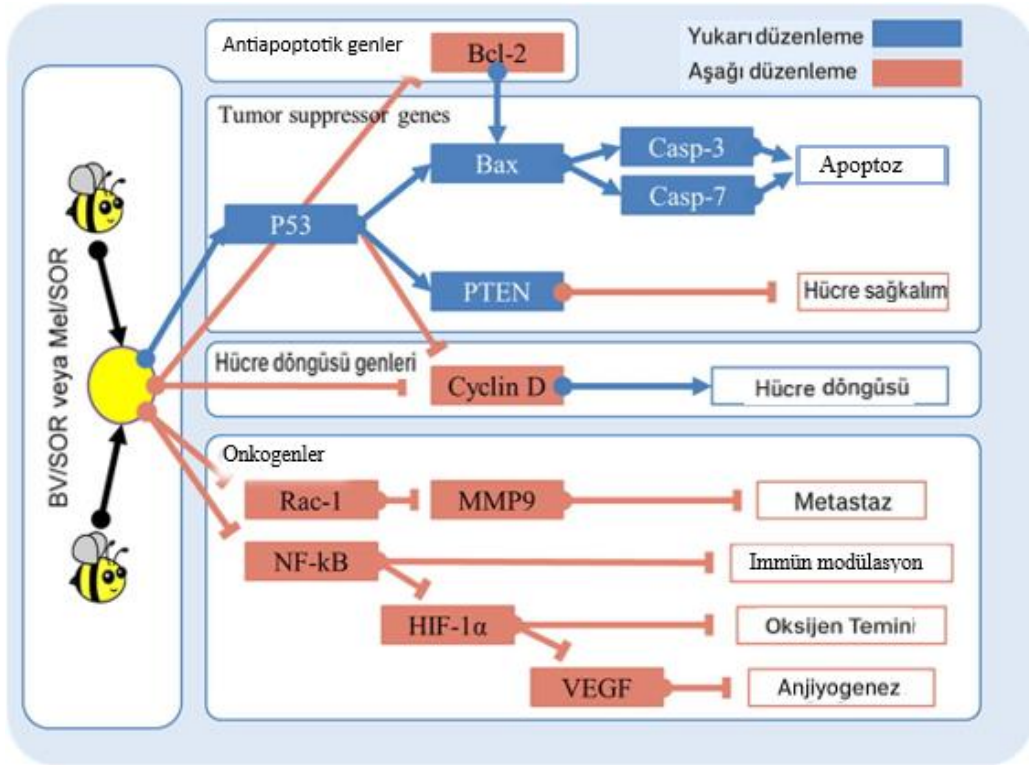
Sonuç olarak, arı zehri ve melittin, çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel bir alternatif ajan olarak öne çıkmaktadır. Mevcut literatür verileri, bu bileşiklerin özellikle bazı kanser türleri üzerinde *in vitro* koşullarda seçici sitotoksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

Arı zehri ve melittinin antikanser etki mekanizmaları aşağıdaki başlıklar altında özetlenebilir:

- Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücre siklusunda duraksamaya neden olması,
- Hücre proliferasyonu ve tümör büyümesinin inhibisyonu,
- Kaspaz aktivasyonu yoluyla apoptotik hücre ölümünün indüklenmesi, Matriks metaloproteinazların (MMP) düzenlenmesi ile invazyon ve metastaz süreçlerinin etkilenmesi,
- Apoptotik ve nekrotik hücre ölüm mekanizmalarının aktive edilmesi (86).

Bu mekanizmalar, arı zehri ve melittinin hücresel düzeyde çoklu sinyal yollarını hedef aldığını göstermektedir. Nitekim BV/melittin uygulaması; tümör baskılayıcı genlerin (p53, PTEN) aktivasyonunu artırırken, antiapoptotik genler (Bcl-2) ve onkogenik yollar (NF- κ B, HIF-1 α) üzerinde baskılayıcı etki göstermektedir. Ayrıca Bax artışı ile kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivasyonu tetiklenmekte ve sonuçta apoptotik hücre ölümü indüklenmektedir. Bununla birlikte Cyclin D düzeylerinin baskılanması hücre döngüsünde duraksamaya neden olurken, Rac1 ve MMP-9 gibi metastaz ile ilişkili moleküllerin inhibisyonu invazyon ve metastatik kapasitenin azalmasına katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda VEGF ve HIF-1 α yollarının baskılanması ile anjiyogenez ve tümörün oksijen temini de sınırlandırılmaktadır (83, 85).

Şekil 2.22’de, arı zehri ve melittinin kanser hücreleri üzerindeki bu çok yönlü etkileri şematik olarak gösterilmektedir. Şekil, BV/melittinin hücre döngüsü, apoptoz, metastaz ve anjiyogenez gibi temel kanser süreçlerini eş zamanlı olarak hedefleyerek antikanser etki oluşturduğunu ortaya koymaktadır (85).



Şekil 2.22: Arı zehri ve melittinin kansere karşı ön görülen etki mekanizmaları (85).

2.5. Amaç ve Hipotezler

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık görülen malign tümörlerden biri olup, yüksek metastatik potansiyeli ve tedaviye karşı gelişen ilaç direnci nedeniyle halen önemli bir halk sağlığı sorunu olarak varlığını sürdürmektedir. Özellikle üçlü negatif meme kanseri (TNBC) alt tipi, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 ekspresyonunun bulunmaması nedeniyle hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve kemoterapötik ajanlara karşı geliştirdiği direnç nedeniyle klinik açıdan önemli zorluklar yaratmaktadır. Bu durum, TNBC'nin daha agresif seyretmesine ve prognozunun diğer alt tiplere kıyasla daha kötü olmasına neden olmaktadır.

DNA'ya çapraz bağlanarak apoptozu tetikleyen güçlü bir kemoterapötik ajan olan sisplatin, TNBC tedavisinde yaygın olarak kullanılmasına karşın; sistemik toksisiteleri ve direnç gelişimi, tedavinin uzun vadeli etkinliğini sınırlandırmaktadır. Sisplatine karşı gelişen direnç mekanizmaları arasında ilacın hücre içine alımının azalması, DNA hasarının etkin şekilde onarılması ve apoptotik yolların baskılanması yer almaktadır. Bu nedenle, sisplatinin doğal antikanser ajanlarla kombinasyonu, tedavi yanıtını artırmak ve direnç mekanizmalarını aşmak amacıyla umut vadeden bir strateji olarak değerlendirilmektedir.

Melittin, bal arısı zehrinin biyolojik olarak aktif majör peptidi olup; hücre membran geçirgenliğini artırıcı, apoptozu tetikleyici ve antimetastatik etkileri ile literatürde dikkat çekmektedir. Melittinin özellikle tümör hücre zarına seçici olarak etki edebilmesi ve çoklu hücrel sinyal yollarını hedef alabilmesi, onu kombinasyon tedavileri açısından cazip bir aday haline getirmektedir. Ancak, melittin ve sisplatinin kombinasyonunun TNBC model hücre hatlarında çok boyutlu (fenotipik ve genetik düzeyde) sistematik olarak değerlendirildiği kapsamlı çalışmalar sınırlıdır.

Bu tez çalışmasında, daha önce sisplatin ile muamele edilerek sisplatine duyarlı ve dirençli alt popülasyonlar geliştirilmiş MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında, farklı dozlarda uygulanan melittinin hem hücrel davranış (proliferasyon, migrasyon ve invazyon) hem de moleküler düzeyde (gen ekspresyonu) oluşturduğu etkiler kapsamlı bir şekilde araştırılacaktır. Bu kapsamda özellikle metastaz baskılayıcı rolü ile bilinen *BRMS1* ve hücre içi ilaç alımında kritik rol oynayan *CTRI* genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimler

incelenecek ve bu değişimlerin sisplatin duyarlılığı ile ilişkisi değerlendirilecektir. Bu alışma ile, melittinin yalnızca sitotoksik bir ajan olarak değil, aynı zamanda metastaz ve ilaç direnci ile ilişkili moleküler yolakları modüle edebilen bir düzenleyici olarak potansiyel rolü ortaya konulması hedeflenmektedir.

Çalışmanın temel hipotezi, melittinin *BRMS1* gen ekspresyonunu artırarak metastatik süreçleri baskıladığı ve *CTR1* ekspresyonunu düzenleyerek sisplatinin hücre içine alımını artırmak suretiyle kemoterapiye duyarlılığı yükselttiği yönündedir.

Bu alışma kapsamında:

- İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürü sistemlerinde MDA-MB-231 hücrelerinin geliştirilmesi sağlanacak,
- Melittin tedavisinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi XTT sitotoksisite analizi ile değerlendirilecek,
- Hücresel hareketliliğin belirlenmesi amacıyla yara iyileşme analizi uygulanacak,
- Hücrelerin invazyon kapasitesi invazyon deneyi ile analiz edilecek,
- Tüm bu fenotipik değişimlere eşlik eden genetik yanıtların belirlenmesi amacıyla, özellikle metastaz baskılayıcı *BRMS1* ve ilaç alımı ile ilişkili *CTR1* genlerinin ekspresyon düzeyleri, gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) yöntemiyle değerlendirilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre Hattı

Bu çalışmada kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücre hattına ait temel özellikler Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3.1: MDA-MB-231 hücre hattına ait temel özellikler.

Özellik	Açıklama
Hücre Hattı	MDA-MB-231
Tedarikçi	ATCC (American Type Culture Collection)
Katalog Numarası	HTB-26
Organizma	Homo sapiens (İnsan)
Doku	Meme (meme bezi epiteli)
Hastalık	Adenokarsinom (meme kanseri)
Hücre Tipi	Adherent (yapışan hücre hattı)
Kültür Ortamı	RPMI-1640

3.1.2. Kimyasal ve Reaktifler

Çalışmada hücre kültürü, sitotoksosite, hücre göçü, invazyon ve gen ekspresyon analizlerinde kullanılan başlıca kimyasal, reaktif ve ticari kitler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasal, reaktif ve kitler.

Kimyasal / Reaktif / Kit	Firma
RPMI-1640 Medium	Capricorn Scientific, Almanya
Fetal Bovin Serum (FBS)	Capricorn Scientific, Almanya
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific, Almanya
Gentamisin	Capricorn Scientific, Almanya
Trypsin-EDTA (%0,25)	Capricorn Scientific, Almanya
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Capricorn Scientific, Almanya
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Amresco®, ABD
Melittin (M2272, ≥85% HPLC)	Sigma-Aldrich, ABD
Sisplatin	Sigma-Aldrich, ABD
Giemsa boyası	Merck, Almanya
Metanol (%100)	Merck, Almanya
Formaldehit (%37)	Tekkim, Türkiye
RNA izolasyon kiti	GeneAll, Kore
cDNA sentez kiti	WizScript, Kore
2X qPCR Master Mix (SYBR Green)	Applied Biosystems, ABD

3.1.3. Makine ve Teçhizat

Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar.

Cihaz	Model / Firma
CO₂ İnkübatör	Nüve EC 160, Türkiye
Laminar Akım Kabini	Nüve MN 090, Türkiye
İnverted Mikroskop	BAB, Türkiye
Mikroskop Kamerası	Leica, Almanya
Stereo Mikroskop	Leica, Almanya
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems 7500 Fast, ABD
Vorteks	IKA®, ABD
Mini Santrifüj	Nüve NF 024, Türkiye
Santrifüj	Nüve NF 400, Türkiye
NanoDrop	Mecasys Optizen NanoQ, Kore
ELISA Okuyucu	BioTek ELX808, ABD
Jel Görüntüleme Sistemi	Bio-Rad, ABD
Jel Yükleme Sistemi	Thermo Scientific, ABD
Buzdolabı (+4 °C)	Vestel, Türkiye
Derin Dondurucu (-20 °C)	Vestel, Türkiye

3.2. Metot

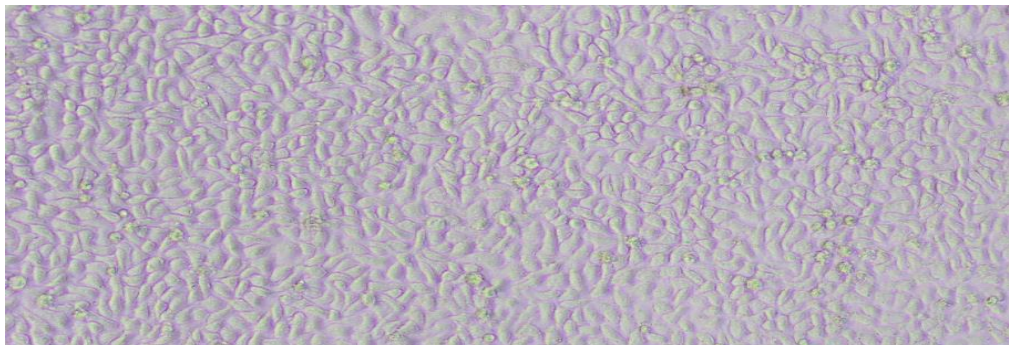
3.2.1. Hücre Hattı ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada, üçlü negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu, ATCC® HTB-26™) ve bu hücre hattından türetilmiş sisplatin dirençli MDA-MB-231/Sisplatin hücre hattı *in vitro* model sistemi olarak kullanılmıştır. Hücreler, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarı'nda standart hücre kültürü koşullarında muhafaza edilmiştir.

Hücrelerin kültürü için RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. Besiyerine %10 Fetal Bovin Serum (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 Gentamisin ilave edilmiştir. Hücreler, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 75 cm²'lik hücre kültür flasklarında çoğaltılmıştır.

Hücreler flask yüzeyinin yaklaşık %80'ini kapladığında, %0,25 Tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak pasajlanmıştır. Pasajlama işlemi sonrasında hücre canlılığı ve yoğunluğu Trypan mavisi boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde canlı hücreler boyayı absorbe etmezken, ölü hücreler mavi renkte gözlemlenmektedir. Hücre süspansiyonu 10:1 oranında Trypan mavisi ile karıştırılmış ve Thoma lamı üzerine alınarak mikroskop altında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Tüm hücre kültürü işlemleri steril koşullarda, biyogüvenlik kabini içerisinde yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan MDA-MB-231 hücre hattına ait temsili mikroskopik görüntü Şekil 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.1: MDA-MB-231 hücreleri mikroskop görüntüsü (10X, ışık mikroskobu).

3.2.2. MDA-MB-231 Hücre Hattına Sisplatin Direncinin Kazandırılması

MDA-MB-231 hücre hattına sisplatin direnci, artan dozlarda kademeli ilaç uygulaması yöntemi ile kazandırılmıştır. Bu amaçla hücreler, belirli aralıklarla giderek artan konsantrasyonlarda sisplatine maruz bırakılmıştır. Bu süreç, hücrelerin ilaca adaptasyon sağlamasına ve direnç geliştirmesine olanak tanımış olup birkaç ay boyunca sürdürülmüştür.

Direnç geliştirme sürecinde kullanılan ara stok çözeltileri, üretici firmanın belirttiği 1660 μM konsantrasyonundaki ana stok çözeltisinden hazırlanmıştır. Ara stok çözeltileri, hücrelerin tolerans düzeyine bağlı olarak uygun seyreltme oranları kullanılarak RPMI-1640 kültür ortamı ile elde edilmiştir.

Kademeli doz artışı uygulamaları sonucunda, yaklaşık 333 μM konsantrasyona kadar sisplatine direnç geliştirmiş hücre hattı elde edilmiş ve bu hücreler sonraki deneysel analizlerde kullanılmıştır. Direnç gelişimi, hücrelerin morfolojik değişimleri ve proliferasyon kapasitesi gözlemlenerek takip edilmiştir.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre kültüründe hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştıklarında flask yüzeyini kaplayarak birbirleriyle temas ederler. Bu durum, literatürde “kontakt inhibisyonu” olarak adlandırılan ve hücrelerin proliferasyon ile hareket kabiliyetlerinin azalmasına neden olan bir mekanizmayı tetikler. Hücrelerin üst üste büyümesi altta kalan hücrelerin ölümüne yol açabileceğinden, kültürün sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi için hücrelerin pasajlanması gerekmektedir.

Pasajlama işlemi, hücrelerin bulundukları yüzeyden ayrılarak daha düşük yoğunlukta yeni kültür ortamlarına aktarılması sürecidir. Bu işlem genellikle tripsinizasyon yöntemi ile gerçekleştirilir. Hücreler, yüzeye tutunmalarını sağlayan ekstraselüler matriks bileşenleri aracılığıyla flask tabanına bağlanırlar ve tripsin-EDTA enzimi bu yapıları parçalayarak hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlar (87).

İşlem öncesinde hücreler mikroskop altında incelenmiş ve flask yüzeyinin yaklaşık %80 oranında dolduğu (konfluent) gözlemlenmiştir. Ardından flask içerisindeki kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin temizlenmesi amacıyla flask içerisine steril PBS (Phosphate

Buffered Saline) eklenmiş ve ölü hücreler ile hücre artıkları uzaklaştırılmıştır. PBS ile yıkama işleminin hücrelere zarar vermeden yüzey temizliği sağladığı bilinmektedir (88).

PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin yüzeyden ayrılması amacıyla flask içerisine uygun hacimde tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilmiş ve hücreler 37°C’de kısa süre inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlenmiştir. Tripsin etkisinin durdurulması amacıyla hücrelerin üzerine besiyeri eklenmiş ve hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu uygun oranlarda yeni kültür flasklarına aktarılmış ve üzerine taze besiyeri eklenerek inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4. Trypan Mavisi ile Hücre Sayımı

Trypan mavisi ile hücre sayımı, boyanın negatif yüklü yapısı nedeniyle sağlam hücre zarından geçememesi prensibine dayanmaktadır. Bu nedenle canlı hücreler boyayı almazken, membranı hasar görmüş ölü hücreler boyayı absorbe ederek mavi renkte görünmektedir. Bu yöntem, hücre canlılığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (89).

Pasajlama sonrası elde edilen hücre süspansiyonundan belirli bir hacim alınarak trypan mavisi ile 10:1 oranında karıştırılmıştır. Bu doğrultuda 250 µL hücre süspansiyonu üzerine 25 µL trypan mavisi eklenmiştir. Boyanın ışığa duyarlı olması nedeniyle hazırlanan karışım kısa süreliğine alüminyum folyo ile sarılarak bekletilmiştir.

Hazırlanan karışımdan yaklaşık 10 µL alınarak Thoma lamı (hemositometre) üzerine yüklenmiştir. Yükleme sonrasında hücreler mikroskop altında incelenmiş ve belirlenen sayım bölgelerinde hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım sırasında boyanmamış hücreler canlı, mavi boyanan hücreler ise ölü olarak değerlendirilmiştir.

Hücre yoğunluğu aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir (Denklem 3.1):

$$1 \text{ mL'deki Hücre Sayısı} = \text{Sayılan Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 4 \times 10^6 \quad (3.1)$$

3.2.5. Test Maddesinin Temini ve Hazırlanması

Çalışmada kullanılan doğal bileşik melittin, Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir (ürün kodu: M2272; *Melittin from honey bee venom, ≥85% (HPLC)*). Melittin, bal arısı zehrinin ana bileşeni olup bu çalışmada yüksek saflıkta toz formda kullanılmıştır.

Deneyisel uygulamalarda melittin, steril distile su içerisinde çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti, deneylerde kullanılmadan önce RPMI-1640 kültür ortamı ile seyreltilerek istenilen konsantrasyonlara getirilmiştir.

Tüm çözeltiler steril koşullarda hazırlanmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C’de, ışık almayan koşullarda saklanmıştır.

Deney gruplarında melittin farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Kültür ortamındaki çözücü (distile su) oranı %0,1’in altında tutulmuş olup, bu oranın hücre kültürü koşullarında toksik etki oluşturmadığı kabul edilmektedir.

3.2.6. Melittin Çözelti Hazırlığı ve Doz Hesaplamaları

Çalışmada kullanılan melittin, steril distile su içerisinde çözülerek 1756 µM stok konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti, kullanılıncaya kadar -20 °C’de ışık almayan koşullarda saklanmış ve deneylerden hemen önce uygun oranlarda seyreltilmiştir. Melittin uygulamalarında kullanılacak son konsantrasyonlar, ön deneyler sonucunda belirlenen IC₅₀ değerleri temel alınarak hesaplanmıştır. Gerekli seyreltme hesaplamaları aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır (Denklem 3.2):

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (3.2)$$

Bu denklemde;

- C₁ : Stok çözeltinin konsantrasyonu (1756 µM)
- V₁ : Stok çözeltiden alınacak hacim (µL)
- C₂: Hedeflenen son konsantrasyon (µM)
- V₂: Toplam hacim (4000 µL) olarak tanımlanmaktadır.

Melittin uygulamalarında kullanılan dozlara ait stok ve çalışma konsantrasyonları Tablo 3.4'te sunulmuştur. Tablo 3.4'te görüldüğü üzere, farklı hücre hatları için belirlenen IC_{50} ve $IC_{50} \times 2$ dozlarına karşılık gelen stok hacimleri hesaplanmıştır. Melittin, hücreler yaklaşık %80 konfluens düzeyine ulaştığında kültür ortamına eklenmiştir. Kontrol gruplarına yalnızca kültür ortamı uygulanmış olup, tüm deneyler üç teknik tekrar ($n=3$) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4: Melittin dozlarına ait stok ve çalışma konsantrasyonları.

Hücre Hattı	Doz Türü	C_1 (μM)	V_1 (μL)	C_2 (μM)	V_2 (μL)
Duyarlı MDA-MB-231	IC_{50}	1756	1,14	0,5	4000
Duyarlı MDA-MB-231	$IC_{50} \times 2$	1756	2,28	1	4000
Dirençli MDA-MB-231	IC_{50}	1756	5,7	2,5	4000
Dirençli MDA-MB-231	$IC_{50} \times 2$	1756	11,4	5	4000

3.2.7. Sitotoksosite (XTT) Analizi

Melittinin hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) sitotoksosite testi uygulanmıştır. XTT testi, metabolik olarak aktif hücrelerin tetrazolyum tuzlarını indirgeme kapasitesine dayanan ve hücre canlılığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan kalorimetrik bir yöntemdir (90).

- Sisplatin duyarlı MDA-MB-231 ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına her kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler yaklaşık %80 konfluens düzeyine ulaştığında melittin ile muamele edilmiştir.
- Melittin konsantrasyonları, en yüksek doz 10 μM olacak şekilde hazırlanmış ve seri dilüsyon yöntemi (1/2 ve 3/4 oranlarında) kullanılarak farklı konsantrasyonlar elde edilmiştir. Hücreler, melittin uygulamasının ardından %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş atmosferde 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara XTT reaktifi (Biological Industries, Kat. No: 20-300-1000) eklenmiş ve oluşan renk değişimi mikropipla okuyucu (Biotek ELISA Reader) kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Hücre canlılığı yüzdeleri, elde edilen absorbans değerlerinin kontrol grubuna normalize edilmesiyle hesaplanmıştır. Elde edilen doz-yanıt verileri kullanılarak IC_{50} değerleri belirlenmiştir.

Melittinin sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin XTT yöntemi ile değerlendirilmesine ait örnek görüntü Şekil 3.2’de sunulmaktadır.



Şekil 3.2: Melittinin sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında sitotoksik etkisinin XTT testi ile değerlendirilmesine ait görüntü.

Deney düzeneğinde ilk iki sütun melittin tekrarlarını, ikinci sütun hücre kontrol grubunu, üçüncü sütun ise en yüksek melittin konsantrasyonunu temsil etmektedir. Diğer sütunlarda ise en yüksek konsantrasyondan başlanarak seri dilüsyonlar uygulanmıştır. Turuncu renk canlı hücreleri, sarı renk ise hücre ölümünü göstermektedir. Hücre ölümü gerçekleşen kuyucuklarda XTT reaktifi ile herhangi bir renk değişimi gözlenmemiştir (Şekil 3.2). XTT testi sonuçları doğrultusunda toplam altı deney grubu oluşturulmuş olup, kontrol gruplarında herhangi bir test maddesi uygulanmamıştır. Her bir deney grubu 24 saat ve 48 saatlik iki farklı inkübasyon süresinde değerlendirilmiştir. Tüm deneyler üç teknik tekrar (n=3) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Deney gruplarına ait detaylar Tablo 3.5’te sunulmuştur.

Tablo 3.5: XTT testi sonucu oluşturulan deney grupları.

Grup No	Hücre Hattı	Uygulama	Doz (μ M)	Açıklama
Grup 1	MDA-MB-231	Kontrol	0	Duyarlı hücre hattı kontrol grubu
Grup 2	MDA-MB-231	Melittin	<u>0,89</u>	Duyarlı hücre hattı IC ₅₀
Grup 3	MDA-MB-231	Melittin	1,78	Duyarlı hücre hattı IC ₅₀ ×2
Grup 4	MDA-MB-231/Sisplatin	Kontrol	0	Dirençli hücre hattı kontrol grubu
Grup 5	MDA-MB-231/Sisplatin	Melittin	<u>2,10</u>	Dirençli hücre hattı IC ₅₀
Grup 6	MDA-MB-231/Sisplatin	Melittin	4,20	Dirençli hücre hattı IC ₅₀ ×2

3.2.8. Hücre Göçü (Wound Healing-Scratch) Analizi

Hücrelerin migrasyon kapasitesini değerlendirmek amacıyla yara iyileştirme analizi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, hücre monolayerinde oluşturulan yapay bir boşluğun zamanla hücreler tarafından doldurulma hızına dayanmakta olup hücre göçünün belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (91, 92).

Çalışmada sisplatin duyarlı MDA-MB-231 ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler, 12 kuyucuklu hücre kültür plakalarına her kuyucukta yaklaşık $1,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiş ve %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin yaklaşık %80 konfluens düzeyine ulaştığı gözlemlenmiştir.

Hücre tabakasında steril 10 μ L pipet ucu kullanılarak tek hamlede ve dikey doğrultuda çizik oluşturularak yapay bir “yara” meydana getirilmiştir. Yara oluşturulmasının ardından kuyucuklar PBS ile yıkanarak serbest hücreler ve hücresel artıklar uzaklaştırılmıştır.

Daha sonra hücreler üzerine taze besiyeri eklenmiş ve deney gruplarına XTT sitotoksosite analizi ile belirlenen IC₅₀ ve IC₅₀×2 konsantrasyonlarına karşılık gelen melittin dozları uygulanmıştır. Kontrol grubuna yalnızca besiyeri eklenmiştir.

Yara oluşumunun hemen ardından (0. saat) ve takiben 24. ve 48. saatlerde hücre göçü mikroskop altında görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler kullanılarak yara kapanma oranları belirlenmiş ve hücre migrasyonu değerlendirilmiştir. Sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında gerçekleştirilen hücre göçü analizine ait temsili görüntüler Şekil 3.3'te sunulmuştur. Aynı hücre hatlarında ayrıca invazyon analizi de gerçekleştirilmiş olup, her iki deneye ait mikroskopik görüntüler temsili olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.3: Sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında gerçekleştirilen hücre göçü ve invazyon analizlerine ait temsili görüntüler.

3.2.9. İnvazyon Analizi

Bu analizde hücrelerin invaziv davranışları, morfolojik değişimleri ve yüzeyde yayılım özellikleri üzerinden değerlendirilmiştir. Deneylerde sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hatları kullanılmıştır.

Hücreler pasajlandıktan sonra sayımları yapılmış ve 24 kuyucuklu hücre kültür plakalarına her bir kuyucukta toplam hacim 1000 μ L olacak şekilde uygun yoğunlukta ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunabilmesi amacıyla plakalar, %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda hücrelerin yaklaşık %80 konfluens düzeyine ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada invazyon analizi esas olarak 24 kuyucuklu plakalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, Şekil 3.3'te sunulan temsili görüntüler, deneysel sürecin görselleştirilmesi amacıyla 12 kuyucuklu plakalar üzerinde gerçekleştirilen ön uygulamalardan elde edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında hücreler, daha önce XTT sitotoksosite analizi ile belirlenen IC_{50} ve $IC_{50} \times 2$ konsantrasyonlarına karşılık gelen melittin dozları ile muamele edilmiştir. Kontrol grubuna ise yalnızca kültür ortamı eklenmiştir. Hücreler ilaç uygulamasının ardından tekrar inkübasyona bırakılmış ve 24 ve 48 saat takip edilmiştir. Belirlenen süreler sonunda hücrelerin morfolojik değerlendirilmesi amacıyla Giemsa boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle kuyucuklardaki kültür ortamı dikkatlice uzaklaştırılmış, ardından hücreler üzerine 250 μ L formaldehit eklenerek kısa süre fikse edilmiştir. Formaldehit uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile iki kez yıkanmıştır.

Hücre zarının geçirgenliğini artırmak amacıyla 500 μ L metanol eklenmiş ve hücreler yaklaşık 20 dakika bu çözelti ile muamele edilmiştir. Daha sonra metanol uzaklaştırılarak hücreler PBS ile tekrar yıkanmıştır. Boyama aşamasında her bir kuyucuğa 250 μ L Giemsa boyası eklenmiş ve boyanın ışığa duyarlı olması nedeniyle plakalar alüminyum folyo ile kaplanarak yaklaşık 20 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda boya uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuk yüzeyinde kalan sıvı kalıntıları, hücre tabakasına temas edilmeden dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Her zaman noktası (24 ve 48 saat) için ayrı boyama işlemi gerçekleştirilmiş ve hücreler mikroskop altında görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler doğrultusunda hücrelerin morfolojik değişimleri ve invaziv davranışları değerlendirilmiştir.

3.2.10. Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile Gen Ekspresyon Analizi

3.2.10.1. Duyarlı ve Dirençli MDA-MB-231 Hücre Hatlarında RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu öncesinde tüm materyaller RNaz kontaminasyonunu önlemek amacıyla RNaz-free koşullarda hazırlanmıştır. Bu doğrultuda kullanılan tüm çözelti ve sarf malzemelerin RNaz içermemesine dikkat edilmiştir.

Toplam RNA izolasyonu, üretici firmanın protokolüne uygun olarak RNAeasy™ Blood RNA Isolation Kit (Spin Column) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hatları pasajlandıktan sonra hücreler toplanmış ve lizis işlemine tabi tutulmuştur. Hücre pelletleri üzerine lizis solüsyonu eklenerek homojenizasyon sağlanmış ve hücrelerin parçalanması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen lizata eşit hacimde bağlama solüsyonu ilave edilerek RNA'nın kolona bağlanması için uygun

ortam oluşturulmuştur. Hazırlanan karışım spin kolona iki aşamada yüklenmiş ve her yükleme sonrası yaklaşık $12.000\times g$ 'de 30 saniye santrifüj edilerek sıvı faz uzaklaştırılmıştır. RNA'nın membrana bağlanmasının ardından kolona sırasıyla yıkama solüsyonu I ve yıkama solüsyonu II eklenmiş ve her adımda santrifüj işlemi uygulanarak safsızlıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Yıkama işlemlerinin ardından membran üzerinde kalan etanol kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla yüksek hızda ek bir santrifüj yapılmıştır. Son aşamada spin kolon temiz RNA elüsyon tüplerine aktarılmış ve kolon membranının merkezine 30–50 μL elüsyon solüsyonu eklenerek RNA elüe edilmiştir. Kısa süreli inkübasyonun ardından yüksek hızda santrifüj uygulanarak saf RNA elde edilmiştir.

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop spektrofotometre kullanılarak belirlenmiş ve uygun kalite değerlerine sahip örnekler cDNA sentezi aşamasında kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.10.2. NanoDrop ile İzole Edilen RNA'ların Ölçülmesi

İzole edilen toplam RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıklarının belirlenmesi amacıyla NanoDrop spektrofotometre kullanılmıştır. Nükleik asitlerin optik yoğunlukları 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçülmüş ve elde edilen absorbans değerleri oranlanarak (A_{260}/A_{280}) RNA saflığı değerlendirilmiştir. Nükleik asitler 260 nm'de maksimum absorbans gösterirken, proteinler 280 nm'de absorbans vermektedir. Bu nedenle A_{260}/A_{280} oranı, RNA örneklerinin protein kontaminasyonundan arınmışlığını göstermektedir. İdeal RNA saflık oranının yaklaşık 2.0 olması beklenmektedir.

Buna ek olarak, RNA örneklerinin diğer organik bileşikler ve tuz kontaminasyonları açısından değerlendirilmesi için A_{260}/A_{230} oranı da dikkate alınmıştır. Bu oranın yaklaşık 1.8–2.2 aralığında olması, örneklerin yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir.

RNA konsantrasyonu aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem 3.3):

$$\text{RNA Konsantrasyonu (ng/}\mu\text{L)} = A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 40 \quad (3.3)$$

İzole edilen sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarına ait RNA örneklerinden yaklaşık 2 μL alınarak NanoDrop cihazına yüklenmiş ve cihaz tarafından

verilen konsantrasyon ile saflık değerleri kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre uygun kaliteye sahip RNA rnekleri sonraki deneylerde kullanılmak üzere değerlendirilmiştir.

3.2.10.3. cDNA Sentezi ve Gen Ekspresyon Analizi

İzole edilen total RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler RNaz kontaminasyonunu önlemek amacıyla RNaz-free koşullarda yrtlmştir. cDNA sentezi, üretici firmanın protokolüne uygun olarak hazırlanmış ve Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Termal evrim koşulları; 25 C’de 10 dakika, 37 C’de 120 dakika ve 85 C’de 5 dakika olacak şekilde ayarlanmış, reaksiyon sonunda örnekler 4 C’de bekletilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri gen ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere -20 C’de muhafaza edilmiştir.

Gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi uygulanmıştır. Bu kapsamda *BRMS1* ve *CTR1* genlerine ait ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Reaksiyonlar, Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR sistemi kullanılarak, 96 kuyucuklu alüminyum bloklarda ve SYBR Green ile gerçekleştirilmiştir.

BRMS1 geni için 128 bp, *CTR1* geni için ise 94 bp uzunluğunda amplifikasyon ürünleri hedeflenmiştir. qRT-PCR reaksiyon karışımı toplam 20 L olacak şekilde hazırlanmış olup; 2 L cDNA, 1 L ileri primer, 1 L geri primer, 10 L 2X master mix ve 6 L nükleaz-free su içermektedir.

Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 3.6’da verilmiştir:

Tablo 3.6: *BRMS1* ve *CTRL* genlerine ait primerler.

<i>BRMS1</i> primerleri İleri: 5'-AGCCATCAAAAAGGCTAGGGC-3' Geri: 5'-AGGAAGACGAGAATCCTGGGT-3'
<i>CTRL</i> primerleri İleri: 5'-GCCCCCTTACTCTGTTGTCC-3' Geri: 5'-TCTACTGCATCAGGAGGGCT-3'

Elde edilen amplifikasyon verileri kullanılarak gen ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak) yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.2.11. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler en az üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda parametrik veriler için tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA), parametrik olmayan veriler için ise Mann–Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Gen ekspresyon analizlerinde elde edilen veriler, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada melittinin, üçlü negatif meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231'in sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli alt tipleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Melittinin hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla XTT sitotoksosite analizi gerçekleştirilmiş ve her iki hücre hattı için yarı maksimal inhibitör konsantrasyonlar (IC_{50}) hesaplanmıştır. Elde edilen verilere göre melittinin IC_{50} değeri, MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattında 0,89 μ M, sisplatin dirençli hücre hattında ise 2,1 μ M olarak belirlenmiştir.

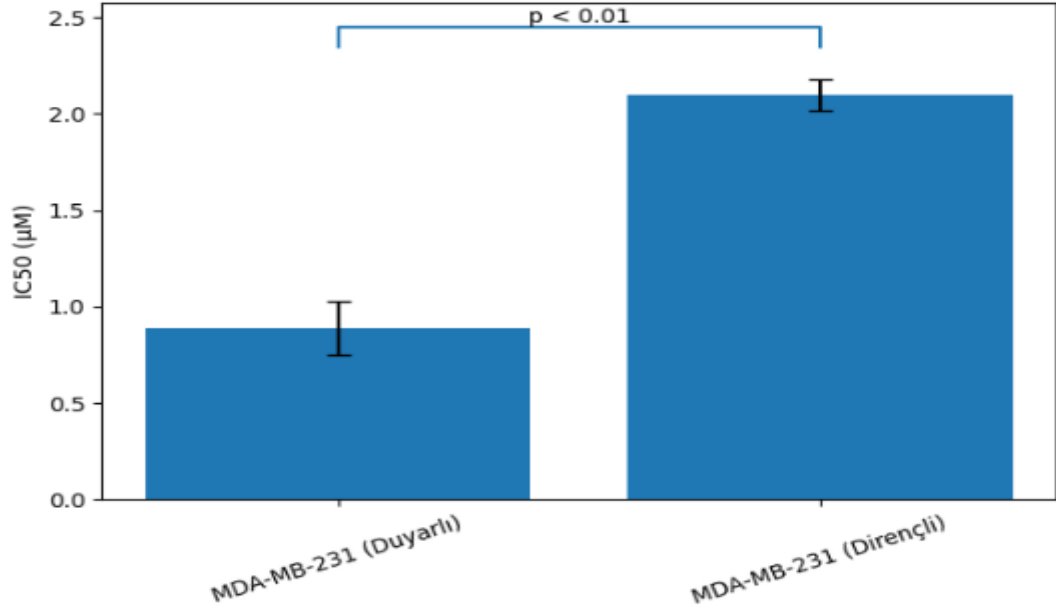
Belirlenen IC_{50} ve $IC_{50} \times 2$ konsantrasyonları kullanılarak hücre migrasyonu ve invazyonu üzerine etkiler değerlendirilmiştir. Bu kapsamda yara iyileştirme analizi ile hücre göç kapasitesi incelenmiş, invazyon analizi ile hücrelerin morfolojik ve yayılım özellikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, melittin uygulanan gruplarda hem sisplatin duyarlı hem de sisplatin dirençli hücre hatlarında hücre migrasyonu ve invazyonuna ilişkin değişimler gözlemlenmiştir.

4.1. Sitotoksosite Sonuçları

Melittinin MDA-MB-231 sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi XTT analizi ile incelenmiştir. Bu amaçla hücreler farklı konsantrasyonlarda melittin ile muamele edilmiş ve hücre canlılığı, ölçülen absorbans değerlerinin kontrol grubuna oranlanmasıyla belirlenmiştir.

Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, melittin uygulamasının her iki hücre hattında da konsantrasyon arttıkça hücre canlılığında azalmaya yol açtığı görülmüştür. Hesaplanan IC_{50} değerleri, sisplatin duyarlı MDA-MB-231 hücre hattı için 0,89 μ M, sisplatin dirençli MDA-MB-231/Sisplatin hücre hattı için ise 2,1 μ M olarak bulunmuştur. Dirençli hücre hattında bu değerin daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir.

XTT analizine ait bulgular Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde, melittin konsantrasyonunun artmasına paralel olarak hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir ($p < 0,01$).



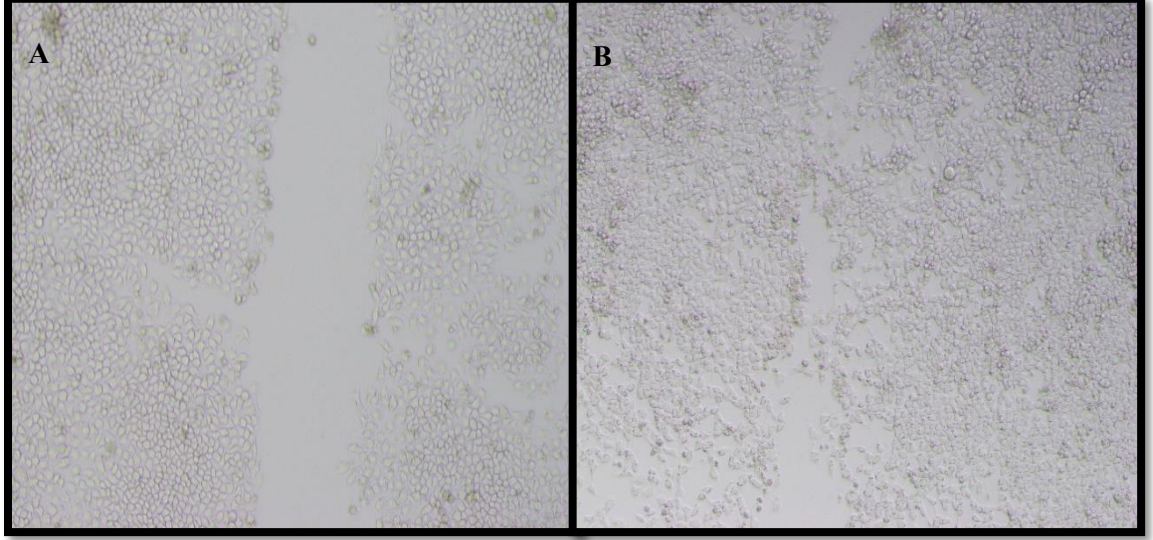
Şekil 4.1: Melittinin MDA-MB-231 sisplatin duyarlı ve dirençli hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisinin XTT analizi ile değerlendirilmesi (72 saat). IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,89 µM ve 2,1 µM olarak hesaplanmıştır ($p < 0,01$).

4.2. Hücre Göçü Bulguları

Melittinin MDA-MB-231 sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli hücre hatlarında hücre migrasyonu üzerindeki etkisi yara iyileştirme analizi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla hücre tabakasında oluşturulan yapay yara alanının zaman içerisindeki kapanma durumu incelenmiş ve farklı deney grupları arasında karşılaştırmalar yapılmıştır.

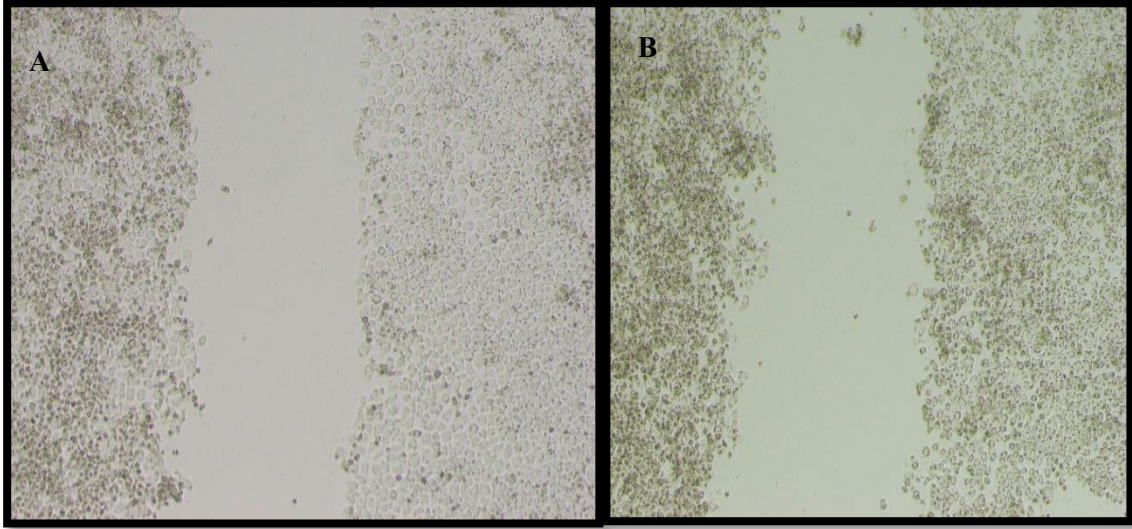
Çalışmada her iki hücre hattı için kontrol, IC₅₀ ve IC₅₀×2 olmak üzere toplam altı deney grubu değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda deney grupları; duyarlı kontrol, duyarlı IC₅₀, duyarlı IC₅₀×2, dirençli kontrol, dirençli IC₅₀ ve dirençli IC₅₀×2 olarak oluşturulmuştur.

MDA-MB-231 sisplatin duyarlı kontrol grubunda, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi boyunca yara alanının hücre göçü ile belirgin şekilde daraldığı ve büyük oranda kapandığı gözlenmiştir. Bu gruba ait temsili mikroskop görüntüleri Şekil 4.2’de sunulmuştur.



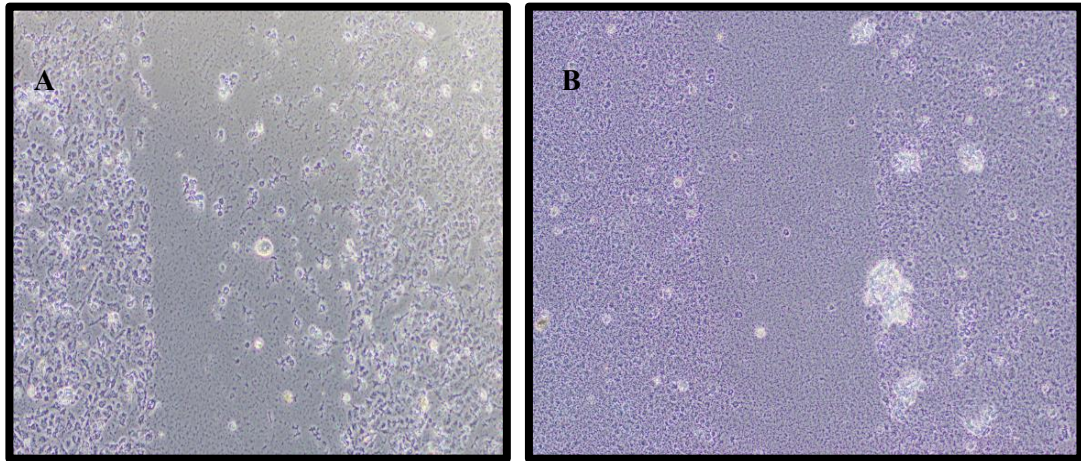
Şekil 4.2: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattı kontrol grubuna ait (melittin uygulanmamış) yara iyileştirme analizinin sonuçları (A. Kontrol 24. saat; B. Kontrol 48. saat; 10x mikroskop görüntüsü).

Melittin uygulanmış MDA-MB-231 duyarlı hücre hattında ise yara alanının kapanma hızının kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Melittinin IC₅₀ konsantrasyonunda uygulanması sonrasında hücre göçünün belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Melittin uygulanmış duyarlı hücre hattına ait temsili görüntüler Şekil 4.3’te verilmiştir.



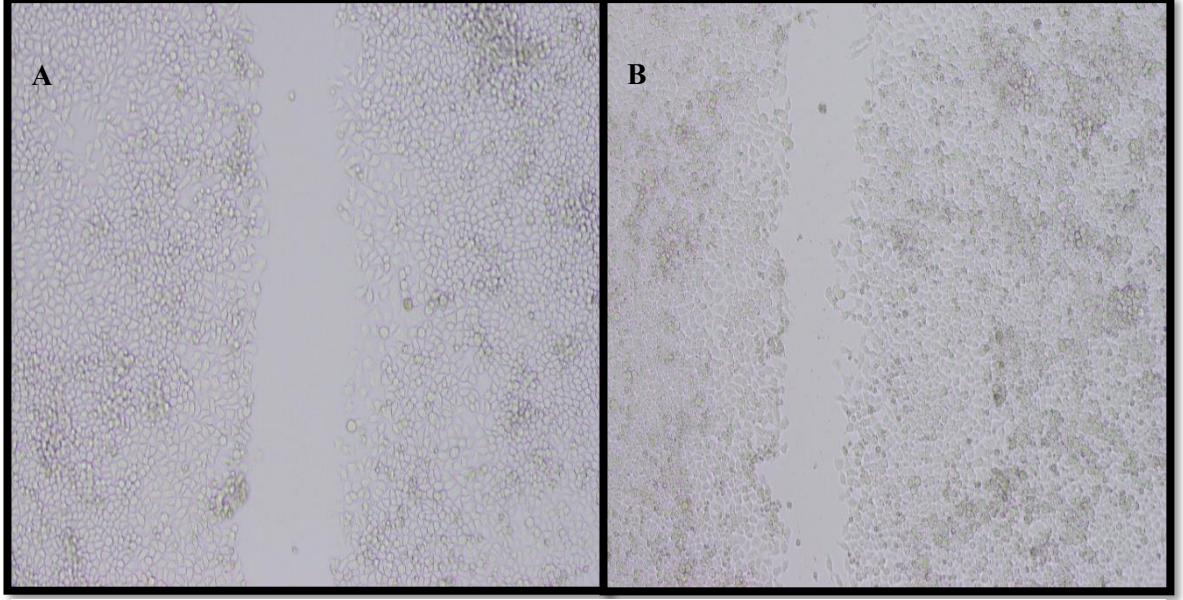
Şekil 4.33: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattında melittin uygulanmış gruba ait yara iyileştirme analizinin sonuçları (IC_{50} : $0,89 \mu M$) (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).

Melittin uygulanan duyarlı hücre gruplarında ise yara kapanma sürecinin kontrol grubuna kıyasla daha yavaş ilerlediği görülmüştür. Özellikle $IC_{50} \times 2$ dozunun uygulandığı grupta yara alanının kapanmasının daha sınırlı olduğu dikkat çekmiştir (Şekil 4.4.).



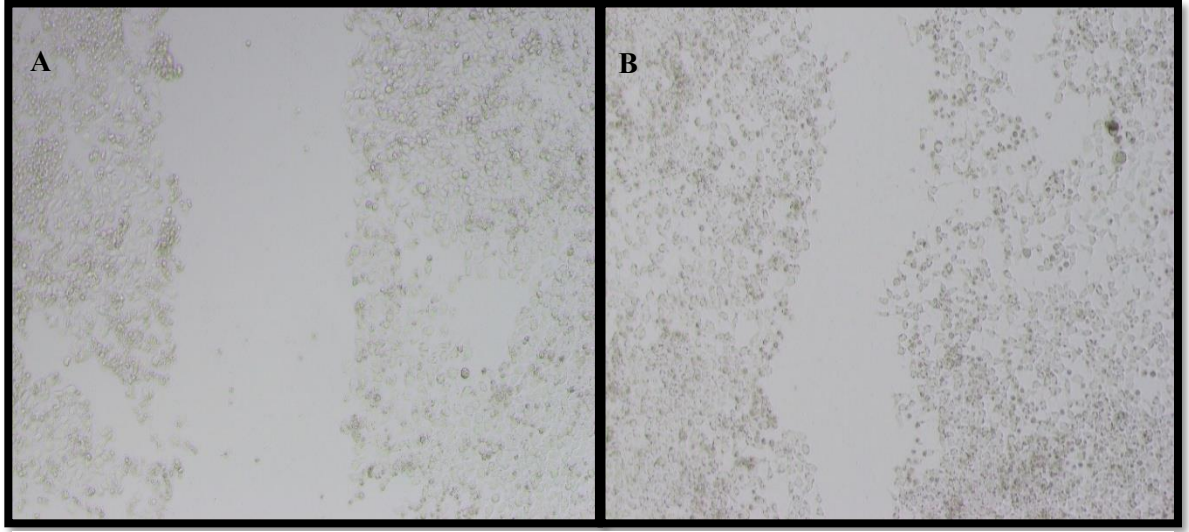
Şekil 4.4: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattında melittin uygulanmış gruba ait yara iyileştirme analizinin sonuçları ($IC_{50} \times 2$: $1,78 \mu M$) (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).

Sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hattına ait kontrol grubunda da benzer şekilde zamanla yara alanının hücre migrasyonu ile kapandığı gözlenmiştir. Dirençli hücre hattının kontrol grubuna ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.5'te gösterilmektedir.

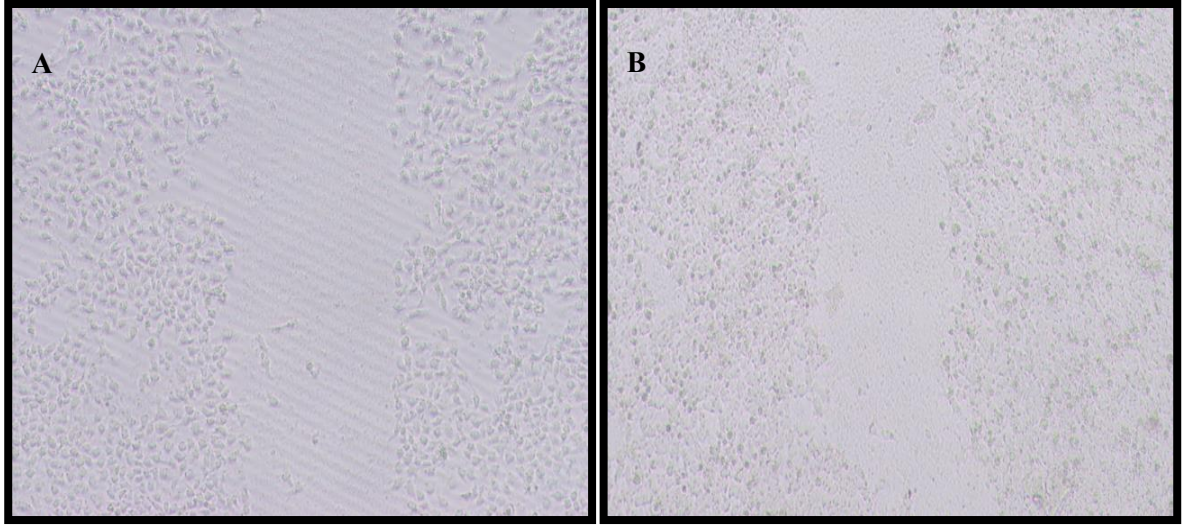


Şekil 4.5: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattı kontrol grubuna ait (melittin uygulanmamış) yara iyileştirme analizinin sonuçları (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).

Melittin uygulanmış sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hattında ise hücre migrasyonunun belirgin şekilde azaldığı ve yara alanının kontrol grubuna göre daha yavaş kapandığı gözlenmiştir. Melittinin IC_{50} (2.1 μM) ve $IC_{50 \times 2}$ (4,2 μM) konsantrasyonlarında uygulanması hücre göçünü inhibe etmiştir. Melittin uygulanmış dirençli hücre hattına ait temsili mikroskop görüntüleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.



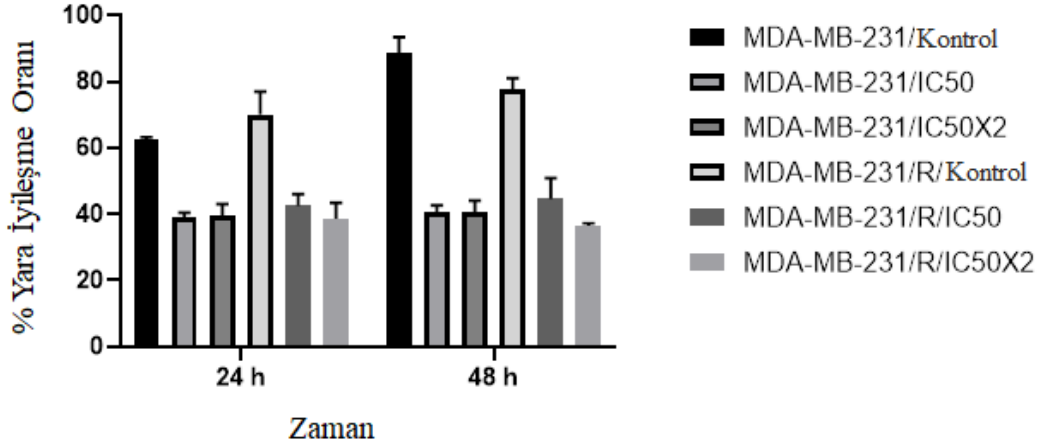
Şekil 4.6: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattında melittin uygulanmış gruba ait yara iyileştirme analizinin sonuçları (IC_{50} : 2,1 μ M) (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).



Şekil 4.7: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattında melittin uygulanmış gruba ait yara iyileştirme analizinin sonuçları ($IC_{50 \times 2}$: 4,2 μ M) (A. 24. saat; B. 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).

Şekil 4.8’de, melittinin sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyonu baskıladığı görülmektedir. Hücre göçü analizinde, her iki hücre grubunda da melittin uygulaması yara kapanma oranında azalmaya neden olmuştur. Sisplatin duyarlı hücrelerde kontrol grubuna kıyasla IC_{50} ve $IC_{50} \times 2$ dozlarında 24. saatte anlamlı azalma saptanmıştır (sırasıyla $p=0,021$ ve $p=0,013$). Aynı şekilde 48. saatte de kontrol grubuna göre

IC₅₀ ve IC₅₀ x2 gruplarında anlamlı azalma belirlenmiştir (sırasıyla p=0,006 ve p=0,008). Sisplatin dirençli hücrelerde de kontrol grubuna göre hem 24. saatte (p=0,041 ve p=0,028) hem de 48. saatte (p=0,036 ve p=0,012) anlamlı azalma saptanmıştır. Bu sonuçlar, melittinin her iki hücre grubunda da hücre göçünü inhibe ettiğini ortaya koymaktadır.



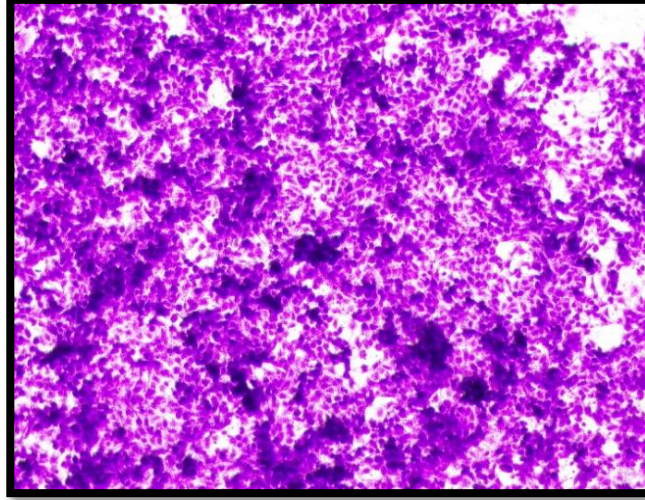
Şekil 4.8: Melittinin sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon grafiği (*p<0,05). (MDA-MB-231: duyarlı; MDA-MB-231/Kontrol: duyarlı kontrol; MDA-MB-231/R/Kontrol: dirençli kontrol; MDA-MB-231/R: dirençli).

4.3. İnvazyon Analizi Sonuçları

Melittinin MDA-MB-231 sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli hücre hatlarında invazyon ile ilişkili morfolojik değişimler üzerindeki etkisi Giemsa boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu kapsamda hücrelerin yüzeyde yayılım özellikleri ve hücre yoğunlukları farklı deney grupları arasında karşılaştırılmıştır.

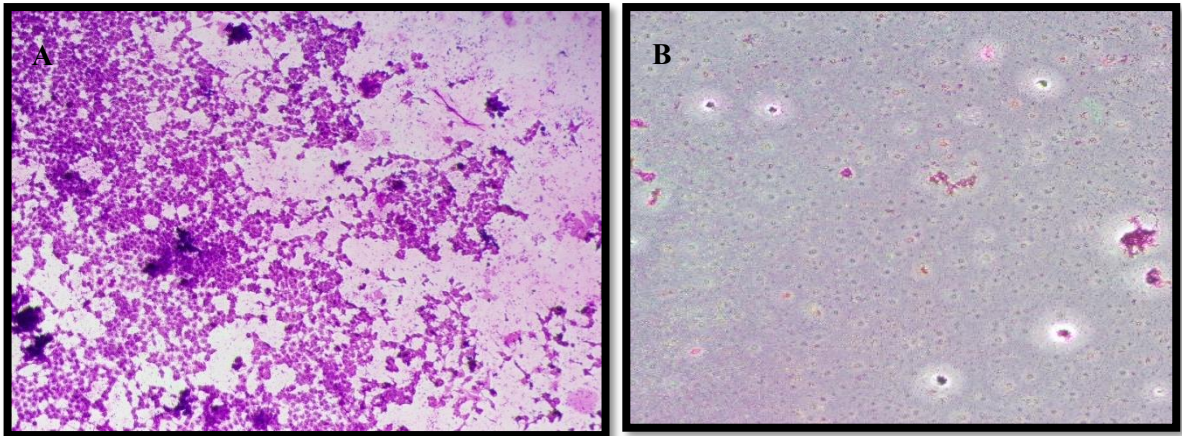
Çalışmada her iki hücre hattı için kontrol, IC₅₀ ve IC₅₀×2 olmak üzere toplam altı deney grubu incelenmiştir. Bu doğrultuda deney grupları; duyarlı kontrol, duyarlı IC₅₀, duyarlı IC₅₀×2, dirençli kontrol, dirençli IC₅₀ ve dirençli IC₅₀×2 olarak oluşturulmuştur.

MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattına ait kontrol grubunda elde edilen Giemsa boyama görüntülerinde, hücrelerin yüzeyde homojen dağıldığı ve yüksek yoğunlukta bulunduğu gözlenmiştir. 48 saatlik zaman noktasında karşılaştırıldığında hücre yoğunluğunun korunduğu ve hücrelerin yayılım özelliklerinde belirgin bir değişiklik olmadığı izlenmiştir (Şekil 4.9).



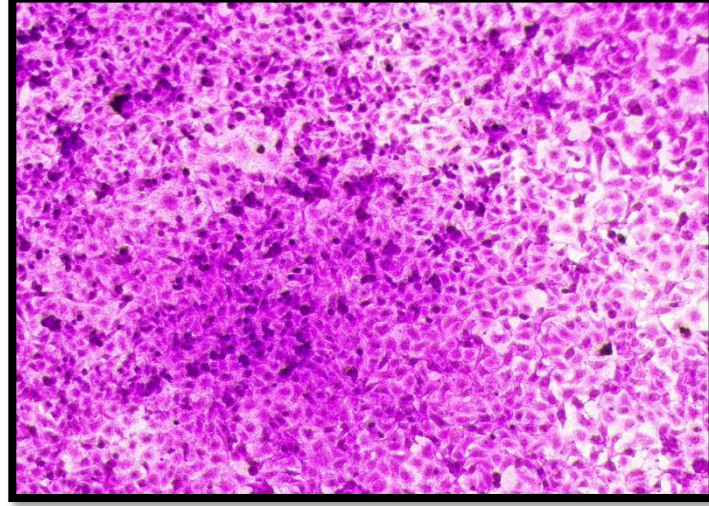
Şekil 4.9: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattı kontrol grubuna ait invazyon analizinin sonuçları (48. Saat 10X mikroskop görüntüsü).

MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattında IC_{50} dozunda ($0,89 \mu M$) melittin uygulanan gruplara ait görüntüler incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla hücre yoğunluğunda azalma olduğu görülmüştür. 48 saatlik zaman noktasında hücreler arası boşlukların arttığı ve hücre yayılımının azaldığı dikkat çekmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

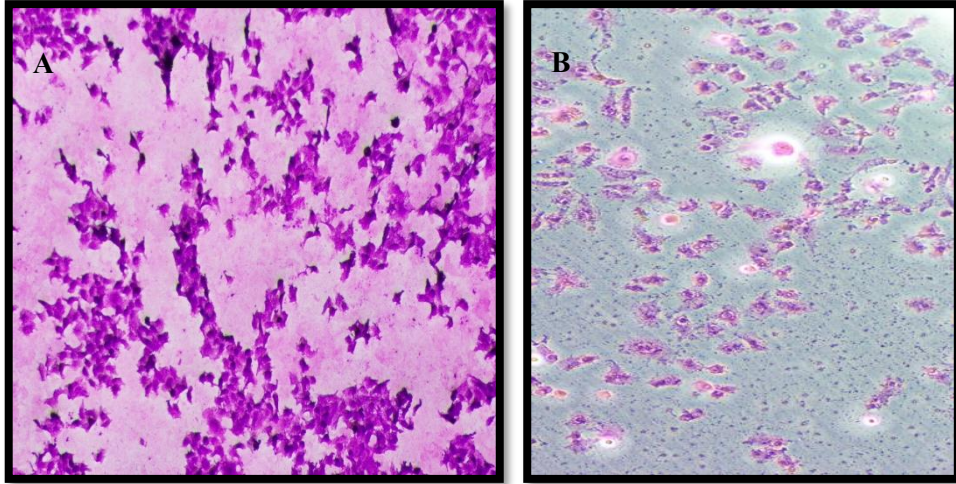


Şekil 4.10: MDA-MB-231 sisplatin duyarlı hücre hattında melittin uygulanmış gruplara ait invazyon analizinin sonuçları (IC_{50} : $0,89 \mu M$ (A); $IC_{50 \times 2}$: $1,78 \mu M$ (B); 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).

MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattında IC_{50} dozunda ($2,1 \mu M$) melittin uygulanan gruplara ait görüntüler incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla hücre yoğunluğunda azalma olduğu görülmüştür. 48 saatlik zaman noktasında hücreler arası boşlukların arttığı ve hücre yayılımının azaldığı dikkat çekmiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).

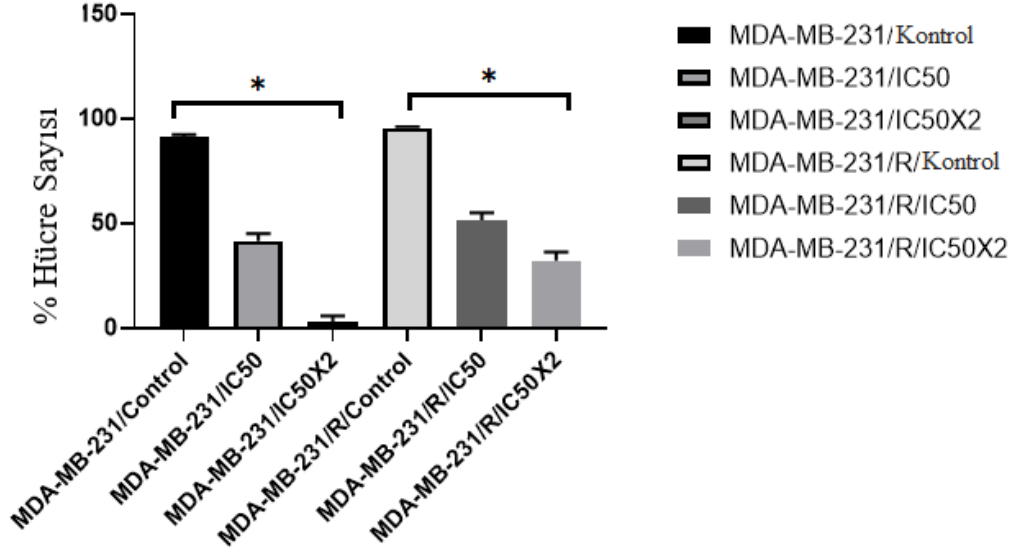


Şekil 4.11: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattı kontrol grubuna ait invazyon analizinin sonuçları (48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).



Şekil 4.12: MDA-MB-231 sisplatin dirençli hücre hattında melittin uygulanmış gruplara ait invazyon analizinin sonuçları (IC_{50} : $2,1 \mu M$ (A); $IC_{50} \times 2$: $4,2 \mu M$ (B); 48. saat; 10X mikroskop görüntüsü).

Sisplatin dirençli ve Sisplatin duyarlı grupların aynı 48 saatlik noktalardaki durumu kıyaslandığında sisplatin duyarlı hücrelerdeki yoğunluğun sisplatin dirençli hücrelere kıyasla yoğunluğun çok daha azalmış olduğu görülmüştür.



Şekil 4.13: Melittinin sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon analizi grafiği (*p<0,05).

Şekil 4.13.'te gösterilen boyama analizi sonuçlarına göre, MDA-MB-231 hücrelerinde uygulanan farklı dozların hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla IC₅₀ dozunda hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p=0,010). IC₅₀ x2 dozunda ise bu azalmanın daha belirgin olduğu ve ileri düzeyde anlamlılık gösterdiği saptanmıştır (p=0,001).

48 saatlik dirençli hücre grubunda elde edilen bulgular da benzer bir eğilim göstermektedir. Kontrol grubuna göre IC₅₀ dozunda hücre canlılığında anlamlı bir düşüş gözlenmiş (p=0,008), IC₅₀ x2 dozunda ise bu etkinin daha da arttığı ve yüksek düzeyde anlamlı olduğu belirlenmiştir (p=0,002).

Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, uygulanan ajanın hücre canlılığını doz bağımlı olarak azalttığı ve bu etkinin hem duyarlı hem de dirençli MDA-MB-231 hücre gruplarında sürdüğü ortaya konmuştur.

4.4. *BRMS1* ve *CTR1* Gen Ekspresyon Bulguları

Bu çalışmada sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında *BRMS1* ve *CTR1* genlerinin ekspresyon düzeyleri real-time PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler, relatif gen ekspresyon analizinde Livak yöntemi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemde hedef genlerin C_t değerleri housekeeping gen (β -aktin) ile normalize edilmiş (ΔC_t) ve kontrol grubuna göre karşılaştırılarak $\Delta\Delta C_t$ değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar kat değişimi olarak ifade edilmiştir (93).

4.4.1. *BRMS1* Ekspresyon Bulguları

BRMS1 genine ait ekspresyon sonuçları Tablo 4.1’de sunulmuş; *BRMS1* genine ait qRT-PCR amplifikasyon eğrileri, örneklerin döngü sayısına bağlı floresans değişimini gösterecek şekilde Şekil 4.14’te, referans gen olan *Beta-aktin*’e ait eğriler ise Şekil 4.15’te sunulmuştur.

24 saatlik uygulama süresine ait veriler incelendiğinde, sisplatin duyarlı hücrelerde IC_{50} dozunda (0,89 μM) 2,91 kat, $IC_{50}\times 2$ dozunda (1,78 μM) ise 1,85 kat ekspresyon artışı belirlenmiştir. Aynı zaman noktasında sisplatin dirençli hücrelerde IC_{50} dozunda (2,1 μM) 2,63 kat artış gözlenirken, $IC_{50}\times 2$ dozunda (4,2 μM) 0,83 kat değişim saptanmıştır. Kontrol gruplarında ise duyarlı hücrelerde 1,86 kat, dirençli hücrelerde 0,31 kat ekspresyon düzeyi elde edilmiştir (Tablo 4.1).

48 saatlik uygulamada, sisplatin duyarlı hücrelerde IC_{50} dozunda (0,89 μM) 3,13 kat, $IC_{50}\times 2$ dozunda (1,78 μM) 1,39 kat değişim belirlenmiştir. Sisplatin dirençli hücrelerde ise IC_{50} dozunda (2,1 μM) 1,43 kat, $IC_{50}\times 2$ dozunda (4,2 μM) 1,80 kat ekspresyon düzeyi ölçülmüştür. Kontrol gruplarında duyarlı hücrelerde 1,98 kat, dirençli hücrelerde ise 0,89 kat değerleri elde edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında *BRMS1* genine ait relatif ekspresyon sonuçları.

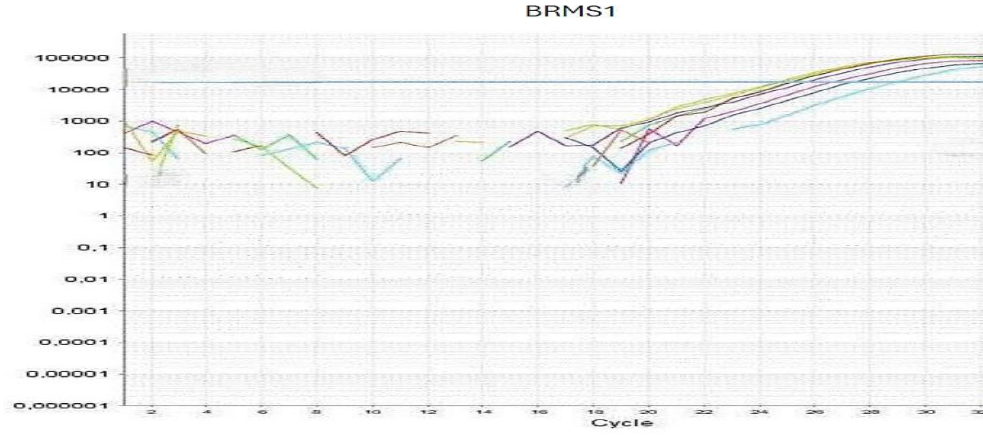
Hücre Hattı	Zaman	Uygulama	Kat Değişimi ($\Delta\Delta Ct$)
Duyarlı	24 saat	Kontrol	1,86
Dirençli	24 saat	Kontrol	0,31
Duyarlı	24 saat	IC ₅₀	2,91
Dirençli	24 saat	IC ₅₀	2,63
Duyarlı	24 saat	IC ₅₀ ×2	1,85
Dirençli	24 saat	IC ₅₀ ×2	0,83
Duyarlı	48 saat	Kontrol	1,98
Dirençli	48 saat	Kontrol	0,89
Duyarlı	48 saat	IC ₅₀	3,13
Dirençli	48 saat	IC ₅₀	1,43
Duyarlı	48 saat	IC ₅₀ ×2	1,39
Dirençli	48 saat	IC ₅₀ ×2	1,80

Duyarlı: Sisplatin duyarlı; Dirençli: Sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hattı.

Veriler birlikte değerlendirildiğinde, sisplatin duyarlı hücrelerde IC₅₀ dozunda her iki zaman noktasında da daha yüksek ekspresyon değerleri elde edildiği görülmektedir. IC₅₀×2 dozunda ise ekspresyon düzeylerinin IC₅₀ dozuna kıyasla daha düşük olduğu dikkat çekmektedir. Sisplatin dirençli hücrelerde ise ekspresyon düzeylerinin genel olarak daha dar bir aralıkta değiştiği ve özellikle kontrol grubunda daha düşük değerlerin elde edildiği gözlenmektedir.

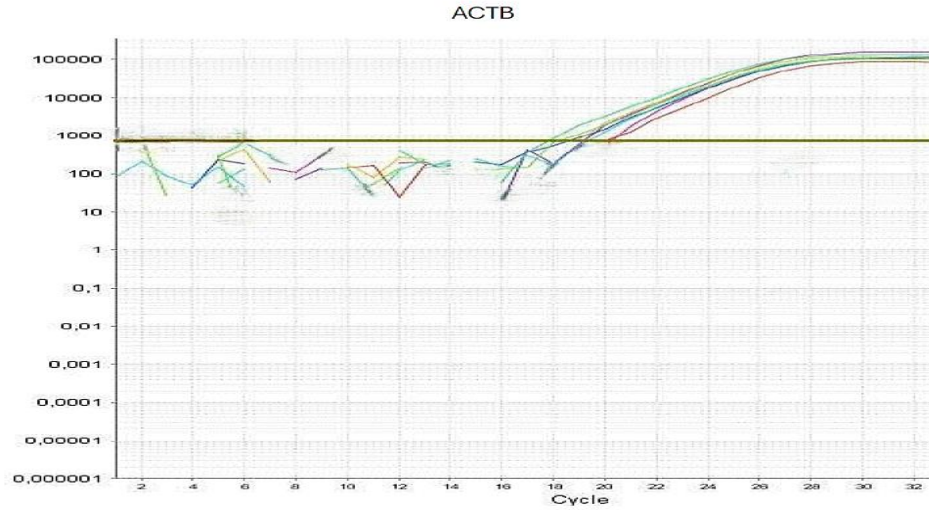
BRMS1 genine ait qRT-PCR amplifikasyon eğrileri ile referans gen (β -*aktin*) eğrileri sırasıyla Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te sunulmuştur.

Amplification Plot (ΔR_n vs. Cycle)



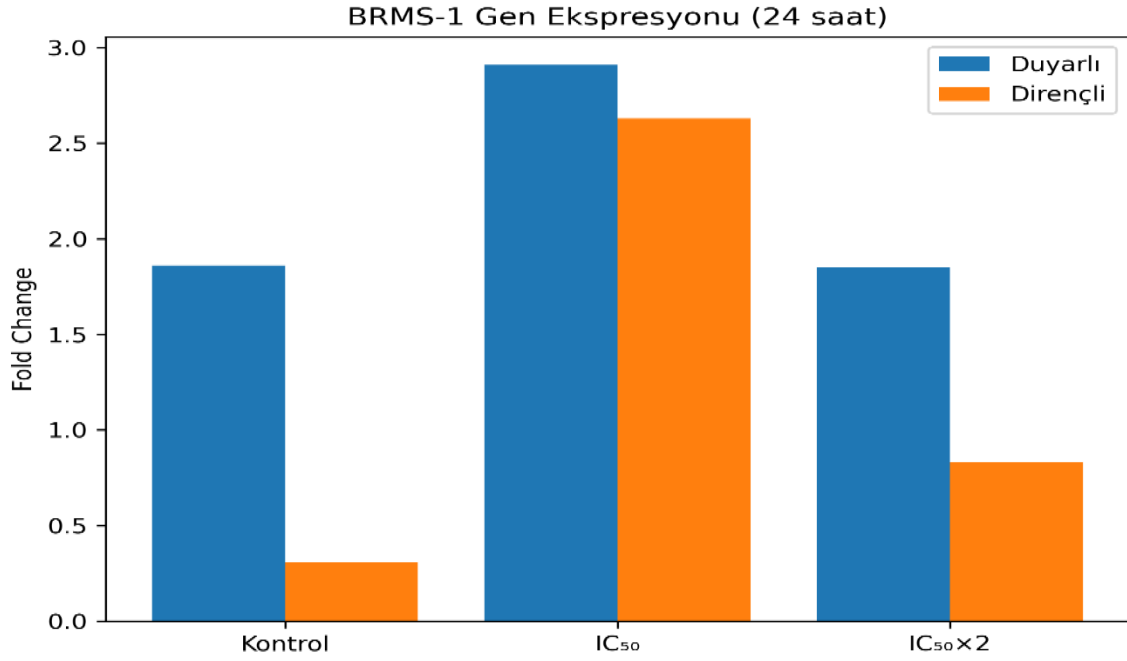
Şekil 4.14: *BRMS1* gen ekspresyonuna ait qRT-PCR amplifikasyon eğrileri

Amplification Plot (ΔR_n vs. Cycle)

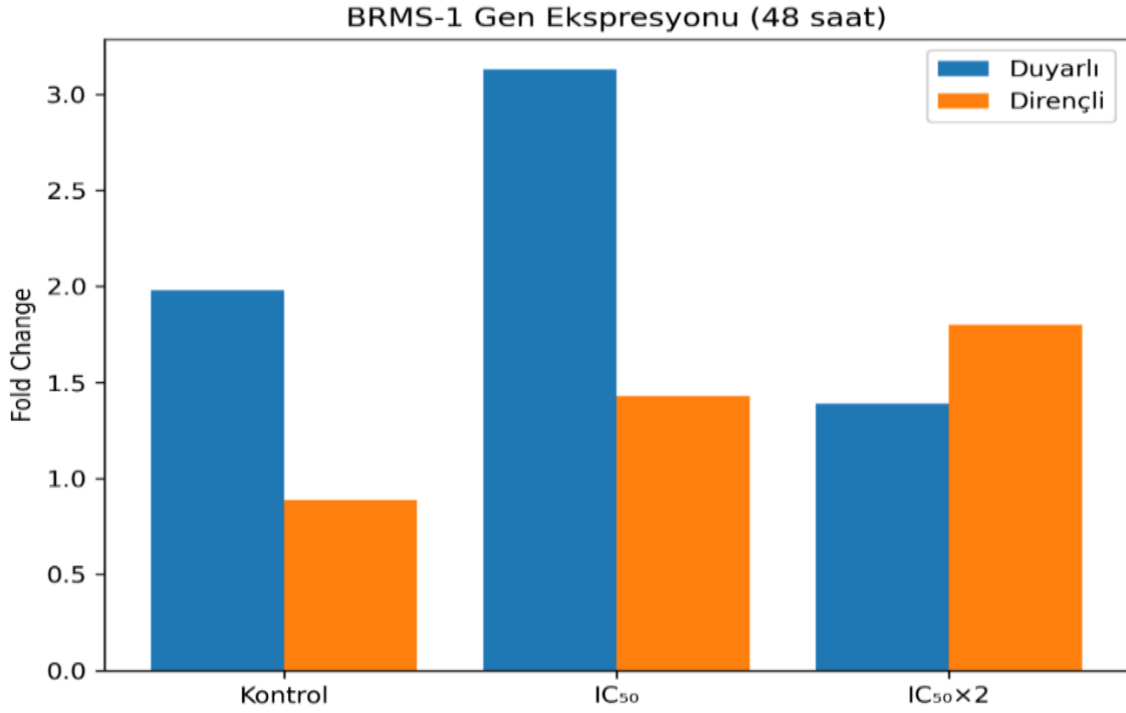


Şekil 4.15: Beta-aktin referans genine ait qRT-PCR amplifikasyon eğrileri.

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17 incelendiğinde, *BRMS1* gen ekspresyonunun zaman ve uygulanan dozlara bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve sisplatin duyarlı ile dirençli hücreler arasında farklılık bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.16: *BRMS1* gen ekspresyonunun 24 saat sonunda sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde karşılaştırılması.



Şekil 4.17: *BRMS1* gen ekspresyonunun 48 saat sonunda sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde karşılaştırılması.

Bu sonuçlar doğrultusunda *BRMS1* genine ait ekspresyon değişimleri zamana ve doza bağlı olarak ortaya konulmuş olup, *CTR1* gen ekspresyonuna ilişkin bulgular bir sonraki bölümde verilmiştir.

4.4.2. *CTR1* Ekspresyon Bulguları

CTR1 genine ait ekspresyon sonuçları Tablo 4.2’de sunulmuş; *CTR1* genine ait qRT-PCR amplifikasyon eğrileri, örneklerin döngü sayısına bağlı floresans değişimini gösterecek şekilde Şekil 4.18’de sunulmuştur.

24 saatlik uygulamada sisplatin duyarlı hücrelerde IC₅₀ dozunda (0,89 µM) 2,73 kat, IC₅₀×2 dozunda (1,78 µM) 3,01 kat artış belirlenmiştir. Dirençli hücrelerde ise IC₅₀ dozunda (2,1 µM) 0,90 kat, IC₅₀×2 dozunda (4,2 µM) 1,41 kat değişim saptanmıştır. Kontrol gruplarında duyarlı hücrelerde 2,18 kat, dirençli hücrelerde ise 0,63 kat ekspresyon düzeyi ölçülmüştür (Tablo 4.2).

48 saatlik uygulamada duyarlı hücrelerde IC_{50} dozunda ($0,89 \mu M$) 1,46 kat, $IC_{50} \times 2$ dozunda ($1,78 \mu M$) 3,05 kat değişim belirlenmiştir. Dirençli hücrelerde ise IC_{50} dozunda ($2,1 \mu M$) 2,23 kat, $IC_{50} \times 2$ dozunda ($4,2 \mu M$) 1,57 kat ekspresyon düzeyi saptanmıştır. Kontrol gruplarında duyarlı hücrelerde 0,89 kat, dirençli hücrelerde ise 0,82 kat değerleri elde edilmiştir (Tablo 4.2).

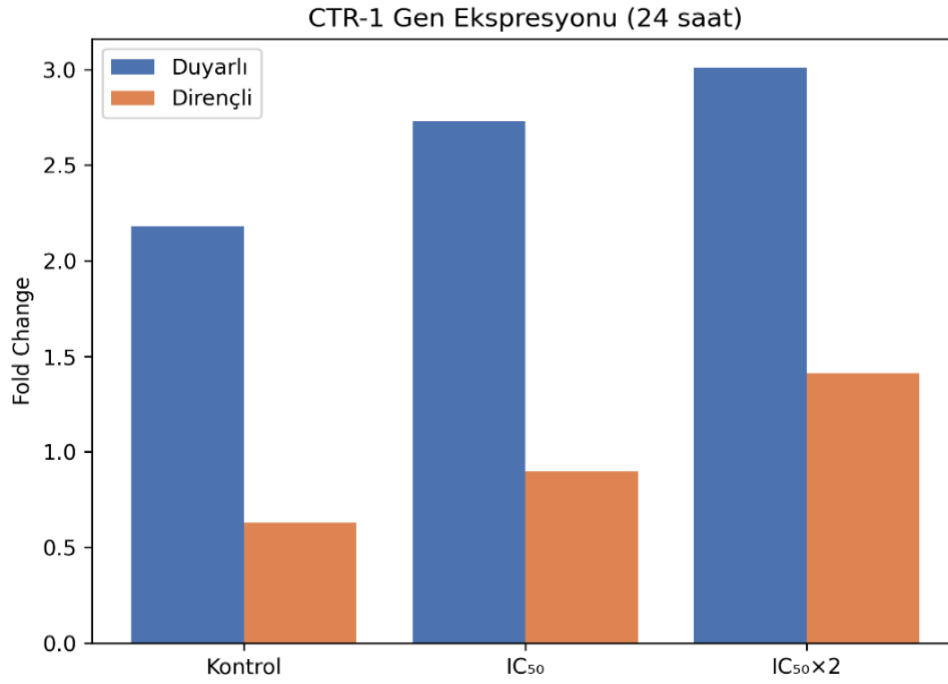
Tablo 4.2: Sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatlarında *CTR1* genine ait relatif ekspresyon sonuçları.

Hücre Hattı	Zaman	Uygulama	Kat Değişimi ($\Delta\Delta Ct$)
Duyarlı	24 saat	Kontrol	2,18
Dirençli	24 saat	Kontrol	0,63
Duyarlı	24 saat	IC_{50}	2,73
Dirençli	24 saat	IC_{50}	0,90
Duyarlı	24 saat	$IC_{50} \times 2$	3,01
Dirençli	24 saat	$IC_{50} \times 2$	1,41
Duyarlı	48 saat	Kontrol	0,89
Dirençli	48 saat	Kontrol	0,82
Duyarlı	48 saat	IC_{50}	1,46
Dirençli	48 saat	IC_{50}	2,23
Duyarlı	48 saat	$IC_{50} \times 2$	3,05
Dirençli	48 saat	$IC_{50} \times 2$	1,57

Duyarlı: Sisplatin duyarlı; Dirençli: Sisplatin dirençli MDA-MB-231 hücre hattı.

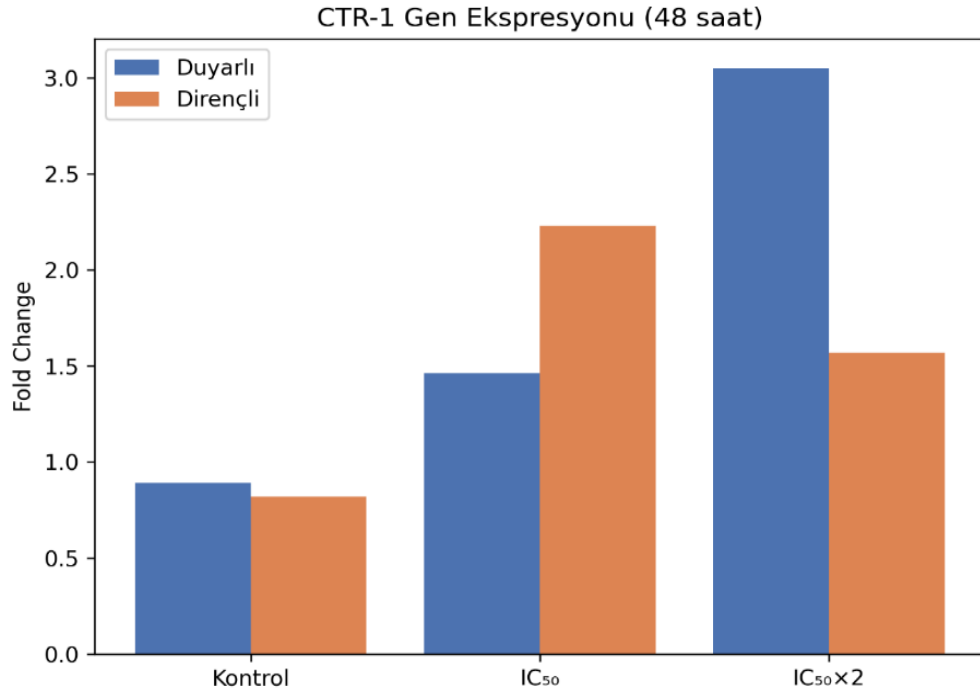
Veriler birlikte değerlendirildiğinde, *CTR1* gen ekspresyonunun özellikle $IC_{50} \times 2$ dozunda daha yüksek değerler aldığı ve bu artışın her iki zaman noktasında da devam ettiği görülmektedir. IC_{50} dozunda ise ekspresyon artışının daha sınırlı olduğu gözlenmektedir. Sisplatin dirençli hücrelerde ise ekspresyon düzeylerinin daha dar bir aralıkta değiştiği ve bazı koşullarda kontrol değerlerine yakın seyrettiği dikkat çekmektedir.

CTR1 genine ait qRT-PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.18’de sunulmuştur.



Şekil 4.19: *CTR1* gen ekspresyonunun 24 saat sonunda sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde karşılaştırılması.

Şekil 4.19 ve Şekil 4.20 incelendiğinde, *CTR1* gen ekspresyonunun doz ve zamana bağlı olarak değiştiği ve hücre tipine göre farklılık gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.20: *CTR1* gen ekspresyonunun 48 saat sonunda sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde karşılaştırılması.

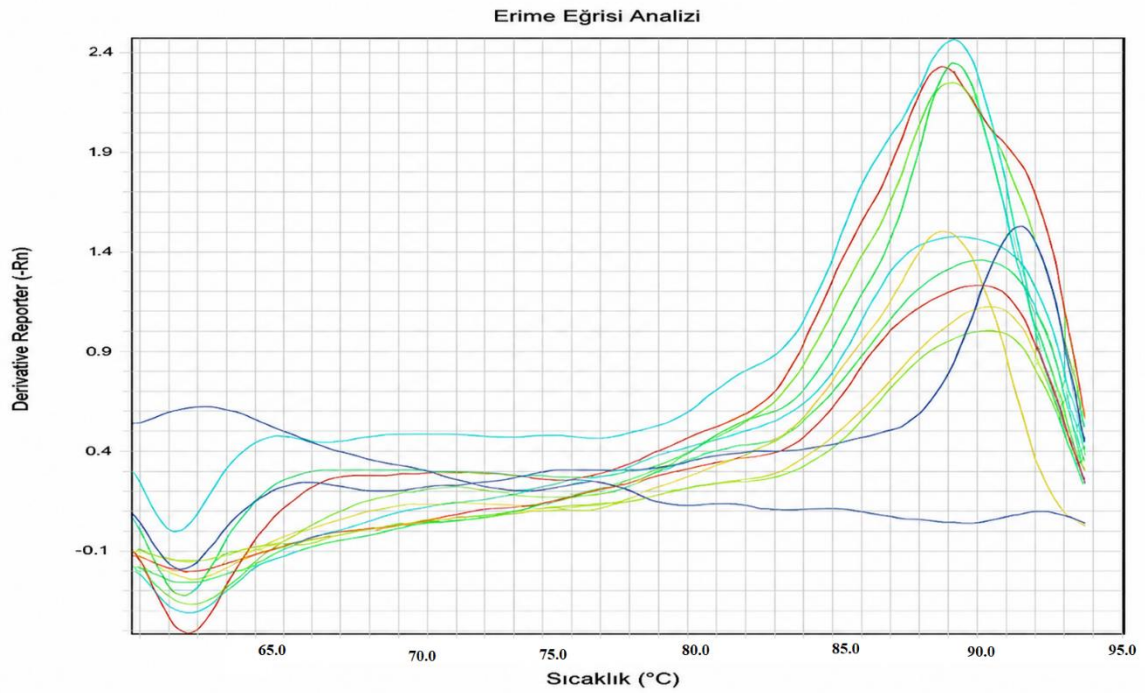
Elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, *BRMS1* ve *CTR1* gen ekspresyon düzeylerinin sisplatin duyarlı ve dirençli MDA-MB-231 hücre hatları arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).

BRMS1 gen ekspresyonu değerlendirildiğinde, melittin uygulamasının sisplatin duyarlı MDA-MB-231 hücrelerinde hem IC₅₀ hem de IC₅₀ x 2 dozlarında kontrol grubuna kıyasla artış eğilimi gösterdiği ve bu artışın özellikle IC₅₀ dozunda daha belirgin olduğu saptanmıştır (p<0,05). Buna karşılık, sisplatin dirençli hücrelerde *BRMS1* ekspresyonunun doz bağımlı olarak değişkenlik gösterdiği; IC₅₀ dozunda artış eğilimi gözlenirken, IC₅₀ x 2 dozunda ekspresyon düzeyinde azalma meydana geldiği ve bu değişimlerin bazı koşullarda istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (p>0,05).

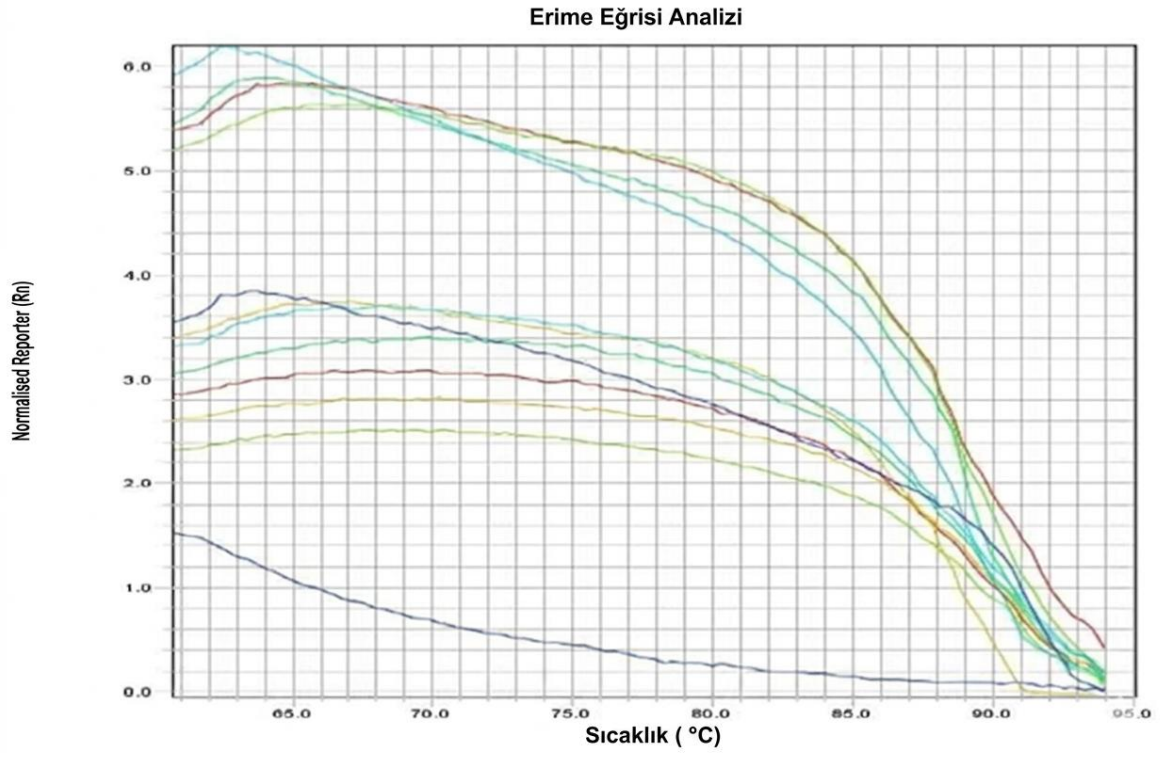
CTR1 gen ekspresyonu incelendiğinde ise, melittin uygulamasının sisplatin duyarlı hücrelerde özellikle IC₅₀ x 2 dozunda belirgin artışlara yol açtığı ve bu artışların genel olarak istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptanmıştır (p<0,05). Buna karşın, sisplatin dirençli hücrelerde *CTR1* ekspresyonunun daha heterojen bir dağılım sergilediği; bazı uygulamalarda

artış gözlenmesine rağmen bu değişimlerin çoğunlukla istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Ayrıca, qRT-PCR analizlerinde elde edilen amplifikasyon ürünlerinin özgülüğünü değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen erime eğrisi (melt curve) analizleri Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de sunulmuştur. Elde edilen eğrilerde örneklerin büyük çoğunluğunda benzer erime sıcaklıklarında tek baskın pik gözlenmiş olup, bu durum amplifikasyonun özgülüğünü desteklemektedir.



Şekil 4.21: qRT-PCR analizine ait türev (derivative) erime eğrisi grafiği.



Şekil 4.22: qRT-PCR analizine ait normalize edilmiş erime eğrisi grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada ve özellikle gelişmiş ülkelerde yaşanan tüm ölümler içerisinde kanserin payı oldukça büyüktür ve bu pay giderek artmaktadır. Kanser vakalarının sayısı arttıkça yeni teşhis ve tedavi yöntemlerine duyulan ihtiyaç bitkisel tıp, akupunktur ve apiterapi gibi alternatif tedavi yöntemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Geliştirilen yeni tedavilerin klasik tedaviler ile uyumlarının test edilmesi, yan etkilerinin belirlenmesi ve oluşturabilecekleri istenmeyen etkilerden kaçınılması son derece önemlidir (13).

Meme kanseri, tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olup tüm kanser ölümleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanseri tedavisinde cerrahi girişim ve radyoterapinin yanı sıra kemoterapi de önemli yer tutmaktadır. Son yıllarda modern kemoterapi şemaları geliştirilmesine rağmen tatmin edici bir başarı elde edilememiştir (13). Bu doğrultuda hazırlanan tez çalışmasında arı zehri bileşiklerinden melittinin, sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) *BRMS1* ve *CTR1* genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri değerlendirilerek, metastazın baskılanması ve sisplatin alımının düzenlenmesi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Arı zehri ve aktif bileşeni melittinin bilinen terapötik özellikleri, onları kendi başlarına potansiyel anti-kanser ajanları veya kanser kemoterapisi için adjuvanlar olarak uygun adaylar haline getirmektedir. Son çalışmalar, melittinin antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antiviral aktivitelere ek olarak, farklı malign hücrelerde apoptoz başlatma ve büyüme inhibisyonu dahil olmak üzere farklı kanser karşıtı özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir (85). Melittinin tüm bu antikanser özelliklerin dışında hücre zarını daha kırılgan hale getirerek dirençli kanser hücrelerinin sisplatine olan duyarlılığını artırdığına dair çalışmalar da mevcuttur (15).

Bu çalışmada, melittinin üçlü negatif meme kanseri modeli olarak yaygın şekilde kullanılan MDA-MB-231 hücre hattının sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli alt tipleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, melittinin hücre canlılığı, hücre göçü ve invazyon ile ilişkili davranışlar ile *BRMS1* ve *CTR1* gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri

analiz edilmiştir. Çalışmanın temel amacı, melittinin yalnızca sitotoksik etkilerini ortaya koymakla sınırlı kalmayıp, aynı zamanda sisplatin direnci ve metastatik potansiyel ile ilişkili moleküler süreçler üzerindeki olası düzenleyici rolünü değerlendirmektir.

Bu kapsamda *BRMS1* ve *CTR1* genlerinin seçilmesi, kanser progresyonunun iki kritik biyolojik basamağını temsil etmeleri açısından önem taşımaktadır. *BRMS1*, metastaz baskılayıcı bir tümör baskılayıcı gen olup, özellikle NF-κB sinyal yollarını modüle ederek hücre göçü, invazyon ve anjiyogenez gibi metastazla ilişkili süreçleri baskılamaktadır (61). Buna karşılık *CTR1*, hücre membranında bulunan yüksek afiniteli bir taşıyıcı protein olup fizyolojik olarak bakır taşınımında görev almakta ve aynı zamanda sisplatin gibi platin bazlı kemoterapötik ajanların hücre içine alımında önemli rol oynamaktadır. *CTR1* ekspresyon düzeyindeki azalma, hücre içi sisplatin birikimini sınırlayarak kemoterapiye karşı direnç gelişimine katkıda bulunabilmektedir (18,74).

Bu nedenle, söz konusu iki genin birlikte incelenmesi hem metastatik kapasitenin hem de kemoterapötik ajanlara verilen hücresel yanıtın aynı deneysel model içerisinde değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu bağlamda *BRMS1* 'in analizi, metastaz baskılanması ile ilişkili moleküler değişimlerin izlenmesine olanak tanırken; *CTR1*'in değerlendirilmesi ise sisplatin hücre alımı ve buna bağlı ilaç yanıtındaki olası değişimlerin yorumlanmasına katkı sağlamaktadır (94, 74, 18). Elde edilen bulgular, melittinin hem sisplatin duyarlı hem de dirençli hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığını ve hücre göçü/metastaz ile ilişkili davranışları baskıladığını gösteren önceki çalışmalarla uyumlu olup, çalışmamızda ayrıca *BRMS1* ve *CTR1* gen ekspresyon düzeylerinde doza ve zamana bağlı değişiklikler gözlenmiştir (17, 83, 95).

Çalışmanın önemli bulgularından biri, melittinin her iki hücre hattında da doz bağımlı sitotoksik etki göstermesidir. XTT analizi sonucunda melittinin IC₅₀ değeri sisplatin duyarlı hücrelerde 0,89 µM iken sisplatin dirençli hücrelerde ise 2,1 µM olarak belirlenmiş; hücre canlılığındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.1, p<0,01). Bu bulgu, melittinin her iki hücre tipinde de etkili olduğunu, ancak sisplatin dirençli hücrelerde benzer sitotoksik etkinin elde edilebilmesi için daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulduğunu düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlar, melittinin agresif meme kanseri alt tiplerinde belirgin sitotoksik etki oluşturduğunu bildiren önceki çalışmalarla uyumludur. Özellikle Ciara Duffy ve ark. [83]

bal arısı zehri ve melittinin üçlü negatif ve HER2-pozitif meme kanseri hücrelerinde hızlı ve seçici hücre ölümü oluşturduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, Salimian ve ark. [95] melittinin kanser hücrelerine karşı toksisitesini incelemek amacıyla MTT testi uygulamış ve melittine maruz kalan hücrelerde önemli derecede hücre ölümü gerçekleştiğini görmüşlerdir. Yara deneyi yaptıklarında ise çalışmamızla uyumlu olarak melittin seviyelerindeki artışla birlikte hücre göç hızı azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, melittinin yalnızca membran bozucu etkilerle sınırlı kalmayıp; mitokondriyal yolaklar üzerinden apoptozu indüklediği, hücre proliferasyonunu baskıladığı ve *PI3K/Akt* ile *MAPK* gibi hücresel sinyal yollarını modüle ederek antikanser etki gösterdiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (85).

Öte yandan, çalışmamızda sisplatin dirençli hücrelerde daha yüksek IC_{50} değerinin elde edilmesi, dirençli üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin artmış hücresel adaptasyon kapasitesi, metabolik yeniden programlanma ve stres toleransı ile karakterize olduğunu bildiren güncel literatür ile uyumludur (96, 97). Bu durum, dirençli hücrelerin yalnızca klasik kemoterapötik ajanlara değil, aynı zamanda membran-aktif peptitlere karşı da göreceli bir tolerans geliştirebileceğini düşündürmektedir.

Dirençli hücre hattının melittine karşı göreceli olarak daha az duyarlı bulunması, çalışmamız açısından önemli bir bulgudur. Bu durum yalnızca daha yüksek doz gereksinimi ile açıklanmayıp, kemoterapi direncine eşlik eden adaptif hücresel değişimlerle de ilişkili olabilir. Nitekim sisplatine dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde metabolik yeniden programlanma, antioksidan savunma mekanizmalarında değişim, apoptozla ilişkili yollarla yeniden düzenlenme ve bazı sinyal iletim ağlarında farklılaşma tanımlanmıştır; bu değişimler dirençli fenotipin hücresel strese karşı daha dayanıklı hale gelmesine katkıda bulunabilir (98-100). Bu nedenle, melittinin temel etkisi hücre zarı bütünlüğü ve hücre ölümü sinyalleri üzerinden gelişse bile, sisplatine dirençli hücre hattının bu etkilere daha sınırlı yanıt vermesi beklenen bir durum olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte, dirençli hücrelerde etkinin tamamen ortadan kalkmamış olması da dikkate değerdir; çünkü bu bulgu, melittinin yalnızca klasik kemoterapiye duyarlı hücrelerde değil, dirençli fenotipte de biyolojik aktivitesini en azından kısmen koruyabildiğini düşündürmektedir. Melittinin hücre ölümü oluşturma kapasitesinin agresif meme kanseri alt tiplerinde de sürdüğünü gösteren veriler bu yorumu desteklemektedir (83).

Hücre göçü bulguları, melittinin antimetastatik potansiyeli açısından çalışmamızın önemli sonuçlarından birini oluşturmaktadır. Yara iyileştirme analizi sonucunda, melittin uygulanan gruplarda yara kapanmasının kontrol gruplarına kıyasla daha yavaş gerçekleştiği ve bu etkinin özellikle yüksek dozlarda daha belirgin hale geldiği gözlenmiştir. Tez kapsamında elde edilen bulgular ve temsili mikroskop görüntüleri hem sisplatin duyarlı hem de dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde hücre göçünün baskılandığını göstermektedir.

Bu sonuçlar, melittinin MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyonu baskıladığını bildiren çalışmalarla uyumludur. Özellikle, EGF ile uyarılmış MDA-MB-231 hücrelerinde melittinin migrasyonu anlamlı şekilde azalttığını ve bu etkinin SDF-1 α /CXCR4 ile Rac1 ilişkili sinyal yollarının baskılanmasıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada melittinin metastazla ilişkili gen ekspresyonunu modüle ederek antimetastatik etki gösterebildiği de rapor edilmiştir (17).

Bu sonuçların yorumlanmasında dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta, gözlenen göç baskılanmasının yalnızca genel sitotoksiteye bağlı olmayabileceğidir. Melittin, hücre zarına etki eden bir peptit olmasının yanı sıra, hücre adezyonu, hücre iskeleti organizasyonu ve hücreler arası sinyal iletim yollarını da etkileyebilen çok yönlü bir molekül olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, mevcut çalışmada yara iyileştirme analizinin IC₅₀ ve üzeri dozlarda gerçekleştirilmiş olması nedeniyle, gözlenen etkinin kısmen azalmış hücre canlılığından kaynaklanabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Literatürde, meme kanseri hücrelerinde migrasyon ve invazyonun *PI3K/Akt*, *NF- κ B* ve *CXCR4* gibi sinyal yolları ile yakından ilişkili olduğu ve bu yolların baskılanmasının hücreler arası motiliteyi azalttığı gösterilmiştir (101, 102). Bu bağlamda, melittinin bu sinyal ağlarını hedefleyerek yalnızca proliferasyonu değil, aynı zamanda tümör hücrelerinin hareket ve yayılım kapasitesini de sınırlayabileceği düşünülmektedir.

İnvazyon ile ilişkili bulgular da genel olarak hücre göçü verilerini destekler niteliktedir. Giemsa boyama temelli değerlendirmede, melittin uygulanan gruplarda hücre yoğunluğunun azaldığı, hücreler arası boşlukların arttığı ve yüzeyde yayılımın daha sınırlı olduğu gözlenmiştir. Özellikle IC₅₀×2 dozunda bu değişimlerin daha belirgin hale gelmesi, melittinin hücreler arası yayılım ve invazyon ile ilişkili davranışları baskılayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca tez kapsamında yapılan nicel boyama analizinde kontrol ve melittin grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p<0,05) gösterilmiştir.

Literatürde ayrıca, meme kanseri hücrelerinde invazyonun MMP-2 ve MMP-9 gibi matriks metalloproteinazlar ile yakından ilişkili olduğu ve bu proteinlerin baskılanmasının invaziv kapasiteyi azalttığı iyi bilinmektedir (103, 104). Melittinin de bu tür yolakları modüle ederek invazyonu dolaylı olarak baskılayabileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte, bu morfolojik bulguların hücre canlılığı, göç ve gen ekspresyon verileri ile değerlendirilmesi, melittinin yalnızca sitotoksik bir ajan olmadığını, aynı zamanda metastatik fenotip ile ilişkili hücresel süreçleri de baskılayabilen çok yönlü bir biyolojik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Bu nokta, *BRMS1* geninin çalışmaya dahil edilmesini de anlamlı kılmaktadır. Metastaz baskılayıcı bir gen olan *BRMS1* geninin ekspresyonundaki değişimlerin değerlendirilmesi, fenotipik olarak gözlenen göç baskılanmasının moleküler düzeyde desteklenip desteklenmediğinin ortaya konulmasına katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızın en dikkat çekici moleküler bulgularından biri *BRMS1* gen ekspresyonundaki değişimdir. *BRMS1*, meme kanserinde metastaz baskılayıcı rolü iyi tanımlanmış genlerden biri olup, düşük ekspresyonunun kötü prognoz, artmış migrasyon ve invazyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *BRMS1*'in özellikle *NF-κB* aracılı sinyal yolaklarını baskılayarak metastazla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlediği ve hücresel motiliteyi sınırladığı bilinmektedir (61). Yang ve ark. [68] yapmış olduğu çalışmanın da benzer sonuçlara ulaştığı görülmektedir. Çalışmada yüksek metastatik potansiyele sahip MDA-MB-231HM hücrelerinde *BRMS1*'in aşırı ekspresyonunun hücre göçünü anlamlı düzeyde inhibe ettiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, *BRMS1*'in meme kanserinde metastaz baskılayıcı bir gen olarak önemli bir düzenleyici rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda *BRMS1* ekspresyonunun özellikle sisplatin duyarlı hücrelerde IC₅₀ dozunda belirgin şekilde arttığı (24 saatte 2,91 kat; 48 saatte 3,13 kat) saptanmıştır. Sisplatin dirençli hücrelerde de artış eğilimi gözlenmiş olmakla birlikte, bu değişimin daha sınırlı ve değişken olduğu görülmüştür. Bu bulgular, melittinin metastaz baskılayıcı gen programı üzerinde düzenleyici bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Nitekim melittin ve arı zehri uygulamasının meme kanseri hücrelerinde *BRMS1* ekspresyonunu artırabildiği yakın tarihli bir çalışmada da gösterilmiştir (17). Elde edilen *BRMS1* bulguları, çalışmamızda fenotipik olarak gözlenen göç ve invazyon ile ilişkili baskılanmanın yalnızca morfolojik düzeyde

değil, aynı zamanda metastazla ilişkili gen ekspresyonu düzeyinde de karşılık bulduğunu göstermektedir.

BRMS1 sonuçlarında dikkat çeken bir diğer nokta, ekspresyon artışının en belirgin şekilde IC_{50} dozunda görülmesi, $IC_{50} \times 2$ dozunda ise aynı düzeyde devam etmemesidir. Bu durum, yüksek dozda oluşan yoğun hücresel stresin bazı genlerin transkripsiyonel yanıtını baskılayabilmesi ile ilişkili olabilir. Orta düzey stres koşullarında adaptif gen yanıtlarının daha düzenli şekilde ortaya çıkabildiği, buna karşın yüksek sitotoksik basınç altında hücresel homeostazın bozulmasıyla birlikte transkripsiyonel düzenin daha düzensiz hale gelebildiği bilinmektedir (99).

Ayrıca *BRMS1* biyolojisinin yalnızca mRNA düzeyi ile sınırlı olmadığı; kromatin yeniden düzenlenmesi, protein stabilitesi ve post-translasyonel mekanizmalarla da kontrol edildiği gösterilmiştir (61). Bu nedenle çalışmamızda IC_{50} ve $IC_{50} \times 2$ dozları arasında gözlenen farklılık, yalnızca doz artışı ile açıklanabilecek lineer bir yanıtı değil, hücre içi düzenleyici ağların dinamik yapısını yansıtan daha kompleks bir biyolojik süreci işaret etmektedir.

CTR1 sonuçları, çalışmanın sisplatin direnci açısından en önemli moleküler boyutlarından birini oluşturmaktadır. *CTR1*, fizyolojik olarak bakır taşınımında görev alan yüksek afiniteli bir taşıyıcı olup, aynı zamanda sisplatin gibi platin bazlı kemoterapötik ajanların hücre içine alımında rol oynadığı gösterilmiştir (74). Bununla birlikte, *CTR1*'in sisplatin alımındaki rolü önemli olmakla birlikte, hücre içi birikimin yalnızca bu taşıyıcıya bağlı olmadığı ve çok sayıda hücresel mekanizmanın sürece katkı sağladığı da bilinmektedir (99).

Çalışmamızda *CTR1* ekspresyonunun özellikle $IC_{50} \times 2$ dozunda daha belirgin artış gösterdiği saptanmıştır. Duyarlı hücrelerde 24 saatte $IC_{50} \times 2$ dozunda 3,01 kat, 48 saatte ise 3,05 kat artış elde edilmiştir. Dirençli hücrelerde ise 24 saatte daha sınırlı bir yanıt gözlenirken, 48 saatte ekspresyon artışının belirginleştiği görülmüştür. Bu bulgular, melittinin sisplatin taşınımı ile ilişkili moleküler süreçleri etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde *CTR1* ekspresyonunun ve özellikle hücre zarındaki lokalizasyonunun sisplatin birikimi ve hücresel duyarlılık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18, 74). Bununla birlikte, *CTR1* biyolojisinin yalnızca total ekspresyon düzeyi ile açıklanamayacağı; protein lokalizasyonu, endositoz, bakır homeostazı ve hücresel stres yanıtları gibi çok sayıda faktör tarafından düzenlendiği bilinmektedir (99).

Bu nedenle çalışmamızda melittin sonrası gözlenen *CTRI* ekspresyon artışı, özellikle dirençli TNBC modelinde, sisplatin alımına elverişli bir moleküler yeniden düzenlenmeyi işaret edebilir. Ancak bu bulgunun doğrudan artmış ilaç alımı veya duyarlılık ile sonuçlandığını söyleyebilmek için protein düzeyi, membran lokalizasyonu ve fonksiyonel ilaç birikimi analizleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

Öte yandan *CTRI*'in bakır homeostazındaki temel rolü göz önüne alındığında, bu genin ekspresyonundaki değişikliklerin yalnızca ilaç taşınımı ile değil, hücresel stres yanıtı ve metabolik adaptasyon süreçleri ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu durum, elde edilen bulguların tek yönlü bir mekanizma yerine, çok katmanlı bir hücresel yanıtın parçası olarak değerlendirilmesini gerektirmektedir.

Literatürde *CTRI* geninin kanser ve çeşitli kemoterapötik ajanlarla etkileşimine dair geniş bir veri birikimi bulunmasına karşın, melittinin *CTRI* ekspresyonu üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada melittin uygulaması sonrası *CTRI* ekspresyonundaki değişimlerin ortaya konulması, çalışmamızın bu açıdan literatüre özgün katkı sunduğunu göstermektedir. Ayrıca, gözlenen *CTRI* ekspresyon artışının antikanser etkinin artışı ile ilişkili olması, *CTRI*'in rolüne yönelik yeni araştırma yaklaşımlarına zemin hazırlayabilir.

Çalışmamızın *BRMS1* ve *CTRI* sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi, melittinin yalnızca proliferasyonu azaltan bir peptid olmanın ötesinde, metastaz baskılanması ve ilaca yanıtla ilişkili genleri de etkileyebileceğini düşündürmektedir. Özellikle duyarlı hücrelerde *BRMS1* artışının daha belirgin olması, bu hücrelerde metastatik davranışı baskılayan programların daha güçlü aktive olabildiğini; *CTRI* artışının ise platin taşınımı açısından daha elverişli bir fenotipe işaret edebileceğini düşündürmektedir. Dirençli hücrelerde ise hem *BRMS1* hem *CTRI* yanıtlarının daha değişken ve bazen daha sınırlı olması, dirençli fenotipin transkripsiyonel plastisitesini yansıtır olabilir. Bu açıdan bakıldığında, *BRMS1* ve *CTRI* genlerinin birlikte değerlendirilmesi çalışmanın güçlü yönlerinden birini oluşturmaktadır; çünkü biri metastatik davranışın, diğeri ise kemoterapi yanıtının moleküler göstergesi olarak melittinin etkilerini daha bütüncül biçimde yorumlamaya imkân vermektedir.

Bu tablo son 10 yılda yayımlanan çalışmaların çizdiği genel çerçeveye uyumludur: kemorezistan tümör hücreleri aynı ajanlara karşı yanıt verebilir, ancak bu yanıt çoğu zaman daha yüksek doz, daha uzun süre veya ek düzenleyici mekanizmalar gerektirmektedir.

Sivri ve ark. [17] melittinin anti-metastatik etkilerini değerlendirmek amacıyla meme kanseri hücrelerinde MTT ve yara iyileşme analizleri gerçekleştirmiş ve *BRMS1*'in de dahil olduğu bazı genlerin ekspresyon düzeylerini incelemiştir. Çalışmada, melittinin seçici sitotoksitesinin sisplatine kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bulgularımızla uyumlu olarak, melittin tedavisi sonrasında hücre göçünde azalma ve *BRMS1* ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar, melittinin yalnızca sitotoksik etki göstermekle kalmayıp, aynı zamanda gen ekspresyonunu modüle ederek kemoterapi yanıtını etkileyebileceğini ortaya koymaktadır.

2025 yılında yayımlanan bir çalışmada, meme kanseri hücre hatlarında *BRMS1*'in homologu olan *BRMS1 L* (Breast Cancer Metastasis Suppressor 1-Like)'in daha fazla ekspresyonunun neoadjuvan kemoterapiye daha iyi yanıt ve daha olumlu prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Kemoterapiye dirençli hücrelerde *BRMS1 L* seviyesinin düşük olduğu g r lm ştir. *BRMS1 L*'nin hücelere dışarıdan verilmesi (ektopik ifade), kemoterapi ilaçlarına olan direnci kırmış ve ilaçların kanser hücrelerini öldürme gücünü artırmış. Mekanistik olarak *BRMS1 L*'nin, özellikle *ATG5* ekspresyonunu baskılayarak otofajiyi inhibe ettiği ve bu sayede hücrelerin kemoterapiye duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* bulgular, *BRMS1 L* aşırı ekspresyonunun tümör büyümesini baskıladığını ve kemoterapötik ajanların etkinliğini artırdığını ortaya koymaktadır. Bu  alışma, *BRMS1 L* geninin meme kanserinde sadece metastazı engellemekle kalmadığı aynı zamanda *ATG5* bağımlı otofajiyi baskılayarak kemoterapi duyarlılığını artırdığını ilk kez ortaya koymuştur (105).

Melittin, membran bozulması ve apoptoz indüksiyonu yoluyla güçlü antikanser aktivite sergiler, ancak klinik uygulaması hemolitik toksisite ve zayıf farmakokinetik nedeniyle sınırlı olmaktadır (106). Bu nedenle literatürdeki güncel eğilim de melittinin tek başına serbest formundan çok, taşıyıcı sistemlerle verilmesinin etkinlik ve seçiciliği artırabileceği yönündedir.

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle,  alışma bütünüyle *in vitro* koşullarda ve tek bir meme kanseri hücre hattının duyarlı/dirençli alt tipleri üzerinde y r t lm ştir; bu nedenle bulguların klinik veya *in vivo* ortama doğrudan genellenmesi mümkün değildir. İkinci olarak, tez başlığı sinerjistik etkiye işaret etse de mevcut deney seti daha çok melittinin tek başına etkilerini ve sisplatin duyarlı/dirençli arka planlardaki farklı

yanıtları göstermektedir; klasik kombinasyon indeksi, izobologram veya doğrudan melittin+sisplatin eş uygulama analizleri yapılmadığı için biçimsel sinerji yorumu sınırlıdır. Üçüncü olarak, *BRMS1* ve *CTRI* için yalnızca mRNA düzeyleri incelenmiş; protein düzeyi, fonksiyonel taşıyıcı aktivitesi veya hücre içi sisplatin birikimi ölçülmemiştir. Bu durum özellikle *CTRI* için önemlidir; çünkü gen ekspresyonundaki artışın fonksiyonel olarak gerçekten artmış ilaç alımına karşılık gelip gelmediği bu çalışma kapsamında doğrudan gösterilememiştir. Son olarak, yara iyileştirme ve invazyon bulgularının daha güçlü hale gelmesi için tüm gruplarda tam nicel görüntü analizi ve standartlaştırılmış alan/hücre sayımı verileriyle desteklenmesi yararlı olacaktır. Bu sınırlılıklar, çalışmanın değerini azaltmaktan çok, gelecekte yapılacak deneylerin yönünü belirlemektedir.

Bu çalışmada, melittinin üçlü negatif meme kanseri modeli olan MDA-MB-231 hücre hattının sisplatin duyarlı ve sisplatin dirençli alt tipleri üzerindeki etkileri çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, melittinin yalnızca sitotoksik bir ajan olmadığını, aynı zamanda metastatik davranış ve kemoterapi yanıtı ile ilişkili moleküler mekanizmalar üzerinde de düzenleyici etkiler oluşturabileceğini göstermektedir.

Çalışmanın temel bulgularından biri, melittinin her iki hücre hattında da doz bağımlı olarak hücre canlılığını azaltmasıdır. Bununla birlikte, sisplatin dirençli hücrelerde daha yüksek IC₅₀ değerlerinin elde edilmesi, bu hücrelerin daha dayanıklı bir fenotipe sahip olduğunu ve melittine karşı görece olarak daha düşük duyarlılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Buna rağmen, melittinin dirençli hücrelerde de etkisini tamamen kaybetmemesi, bu molekülün kemorezistan hücrelerde dahi biyolojik aktivitesini sürdürebildiğini göstermesi açısından önemlidir.

Hücre göçü ve invazyon analizleri, melittinin antimetastatik potansiyelini destekleyen önemli bulgular sunmuştur. Yara iyileştirme ve morfolojik değerlendirmeler, melittinin hücre hareketliliğini baskıladığını ve bu etkinin doz artışı ile belirginleştiğini ortaya koymuştur. Bu durum, melittinin yalnızca hücre sayısını azaltan bir ajan olmadığını, aynı zamanda hücre motiliteyi düzenleyen biyolojik süreçler üzerinde de etkili olduğunu düşündürmektedir.

Moleküler düzeyde elde edilen veriler, çalışmanın özgün katkısını oluşturmaktadır. *BRMS1* gen ekspresyonundaki artış, melittinin metastaz baskılayıcı gen programlarını aktive edebileceğini göstermektedir. Buna karşılık *CTRI* ekspresyonundaki değişimler, melittinin

platin bazlı kemoterapötik ajanların hücre içine alımını etkileyebilecek moleküler süreçlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu iki genin birlikte değerlendirilmesi, melittinin etkilerinin hem metastaz hem de kemoterapi yanıtı ekseninde bütüncül olarak yorumlanmasına olanak sağlamıştır.

Elde edilen tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, melittinin üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde hem sitotoksik hem de antimetastatik özellikler gösterdiği ve sisplatin direnci ile ilişkili moleküler mekanizmalar üzerinde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu yönüyle melittin, mevcut kemoterapi yaklaşımlarını destekleyebilecek potansiyel bir biyolojik ajan olarak öne çıkmaktadır.

Bu çalışma *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olup, elde edilen bulguların daha ileri düzeyde doğrulanması için ek çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu kapsamda aşağıdaki öneriler sunulabilir:

- Melittinin etkilerinin protein düzeyinde doğrulanması (Western blot, immüno Floresan vb.)
- *CTR1* için fonksiyonel sisplatin alım analizlerinin yapılması
- Melittin ve sisplatinin kombinasyon tedavisi olarak değerlendirilmesi (sinerji analizi)
- Bulguların *in vivo* tümör modellerinde doğrulanması
- Melittinin nanotaşıyıcı sistemlerle uygulanarak seçiciliğinin artırılması
- Apoptoz, oksidatif stres ve sinyal yollarına (NF- κ B, PI3K/AKT vb.) yönelik mekanistik çalışmaların genişletilmesi

Sonuç olarak, bu çalışma melittinin hem metastaz hem de kemoterapi direnci ile ilişkili süreçleri hedefleyebilen çok yönlü bir molekül olduğunu ortaya koymakta ve gelecekte geliştirilecek kombinasyon tedavileri için bilimsel bir temel sunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Cancer [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2021 [Erişim tarihi: 25 Nisan 2026]. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
3. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*. 2009;138(5):822–829.
4. Kaya C. Aptamer ile fonksiyonlandırılmış ginkgolid A–sisplatin ykl poli(laktik–ko–glikolik asit) nanopartikllerinin meme kanseri üzerindeki biyolojik etkinliğinin incelenmesi [Yüksek lisans tezi]. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi; 2022.
5. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2022: World fact sheet [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2024 [Erişim tarihi: 25 Nisan 2026]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38572751/>
6. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye kanser istatistikleri 2020 [Internet]. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı; 2025 [Erişim tarihi: 25 Nisan 2026]. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/Dokumanlar/Istatistikler/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2020.pdf
7. Piğeros M, Laversanne M, Barrios E, et al. An updated profile of the cancer burden, patterns and trends in Latin America and the Caribbean. *Lancet Reg Health Am*. 2022; 13:100294.
8. Sudhakar A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *J Cancer Sci Ther*. 2009;1(2):1–4. doi:10.4172/1948-5956.100000e2.
9. Daniluk K, Lange A, Wjcik B, Zawadzka K, Bałaban J, Kutwin M, Jaworski S. Effect of melittin complexes with graphene and graphene oxide on triple-negative breast cancer

tumors grown on chicken embryo chorioallantoic membrane. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):8388. doi:10.3390/ijms24098388. PMID:37176095.

10. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017 Oct 2;50(1):33. doi:10.1186/s40659-017-0140-9. PMID:28969709; PMCID:PMC5625777.

11. Mohanta TK, Occhipinti A, Atsbaha Zebelo S, Foti M, Fliegmann J, Bossi S, Maffei ME, Berteau CM. Ginkgo biloba responds to herbivory by activating early signaling and direct defenses. *PLoS One.* 2012;7(3):e32822. doi:10.1371/journal.pone.0032822. Epub 2012 Mar 20. PMID:22448229; PMCID:PMC3308967.

12. Ma Z, Hu Y, Jiang G, et al. Spontaneous generation of germline characteristics in mouse fibrosarcoma cells. *Sci Rep.* 2012;2:743. doi:10.1038/srep00743.

13. Atıcı T. Paklitaksel/aloe-emodin kombinasyonunun mcf-7 ve mda-mb-231 meme kanseri hücre hatlarında sinerjistik etkileri [doktora tezi]. Erzincan: Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi; 2022.

14. Nusair SA, Galal G, Radwan SM. The potential anticancer effect of bee venom in combination with sorafenib against HepG2 cell lines via induction of apoptosis and autophagy candidate genes. *Egypt J Med Hum Genet.* 2024;25:49. doi:10.1186/s43042-024-00524-3.

15. Yan R, Dai W, Mao Y, Yu G, Li W, Shu M, Xu B. Melittin inhibits tumor cell migration and enhances cisplatin sensitivity by suppressing IL-17 signaling pathway gene LCN2 in castration-resistant prostate cancer. *Prostate.* 2023 Nov;83(15):1430-45. doi:10.1002/pros.24605.

16. Ertilav K, Nazıroğlu M. Honey bee venom melittin increases the oxidant activity of cisplatin and kills human glioblastoma cells by stimulating the TRPM2 channel. *Toxicon.* 2023 Jan 15;222:106993. doi:10.1016/j.toxicon.2022.106993.

17. Sivri N, Tetikoğlu S, Kolaylı S, Farooqi A, Uzuner S. Anti-metastatic effects of bee venom and melittin in breast cancer cells by upregulation of *BRMS1* and *DRG1* genes. *Chem Biol Drug Des.* 2024;104. doi:10.1111/cbdd.14637.

18. Schoeberl A, et al. The copper transporter *CTR1* and cisplatin accumulation at the single-cell level by LA-ICP-TOFMS. *Front Mol Biosci.* 2022.
19. Küreş SA. Kolon (DLD1) ve meme kanseri (MDAMB231) hücre serilerinde H2 reseptör antagonisti olan famotidinin kanser hücre sağkalımına etkisi [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2022.
20. Mindell ER. Enzinger and Weiss's soft tissue tumors. 4th ed. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83(11):1778.
21. Álvarez-Fernández M, Malumbres M. Mechanisms of sensitivity and resistance to CDK4/6 inhibition. *Cancer Cell.* 2020 Apr 13;37(4):514-529. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.010. PMID:32289274.
22. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131-149. doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x. PMID:12814430; PMCID:PMC6496723.
23. Kearns WG, Liu JM. Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: a short review. *Curr Genomics.* 2001 Jun;2(2):171-180. doi:10.2174/1389202013350931.
24. Flatt PM, Pietsenpol JA. Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the crossroads of carcinogenesis and drug discovery. *Drug Metab Rev.* 2000 Aug–Nov;32(3–4):283-305. doi:10.1081/dmr-100102335. PMID:11139130.
25. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Aug;1348(1):20-31. doi:10.1111/nyas.12811. Epub 2015 Jun 24. PMID:26109073.
26. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
27. Rieger PT. The biology of cancer genetics. *Semin Oncol Nurs.* 2004 Aug;20(3):145-154. doi:10.1053/j.soncn.2004.04.001. PMID:15491024.
28. Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y. Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2012 Sep–Oct;9(5):311-320. PMID:22990110.

29. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Sep 26;30(1):87. doi:10.1186/1756-9966-30-87. PMID:21943236; PMCID:PMC3197541.
30. Martínez-Jiménez F, Muiños F, Sentís I, Deu-Pons J, Reyes-Salazar I, Arnedo-Pac C, Mularoni L, Pich O, Bonet J, Kranas H, González-Pérez A, López-Bigas N. A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat Rev Cancer*. 2020 Oct;20(10):555-572. doi:10.1038/s41568-020-0290-x. Epub 2020 Aug 10. PMID:32778778.
31. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2006 Jan;7(1):21-33. doi:10.1038/nrg1748.
32. Waddington C. Towards a theoretical biology. *Nature*. 1968;218:525-527. doi:10.1038/218525a0.
33. Yu X, Zhao H, Wang R, et al. Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine. *Cell Death Discov*. 2024;10:28. doi:10.1038/s41420-024-01803-z.
34. Pathak A, Tomar S, Pathak S. Epigenetics and cancer: a comprehensive review. *Asian Pac J Cancer Biol*. 2023;8(1):75-89. doi:10.31557/apjcb.2023.8.1.75-89. Published 2023 Mar 16.
35. Özdoğan M. Türkiye kanser istatistikleri 2020. Dr. Özdoğan Blog. 2020 [Erişim tarihi: 26 Nisan 2026]. Erişim adresi: <https://www.drozdogan.com/turkiye-kanser-istatistikleri-2020/>
36. Erzurumlu Y, Doğan HK. Breast cancer and the molecular mechanism of estrogen signaling. *Interdisciplinary Journal*. 2023;14(48):57-68. doi:10.17944/interdiscip.1285662. Published 2023 Apr 30.
37. Orrantia-Borunda E, Acuña-Aguilar LE, Ramírez-Valdespino CA. Nanomaterials for breast cancer. In: *Breast Cancer* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 Aug 6. Chapter 10. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583824/>

38. Yıldırım M. Sisplatin dirençli ve duyarlı MDA-MB-231 hücre hatlarında etoposid ve vinkristin'in etkisinin araştırılması [Yüksek lisans tezi]. Kırşehir: Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü; 2023.
39. Baş D. Meme kanseri hastalarında vücut kompozisyonunun değerlendirilmesinde biyoelektriksel impedans analizinin validasyonu [doktora tezi]. İstanbul: Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2021.
40. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313. doi:10.3322/caac.21609. PMID:30207593.
41. BioRender. Classification of breast cancer: non-invasive vs invasive [Internet]. BioRender; 2023 [Erişim tarihi: 26 Nisan 2026]. Erişim adresi: <https://www.biorender.com/template/classification-of-breast-cancer-non-invasive-vs-invasive>.
42. World Health Organization. WHO classification of tumours of the breast. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019. Erişim adresi: <https://tumourclassification.iarc.who.int/welcome/>
43. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. 1974 Sep;53(3):661-74. doi:10.1093/jnci/53.3.661.
44. Akbulut E. Meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerine *Cladonia furcata*'nın koruyucu etkisinin belirlenmesi [Yüksek lisans tezi]. Yozgat: Yozgat Bozok Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü; 2023.
45. Aristizábal-Pachón AF, Inácio de Carvalho T, Carrara HHA, de Andrade JM, Takahashi CS. Detection of human mammaglobin A mRNA in peripheral blood of breast cancer patients before treatment and association with metastasis. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2015 Dec;27(4):217-222.

46. Atalay C, Deliloglu Gürhan I, Irkkan C, Gündüz U. Multidrug resistance in locally advanced breast cancer. *Tumour Biol.* 2006;27(6):309-318. doi:10.1159/000096086. Epub 2006 Oct 9. PMID:17033200.
47. Rébé C, Ghiringhelli F. Cytotoxic effects of chemotherapy on cancer and immune cells: how can it be modulated to generate novel therapeutic strategies? *Future Oncol.* 2015 Oct;11(19):2645-2654. doi:10.2217/fon.15.198. Epub 2015 Sep 17. PMID:26376787.
48. Cleveland Clinic. Chemotherapy drugs [Internet]. Cleveland (OH): Cleveland Clinic; 2022 Oct 20 [Erişim tarihi: 26 Nisan 2026]. Erişim adresi: <https://my.clevelandclinic.org/health/treatments/24323-chemotherapy-drugs>
49. Kinnel B, Singh SK, Oprea-Ilies G, Singh R. Targeted therapy and mechanisms of drug resistance in breast cancer. *Cancers (Basel).* 2023 Feb 19;15(4):1320. doi:10.3390/cancers15041320. PMID:36831661; PMCID:PMC9954028.
50. Cooley ME, Davis L, Abrahm J. Cisplatin: a clinical review. Part II—nursing assessment and management of side effects of cisplatin. *Cancer Nurs.* 1994 Aug;17(4):283-93. PMID:7954376.
51. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5;740:364-78. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
52. Bozok V, Eroğlu Z. Cisplatin direncinde etkili moleküler mekanizmalar [Internet]. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı; 2013. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/196928>
53. Dasari S, Njiki S, Mbemi A, Yedjou CG, Tchounwou PB. Pharmacological effects of cisplatin combination with natural products in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 28;23(3):1532. doi:10.3390/ijms23031532.
54. Ghosh S. Cisplatin: the first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019 Jul;88:102925. doi:10.1016/j.bioorg.2019.102925.
55. Minerva B, Verma S, Chander G, Jamwal RS, Sharma B, Bhat A, Katyal T, Kumar R, Shah R. Cisplatin-based combination therapy for cancer. *J Cancer Res Ther.* 2023 Apr-Jun;19(3):530-6. doi:10.4103/jcrt.jcrt_792_22.

56. Zimmermann RC, Welch DR. *BRMS1* : a multifunctional signaling molecule in metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39:755-68. doi:10.1007/s10555-020-09871-0.
57. GeneCards. *BRMS1* gene (*BRMS1* metastasis suppressor 1) [Internet]. Bethesda (MD): GeneCards Human Gene Database; [Erişim tarihi: 26 Nisan 2026]. Erişim adresi: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRMS1>
58. Rivera J, Megías D, Navas C, Bravo J. Identification of essential sequences for cellular localization in *BRMS1* metastasis suppressor. *PLoS One.* 2009 Jul 30;4(7):e6433. doi:10.1371/journal.pone.0006433.
59. National Center for Biotechnology Information. *BRMS1* *BRMS1* transcriptional repressor and anoikis regulator (Homo sapiens) [Internet]. Gene ID: 25855. Bethesda (MD): NCBI; [Erişim tarihi: 26 Nisan 2026]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25855>
60. Lin LZ, Cai MG, Dai YC, Zheng ZB, Jiang FF, Shi LL, Pan Y, Song HB. *BRMS1* gene expression may be associated with clinico-pathological features of breast cancer. *Biosci Rep.* 2017;37(4):BSR20170672. doi:10.1042/BSR20170672.
61. Hurst DR, Welch DR. Unraveling the enigmatic complexities of *BRMS1* -mediated metastasis suppression. *FEBS Lett.* 2011;585(20):3185-90. doi:10.1016/j.febslet.2011.07.045.
62. Liu Y, Mayo MW, Nagji AS, Smith PW, Ramsey CS, Li D, Jones DR. Phosphorylation of RelA/p65 promotes DNMT-1 recruitment to chromatin and represses transcription of the tumor metastasis suppressor gene *BRMS1* . *Oncogene.* 2012 Mar 1;31(9):1143-54. doi:10.1038/onc.2011.308.
63. Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2009 Feb 15;69(4):1279-83. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3559. Epub 2009 Feb 3. PMID: 19190326; PMCID: PMC2754225.
64. Cook LM, Cao X, Dowell AE, Debies MT, Edmonds MD, Beck BH, Kesterson RA, Desmond RA, Frost AR, Hurst DR, Welch DR. Ubiquitous *BRMS1* expression is critical for

mammary carcinoma metastasis suppression via promotion of apoptosis. *Clin Exp Metastasis*. 2012 Apr;29(4):315-25. doi:10.1007/s10585-012-9452-x.

65. Sheng XJ, Zhou YQ, Song QY, Zhou DM, Liu QC. Loss of breast cancer metastasis suppressor 1 promotes ovarian cancer cell metastasis by increasing chemokine receptor 4 expression. *Oncol Rep*. 2012 Apr;27(4):1011-8. doi:10.3892/or.2011.1596.

66. Kodura MA, Souchelnytskyi S. Breast carcinoma metastasis suppressor gene 1 (*BRMS1*): update on its role as the suppressor of cancer metastases. *Cancer Metastasis Rev*. 2015 Dec;34(4):611-8. doi:10.1007/s10555-015-9583-z.

67. Metge BJ, Frost AR, King JA, et al. Epigenetic silencing contributes to the loss of *BRMS1* expression in breast cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(7):753-63. doi:10.1007/s10585-008-9187-x.

68. Yang, Y. L., Chen, C. Z., Jin, L. P., Ji, Q. Q., Chen, Y. Z., Li, Q., ... & Qu, J. M. (2013). Effect and mechanism of the metastasis suppressor gene *BRMS1* on the migration of breast cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6(10), 908.

69. GeneCards. SLC31A1 gene (copper transporter 1, *CTR1*) [Internet]. Bethesda (MD): GeneCards Human Gene Database; [Erişim tarihi: 26 Nisan 2026]. Erişim adresi: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC31A1>

70. National Center for Biotechnology Information. SLC31A1 solute carrier family 31 member 1 (Homo sapiens) [Internet]. Gene ID: 1317. Bethesda (MD): NCBI; [Erişim tarihi: 26 Nisan 2026]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1317>

71. Kim H, Wu X, Lee J. SLC31 (CTR) family of copper transporters in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr-Jun;34(2-3):561-70. doi:10.1016/j.mam.2012.07.011.

72. Aller SG, Unger VM. Projection structure of the human copper transporter *CTR1* at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 7;103(10):3627-32. doi:10.1073/pnas.0509929103.

73. Akerfeldt MC, Tran CM, Shen C, Hambley TW, New EJ. Interactions of cisplatin and the copper transporter *CTR1* in human colon cancer cells. *J Biol Inorg Chem*. 2017 Jul;22(5):765-74. doi:10.1007/s00775-017-1467-y.

74. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter *CTR1* in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14298-303. doi:10.1073/pnas.202488199.
75. Çolak B, Cansaran Duman D, Yılmaz E. Yumurtalık kanserinde hedefe yönelik tedavi stratejilerinde moleküler mekanizmaların rolü. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2022;79(1):153-62. doi:10.5505/TurkHijyen.2022.60362.
76. Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol*. 2010 Jun;77(6):887-94. doi:10.1124/mol.109.063172.
77. Małek A, Strzemiński M, Kurzepa J. Can bee venom be used as anticancer agent in modern medicine? *Cancers (Basel)*. 2023 Jul 21;15(14):3714. doi:10.3390/cancers15143714.
78. Albayrak S, Albayrak S. Propolis: natural antimicrobial matter. *Ankara Ecz Fak Derg*. 2008;37(3):201-15. doi:10.1501/Eczfak_00000000502.
79. Badet C, Quero F. The in vitro effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. *Anaerobe*. 2011 Feb;17(1):19-22. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.12.007.
80. Gajski G, Leonova E, Sjakste N. Bee venom: composition and anticancer properties. *Toxins (Basel)*. 2024 Feb 29;16(3):117. doi:10.3390/toxins16030117.
81. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther*. 2007 Aug;115(2):246-70. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.04.004.
82. Oršolić N. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2012 Jun;31(1-2):173-94. doi:10.1007/s10555-011-9339-3.
83. Duffy C, Sorolla A, Wang E, Golden E, Woodward E, Davern K, Ho D, Johnstone E, Pfleger K, Redfern A, Iyer KS, Baer B, Blancafort P. Honeybee venom and melittin suppress growth factor receptor activation in HER2-enriched and triple-negative breast cancer. *NPJ Precis Oncol*. 2020 Sep 1;4:24. doi:10.1038/s41698-020-00129-0.

84. Dabbagh Moghaddam F, Akbarzadeh I, Marzbankia E, et al. Delivery of melittin-loaded niosomes for breast cancer treatment: an in vitro and in vivo evaluation of anti-cancer effect. *Cancer Nanotechnol.* 2021;12:14. doi:10.1186/s12645-021-00085-9.
85. Mansour GH, El-Magd MA, Mahfouz DH, Abdelhamid IA, Mohamed MF, Ibrahim NS, Hady A, Abdel Wahab A, Elzayat EM. Bee venom and its active component melittin synergistically potentiate the anticancer effect of sorafenib against HepG2 cells. *Bioorg Chem.* 2021 Nov;116:105329. doi:10.1016/j.bioorg.2021.105329.
86. Bindlish A, Sawal A. Bee sting venom as a viable therapy for breast cancer: a review article. *Cureus.* 2024 Feb 25;16(2):e54855. doi:10.7759/cureus.54855.
87. Phelan K, May K. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Toxicol.* 2016;70:A.3B.1-A.3B.22. doi:10.1002/cptx.13.
88. Budi H, Setyawati M, Anitasari S, Shen Y, Pebriani I, Ramadan D. Cell detachment rates and confluence of fibroblast and osteoblast cell culture using different washing solutions. *Braz J Biol.* 2023;84:e265825. doi:10.1590/1519-6984.265825.
89. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015;111:A3.B.1-A3.B.3.
90. Salauddin M. A brief concept of cell culture: challenges, prospects and applications. In: *Cell Culture* [Internet]. 2021. doi:10.5772/intechopen.99387.
91. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2:329-33. doi:10.1038/nprot.2007.30.
92. Yue PY, Leung EP, Mak NK, Wong RN. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *J Biomol Screen.* 2010;15:427-33. doi:10.1177/1087057110361772.
93. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta CT)$ method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262.

94. Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 (*BRMS1*): robust biological and pathological data, but still enigmatic mechanism of action. *Semin Cancer Biol.* 2016.
95. Salimian F, Nabiuni M, Salehghamari E. Melittin prevents metastasis of epidermal growth factor-induced MDA-MB-231 cells through the inhibition of the SDF-1 α /CXCR4 signaling pathway. *Cell J (Yakhteh).* 2022;24:85-90. doi:10.22074/cellj.2022.7626.
96. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(11):674-90.
97. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* 2020;22:61. doi:10.1186/s13058-020-01296-5.
98. Carneiro T, Carvalho A, Vojtek M, Carmo I, Marques P, Diniz C, Gil A. Disclosing a metabolic signature of cisplatin resistance in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells by NMR metabolomics. *Cancer Cell Int.* 2023;23(1):310. doi:10.1186/s12935-023-03124-0.
99. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M, Kroemer G. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 2014;5:e? doi:10.1038/cddis.2013.428.
100. Cocetta V, Ragazzi E, Montopoli M. Mitochondrial involvement in cisplatin resistance. *Int J Mol Sci.* 2019;20:3384. doi:10.3390/ijms20143384.
101. Han J, Yu J, Dai Y, Li J, Guo M, Song J, Zhou X. Overexpression of miR-361-5p in triple-negative breast cancer (TNBC) inhibits migration and invasion by targeting RQCD1 and inhibiting the EGFR/PI3K/Akt pathway. *Bosn J Basic Med Sci.* 2019;19(1):52-9. doi:10.17305/bjbms.2018.3399.
102. Prasad N. SHIP2 phosphoinositol phosphatase positively regulates EGFR-Akt pathway, CXCR4 expression, and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Oncol.* 1992;34(1):97-105. doi:10.3892/ijo_00000133.

103. Farabegoli F, Govoni M, Spisni E, Papi A. EGFR inhibition by (-)-epigallocatechin-3-gallate and IIF treatments reduces breast cancer cell invasion. *Biosci Rep.* 2017;37. doi:10.1042/bsr20170168.
104. Lee H, Ko J, Baek S, Nam D, Lee S, Lee J, Yang W, Um J, Kim S, Shim B, Ahn K. Embelin inhibits invasion and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells by suppression of CXC chemokine receptor 4, matrix metalloproteinases-9/2, and epithelial–mesenchymal transition. *Phytother Res.* 2016;30:1021-32. doi:10.1002/ptr.5612.
105. Li Y, Zhang D, Zhao J, Yang M, Wang Y, Lee P, Qu S. *BRMS1* L promotes chemotherapy sensitivity by inhibiting autophagy in breast cancer. *Front Genet.* 2025 Nov 7;16:1670001. doi:10.3389/fgene.2025.1670001.
106. Yu X, Jia S, Yu S, et al. Recent advances in melittin-based nanoparticles for antitumor treatment: from mechanisms to targeted delivery strategies. *J Nanobiotechnol.* 2023;21:454. doi:10.1186/s12951-023-0222

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	Esmâ SÜMER
Doğum Yeri	*****
Doğum Tarihi	**.**.****
Uyruğu	T.C.
Telefon	0*** ** * **
E-posta Adresi	*****@hotmail.com
Orcid Numarası	0009-0004-4957-8249
Lisans	
Üniversite	Erciyes Üniversitesi
Fakülte	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Bölüm	Beslenme ve Diyetetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	2014
Yüksek lisans	
Üniversite	Ahi Evran Üniversitesi
Fakülte	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Bölüm	Tıbbi Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	2026
MAKALE VE BİLDİRİLER	
“Sisplatin Dirençli ve Duyarlı Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sisplatin ve Melittinin Sinerjistik Etkisinin Değerlendirilmesi” 11. Uluslararası İzmir Tıp, Hemşirelik, Ebelik ve Sağlık Bilimleri Kongresi. 14-16 Mart 2026/ İzmir, Türkiye	