



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**MELİTTİN, ÇİNKÖ ve HİPERBARİK OKSİJENİN A549 HÜCRE HATTINA
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Duygu TARHAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN**

Biyofizik Anabilim Dalı

Biyofizik Programı

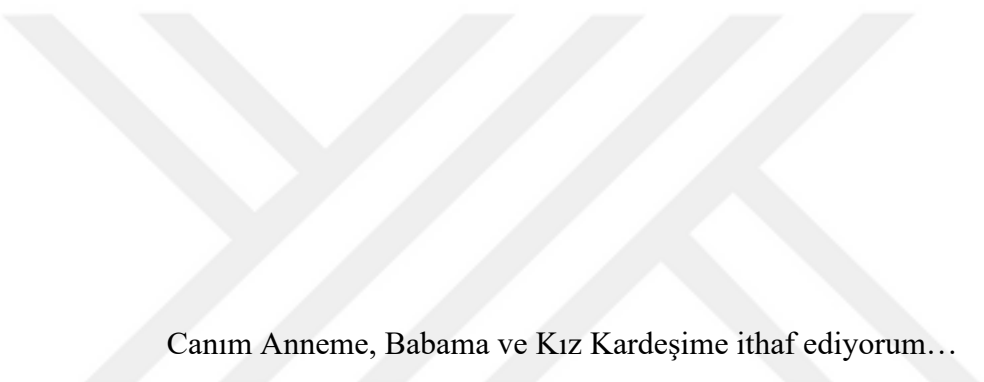
Eylül, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Duygu TARHAN tarafından, **Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN** danışmanlığında hazırlanan "**MELİTTİN, ÇİNKÖ ve HİPERBARİK OKSİJENİN A549 HÜCRE HATTINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **28/09/2022** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Biyofizik Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Dildar KONUKOĞLU İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Biyofizik Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Fatma ATEŞ Beykent Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Denizhan KARIŞ İstinye Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret



Canım Anneme, Babama ve Kız Kardeşime ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

MELİTTİN, ÇİNKO ve HİPERBARİK OKSİJENİN A549 HÜCRE HATTINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Bu tez çalışması için İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa ÖYP Koordinatörlüğünden ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2211-E Ulusal Doktora Burs programından destek alınmıştır.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca hayat ve akademik tecrübeleri ile bana yol gösteren, her türlü destek ve yardımlarının yanı sıra zeki ve çalışkan bir insanın ilerlemesinde elinden geleni yapan ve her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum doktora tez danışmanım Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN'a ve ailesine sonsuz teşekkür ederim. Akademik çalışmalarımda tanıştığım ilk günden beri yolumu aydınlatmasının yanı sıra her zaman anlayışı ve sabırlı kişiliği ile bana çok şey öğreten değerli hocam Prof. Dr. M. Erman OR'a ve ailesine çok teşekkür ederim. Doktora tez çalışmam boyunca yardım elini uzatıp bilgilerini bana sabırla öğreten sayın Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR hocama ve ailesine sonsuz teşekkür ederim. Eğitim hayatım süresince benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen çok değerli Prof. Dr. Şefik DURSUN'a, Prof. Dr. M. Tunaya KALKAN'a, Prof. Dr. Mehmet Can AKYOLCU'ya, Prof. Dr. Ü. Bora BARUTÇU'ya, Prof. Dr. Ş. Selmin TOPLAN'a, Prof. Dr. Mehmet Ali KÖRPİNAR'a, Prof. Dr. Derviş ÖZÇELİK'e, Prof. Dr. Handan TUNCEL'e, Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR'e ve Prof. Dr. Dildar KONUKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktoram boyunca her zaman yardıma koşan Dr. Uğur PARLATAN'a, Doç. Dr. Fatma ATEŞ'e, Dr. Öğr. Üyesi Denizhan KARIŞ'a, Dr. Öğr. Üyesi Dilek DÜZGÜN ERGÜN'e, Araş Gör. Dr. Nural PASTACI ÖZSOBACI'ya ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa ÖYP Koordinatörlüğü çalışanlarına, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'ya ve desteklerini gördüğüm tüm çalışanlarına ayrıca teşekkürü bir borç bilirim. Doktora eğitimim boyunca vermiş olduğu 2211-E Ulusal Doktora Burs destekteğinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na çok teşekkür ederim.

Son olarak, güzel ahlak ve saygının önemini bana öğreten ve her zaman desteklerini benden esirgemeyen canımdan çok sevdiğim annem, babam ve kız kardeşime kalbimin en derin teşekkürlerini sunarım.

Eylül 2022

Duygu TARHAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	3
2.1. KANSER.....	3
2.1.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Akciğer Kanserinin Histopatolojisi.....	8
2.1.3. A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattı.....	9
2.2. MELİTTİN.....	10
2.3. ÇİNKO ESER ELEMENTİ	14
2.4. HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ (HBO).....	17
2.5. APOPTOZ VE NEKROZ MEKANİZMALARI.....	19
3. YÖNTEM	24
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASALLAR VE MALZEMELER.....	24
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR.....	25
3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN SOLÜSYONLAR	26
3.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ LABORATUVARI	26
3.4.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması Protokolü	29
3.4.2. Dondurulmuş Hücre Hattının Açılması Protokolü.....	30
3.4.3. Hücrelerin Pasajlanma Protokolü.....	31

3.4.4. Hücrelerin Dondurulma Protokolü.....	33
3.4.5. Hücre Sayısı ve Canlılığının Belirlenmesi	33
3.5. HÜCRELERE YAPILAN UYGULAMALAR	35
3.5.1. Çinko Uygulaması.....	35
3.5.2. Melittin Uygulaması.....	35
3.5.3. Hiperbarik Oksijen (HBO) Uygulaması.....	35
3.6. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	36
3.7. DOZ BELİRLEME ANALİZİ (YARI MAKSİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU IC50).....	38
3.8. RAMAN SPEKTROSKOPİSİ ANALİZİ.....	39
3.9. İMMÜNOSİTOKİMYASAL ANALİZ.....	41
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	44
4. BULGULAR.....	46
4.1. HÜCRE CANLILIK ANALİZİ.....	46
4.2. DOZ BELİRLEME ANALİZİ SONUÇLARI (IC50)	47
4.3. RAMAN SPEKTROSKOPİSİ ANALİZ SONUÇLARI	48
4.4. İMMÜNOSİTOKİMYASAL BOYAMA SONUÇLARI.....	64
4.4.1. Bax immun boyama sonuçları.....	64
4.4.2. Bcl-2 immun boyama sonuçları	65
5. TARTIŞMA.....	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR.....	77
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	84
ETİK KURUL İZİN YAZISI	85
KURUM İZNİ YAZILARI.....	86
ÖZGEÇMİŞ	88

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Dünya genelinde kanser türlerinin insidans ve mortalite oranları.....	5
Şekil 2.2: Dünya genelinde geçmiş ve gelecek yıllara ait meme ve akciğer kanserinin tahmini vaka sayıları.	5
Şekil 2.3: Türkiye'deki kanser türlerinin insidans ve mortalite oranları.	7
Şekil 2.4: Türkiye’de geçmiş ve gelecek yıllara ait meme ve akciğer kanserinin tahmini vaka sayıları.	7
Şekil 2.5: Akciğer kanseri tiplerinin histolojik profilleri.	8
Şekil 2.6: A549 akciğer kanseri hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.	10
Şekil 2.7: Melittin peptitinin yapısı.	13
Şekil 2.8: Melittin peptitinin 3-boyutlu yapısı.....	14
Şekil 2.9: Hücre ölümü süreci.	20
Şekil 2.10: Nekroz ve apoptozun hücresel değişimleri.	22
Şekil 3.1: Sıvı azot tankı.....	27
Şekil 3.2: (a) Otoklav cihazı ve (b) soğutmalı inkübatör.	27
Şekil 3.3: Laminer akım kabini.	28
Şekil 3.4: (a) Karbondioksit inkübatörü ve (b) invert mikroskop.	29
Şekil 3.5: Su banyosu cihazı.....	30
Şekil 3.6: Deney sürecimizde %80 konfluent A549 hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü.	31
Şekil 3.7: A549 akciğer kanser hücrelerinin steril T75 ve T25 flasklarına ekilmiş halleri.....	32
Şekil 3.8: Thoma lamı.	34
Şekil 3.9: Hücre sayımı şematik anlatımı.	34
Şekil 3.10: Hiperbarik oksijen uygulama kabini.	36

Şekil 3.11: Raman spektroskopisinde lama yerleştirilmiş hücrelerin ölçüm anı.....	39
Şekil 3.12: Raman spektroskopisi ölçüm düzeneği.	40
Şekil 3.13: İmmünohistokimyasal incelemelerde kullanılacak hücrelerin ekimi.....	42
Şekil 4.1: Çinko uygulanan A549 kanser hücrelerinde canlılık oranı.	46
Şekil 4.2: Melittin uygulanan A549 kanser hücrelerinde canlılık oranı.....	47
Şekil 4.3: Normalize raman şiddeti değerlerinin 725-1800 cm^{-1} bölgesi için raman spektrumu.	49
Şekil 4.4: Normalize raman şiddeti değerlerinin 725-950 cm^{-1} bölgesi için raman spektrumu.	52
Şekil 4.5: Normalize raman şiddeti değerlerinin 950-1230 cm^{-1} bölgesi için raman spektrumu.	55
Şekil 4.6: Normalize raman şiddeti değerlerinin 1230-1510 cm^{-1} bölgesi için raman spektrumu.	58
Şekil 4.7: Normalize raman şiddeti değerlerinin 1510-1800 cm^{-1} bölgesi için raman spektrumu.	60
Şekil 4.8: Bax immünohistokimyasal boyama yapılan gruplara ait görüntüler.	65
Şekil 4.9: Bcl-2 immünohistokimyasal boyama yapılan gruplara ait görüntüler.	66

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Arı zehri bileşenleri.....	12
Tablo 2.2: Nekroz ve apoptoz mekanizmalarının karşılaştırılması.	23
Tablo 4.1: Çinko ve melittin için farklı inkübasyon sürelerine göre elde edilen yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri.	48
Tablo 4.2: Deney gruplarının 725-1800 cm ⁻¹ bölgesindeki raman şiddetleri.....	50
Tablo 4.3: 828 cm ⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.	53
Tablo 4.4: 920 cm ⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.	54
Tablo 4.5: 980 cm ⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.	56
Tablo 4.6: 1224 cm ⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.	57
Tablo 4.7: 1360 cm ⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.	59
Tablo 4.8: 1544 cm ⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.	61
Tablo 4.9: 1697 cm ⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.	62
Tablo 4.10: 1788 cm ⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.	63
Tablo 4.11: Bax ve Bcl-2 immunopozitifliklerinin değerlendirilmesi.	67

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
HBO	: Hiperbarik oksijen
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
Zn	: Çinko
ZnT	: Zn taşıyıcı protein
ZRT	: Zn düzenleyici taşıyıcı protein
IRT	: Demir düzenleyici taşıyıcı protein
ZIP	: ZRT ve IRT düzenleyici taşıyıcılarla bağlantılı proteinler
ATP	: Adenozin trifosfat
Bcl-2	: B-hücreli lenfoma 2
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
FBS	: Fetal sığır serumu
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute 1640
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
DMSO	: Dimetik sülfoksit
ZnCl₂	: Çinko klorür
IC50	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu

ÖZET

[DOKTORA TEZİ]

[MELİTTİN, ÇİNKO ve HİPERBARİK OKSİJENİN A549 HÜCRE HATTINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ]

[Duygu TARHAN]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyofizik Anabilim Dalı

Biyofizik Programı

[Danışman: Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN]

[Akciğer kanseri, Dünyada ve Türkiye’de en çok teşhis konulan kanser türüdür. Akciğer kanserinin en sık rastlanan türü ise küçük hücreli dışı akciğer kanseridir. A549 hücre hattındaki hücreler, küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak tanımlanır. Bu tez çalışmasında A549 hücreleri üzerinde farklı etkilere sahip uygulamalar olan çinko (Zn) elementi, melittin peptiti ve hiperbarik oksijen (HBO) uygulamalarının hem tek tek hem de kombinasyonlar halinde beraber uygulanmaları durumunda Raman spektroskopisi ile moleküler düzeyde hücresel değişimlerini incelemeyi amaçladık. İlk olarak Zn ve melittin için 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde farklı dozlar uygulanarak yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC50) değeri tespit edilerek doz belirleme çalışması yapıldı. IC50 değerleri 48 saatlik inkübasyon sürecine göre melittin peptiti için 4,571 µg/mL ve Zn elementi için 61 µM ZnCl₂ belirlendi ve deney gruplarına (1.Grup:Kontrol; 2.Grup:Zn; 3.Grup:M; 4.Grup:ZnM; 5.Grup:HBO; 6.Grup:ZnHBO; 7.Grup:MHBO ve 8.Grup:ZnMHBO) uygulandı. A549 kanser hücrelerinde yaptığımız, melittin, Zn ve 1 saatlik HBO uygulamaları sonucunda elde ettiğimiz raman spektroskopisi analiz sonuçlarımızda her biri biyolojik yapılarda amino asitlerden bağ

yapılarına kadar bir çok yapıyı temsil eden karakteristik değerler olan 828 cm^{-1} , 920 cm^{-1} , 980 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} , 1697 cm^{-1} ve 1788 cm^{-1} değerlerinde raman şiddetine katkı sağlayan pikler elde edildi. Analizler sonucunda elde ettiğimiz verilerin istatistiksel ve morfolojik incelemeleri sonucunda, melittin ve HBO uygulamalarının tek tek etkili olduğu gibi beraber daha da etkili olduğunu ve Zn elementinin ise tek başına değilde beraber uygulamalarda tedavi edici etki oluşturduğunu tespit ettik. Sonuç olarak çalışmamızda uygulanan doz miktarları ve uygulama sürelerine göre melittin peptiti ve hiperbarik oksijen uygulamasının beraber, Zn elementinin ise diğer tedavilere destekleyici olarak uygulanmasının akciğer kanserinin tedavisinde umut verici bir gelişme sağlayacağı görüşündeyiz.]

Eylül 2022 , [108.] sayfa.

Anahtar kelimeler: [A549, Akciğer kanseri, Çinko, Melittin, Hiperbarik oksijen, Raman]

ABSTRACT

[Ph.D. THESIS]

**[INVESTIGATION of EFFECTS of MELITTIN, ZINC and HYPERBARIC OXYGEN
on A549 CELL LINE]**

[Duygu TARHAN]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Biophysics

Programme of Biophysics

[Supervisor : Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN]

[Lung cancer is the most diagnosed type of cancer in the world and in Turkey. The most common type of lung cancer is also non-small cell lung cancer. The A549 cell line are defined as non-small cell lung cancer. In this thesis, we aimed to examine the cellular changes at the molecular level by Raman spectroscopy when zinc (Zn) element, melittin peptide, and hyperbaric oxygen (HBO) applications, which have different effects on A549 cells, are applied both individually and together. Firstly, a dose determination study was performed by applying different doses for Zn and melittin in 24, 48, and 72 hours incubation periods and determining the half maximum inhibitory concentration (IC50). IC50 values were determined as 4,571 µg/mL for melittin peptide and 61 µM ZnCl₂ for Zn element according to the 48-hour incubation period and they were assigned to the experimental groups (1st Group: Control; 2nd Group: Zn; 3th Group: M; 4th Group: ZnM, 5th Group: HBO, 6th Group: ZnHBO, 7th Group: MHBO and 8th Group: ZnMHBO) were applied. In our Raman spectroscopy analysis results obtained as a result of melittin, Zn, and 1-hour HBO applications to A549 cancer cells, 828 cm⁻¹, 920 cm⁻¹, 980 cm⁻¹, 1224 cm⁻¹, 1360 cm⁻¹, 1544 cm⁻¹, 1697 cm⁻¹, and 1788 cm⁻¹ peak values contributing to Raman

intensity were obtained which are characteristic values that represent many structures from amino acids to bond structures in biological structures. As a result of the statistical and morphological analyzes, we determined that the melittin and HBO applications are more effective together as well as individually, and the Zn element creates a therapeutic effect in the applications together, not alone. Consequently, we conclude that the combined application of melittin peptide and hyperbaric oxygen application, but the application of Zn element as a supplement to other treatments, according to the dose amounts and application times applied in our study, will provide a promising development in the treatment of lung cancer.]

September 2022, [108] pages.

Keywords: [A549, Lung cancer, Zinc, Melittin, Hyperbaric oxygen, Raman]

1. GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize edilen ve vücutta ilk başladığı bölgeden diğer bölgelere de yayılabilen bir hastalıktır [1]. Akciğer kanseri, yapılan araştırmalarda Türkiye'deki ve dünyadaki en yaygın kanserlerden biridir [2]. Adenokarsinom olan insan akciğer kanseri hücre hattı A549 hücreleri, akciğer kanserinin sıklıkla rastlanan türlerindendir [3, 4]. Kanser hücrelerindeki metabolik aktiviteler normal olan hücrelerden farklıdır. Tümör hücreleri çoğaldıkça, beslenme yetersizliğine ve asidoza maruz kalarak hipoksik bir durumda olurlar. Hipoksi, dokuda veya hücrede parsiyel oksijen basıncının normal değeri altında olması olarak tanımlanır [5]. Hipoksik bir ortamda hücreler durumu kompanse edebilmek için metabolizma hızları artar. Kanser hücreleri profilasyon ve büyüme için artan enerji ihtiyaçlarını anaerobik glikolizden sağlayarak hızlı tümör progresyonunu kolaylaştırır. DNA hasarları oluşmasına rağmen kanser hücrelerindeki genetik mutasyonlardan dolayı apoptozdan kurtulurlar [6-8]. Böylece kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalırlar.

Kanser ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılan hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi, 1 atmosfer mutlak basınçtan (760 mmHg) daha yüksek basınç oluşturulmuş kabinlerde uygulanan bir yöntemdir [9]. HBO tedavisinin hem kanser hücreleri üzerinde hem de kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinin etkilerini artırmak konusunda olumlu etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır [10, 11]. Ayrıca HBO tedavisinin yanı sıra kanser hücreleri üzerine arı zehri ve bileşenlerinin olumlu etkileri de mevcuttur. Arı zehrinde en fazla bulunan bileşenlerden biri olan melittin, önemli bir polipeptit olup malign hücrelerin sitotoksitesinden dolayı anti-kanser özelliği bakımından dikkat çekmektedir [12, 13]. Çinko elementinin ise kanser hücreleri üzerinde çift yönlü bir etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarda ileri sürülmüştür [14-16]. Çinko, insan vücudunda eser miktarda bulunmasına rağmen, immün sistemin cevabı, hücresel metabolizmada hücre bölünmesi, protein sentezi, DNA sentezi ve 300'den fazla enzimin katalitik aktivitesi gibi birçok açıdan önemli görevlere sahip ve aynı zamanda toksik etkilere de neden olabilen bir eser elementtir [17, 18]. Çinko elementinin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar olmasına rağmen, çinko elementinin doz ve uygulama süresi ve ayrıca kanser türüne göre farklı etkiler gösterdiği çalışmalarda ifade edilmiş ve tam olarak nedeni henüz açıklanamamıştır [14, 15, 19]. Diğer yandan kanser hücreleri üzerinde ayrı ayrı

HBO tedavisi ve melittin peptiti uygulamalarının tedavi edici etkileri olduğu ifade edilmiş [11, 13, 20-22] olmasına rağmen, beraber uygulanmaları halinde hücresel yapıya olan etkileri üzerine çalışma bulunmamaktadır. HBO ve melittin peptidine ek olarak çinko elementinin uygulanması durumunda A549 akciğer kanser hücreleri üzerinde apoptotik etki görülüp görülmediği, tedavide olumlu etki yaratıp yaratmadığı üzerine de çalışmalar bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, akciğer kanseri hücre hattı A549 hücreleri üzerine arı zehrinden elde edilen melittin peptiti, çinko eser elementi ve hiperbarik oksijen tedavisi uygulanması durumunda Raman spektroskopisi ve immünohistokimyasal analiz ile hücredeki değişimlerin incelenmesi amaçlanmaktadır.



2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. KANSER

Kanser, insanlık tarihi boyunca hakkında birçok teori ortaya konulan, nasıl ortaya çıktığı anlaşılmaya çalışılan, farklı tip tedaviler geliştirilen ve üzerinde birçok bilimsel çalışmalar yapılan bir hastalıktır. Tarihte kanser ile ilgili en eski yazılı kayıtlara yaklaşık olarak M.Ö. 3000 yıllarında Mısırlı Edwin Smith Papirusunda karşılaşılmıştır. Hipokrat (M.Ö. 460-375) ve öğrencileri ise birçok kanser türünü tanımlamıştır. Kanser kelimesi, Eski Yunanca yengeç anlamına gelen “καρκίνοϲ, carcinos” ve Arkaik Latince “carcr-os” kelimelerinden türemiştir [23].

Dünya çapında ölüm nedenleri arasında kanser ikinci sıradadır. Dünya Sağlık Örgütü’nün (DSÖ) verilerine göre 2018 yılında her altı ölüm vakasından birinin yani yaklaşık 9.6 milyon ölüm vakasının nedeninin kanser olduğu ifade edilmiştir. DSÖ verilerine göre tüm dünyada kanser vakaları ve ölümlerinin nedenleri %25 sigara tüketimi, %4-5 alkol tüketimi, %13 enfeksiyon, %3-4 obezite, %1 ultraviyole ışınları ve %2-8 mesleki riskler olarak raporlanmıştır [24].

Kanser, ilk başladığı bölgeden vücudun diğer bölgelerine yayılması ve kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen bir hastalıktır. Kanser hastalığının tanımını biraz daha genişletecek olursak; temel olarak DNA’da meydana gelen mutasyonlar sonucunda kanser hücrelerinin, düzenli olarak hücre büyümesi ve çoğalmasını sağlayan ve denetleyen mekanizmalardan kaçmasıdır. Başta belirttiğimiz gibi kanser hücreleri başladığı bölgeden vücudun farklı bölgelerine yayılabilir. Bu durum aslında benign ve malign tümör arasındaki farkı belirleyen bir faktördür. Benign tümör sınırları belirgin, invaze olmayan ve metastaz yapmayan iyi huylu tümördür. Diğer yandan malign tümör ise invaze olan ve metastatik özellikler gösteren sınırları belirsiz agresif ve kötü huylu diye tanımlanan bir tümördür. Ayrıca kanser hücreleri türedikleri hücrenin türüne göre de sınıflandırılır. Kemik, kas gibi mezoderm hücrelerden türemiş olan kanserlere sarkoma, meme gibi glandüler dokudan türeyenlere ise adenokarsinoma adı verilir [1, 25, 26].

Normal hücrenin kanser hücrelerine dönüşmesi süreci olan karsinogenez sürecinde kanser hücreleri, hücresel düzenleme ve kontrol mekanizmalarını kaybederler. Tümör gelişimi

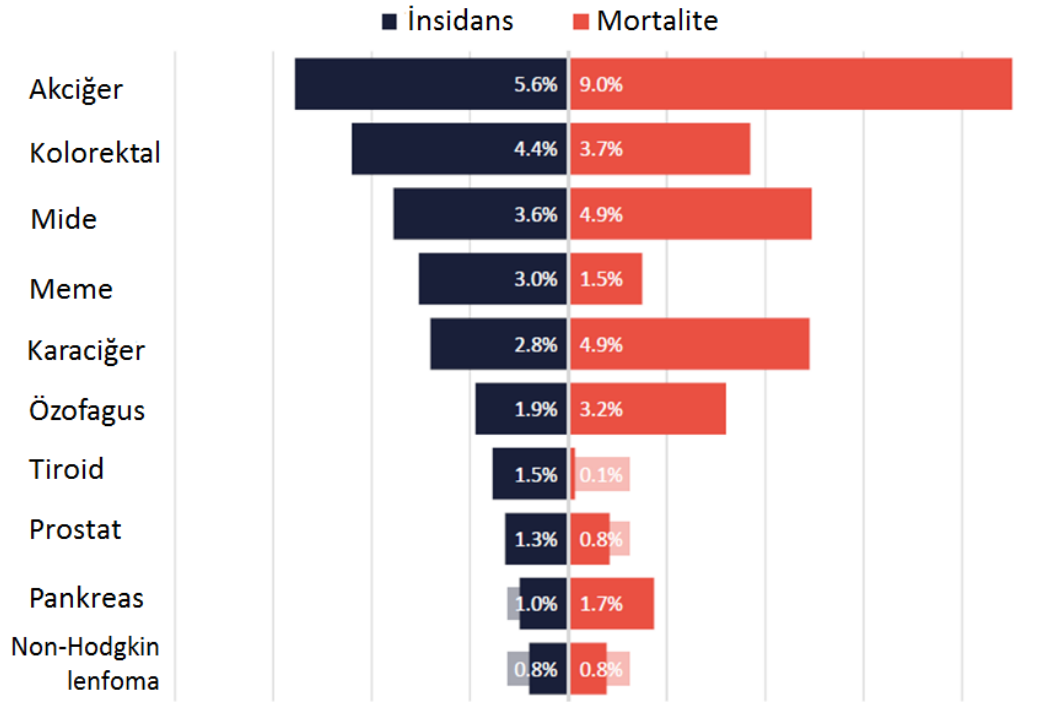
sürecinde büyüyen hücrelerin sayısında normal olmayan artış nedeniyle aşırı doku gelişimi olarak ifade edilen hiperplazi oluşur. Ayrıca bu süreçte kanser oluşumunda rol oynayan genom bütünlüğü sağlayan kontrol mekanizmaları ve bağışıklık sisteminin cevabından kaçış, hücreler arasındaki bağlantıların zayıflaması, otofajinin gerçekleşmemesi, hücre içi sinyal yollarının ve telomeraz aktivitesinin bozulması, anormal DNA metilasyonu ve onkogenlerin hipometilasyonu, replikatif ve mitotik düzenin bozulması sonucunda hücresel stresin artışı ve DNA hasarı olarak ifade edilen temel moleküler faktörler vardır. Kanser hücreleri ile normal hücreler arasında kontrolsüz büyüme ve çoğalma potansiyelini açıklayan temel ayırt edici özellikler bulunur. Bu “kanser ayırt edici özellikler” olarak tanımlanan özellikler 10 madde olarak gruplandırılabilir. [25-28].

1. Büyüme sinyaline ihtiyaç duymadan büyüebilme
2. Büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçınma
3. Apoptotik sinyallerden kaçınma
4. Sınırsız bölünme potansiyeli
5. Bağışıklık sisteminden kaçış
6. İnvazyon ve metastaz
7. Anjiogenez
8. Kanseri destekleyen enflamasyon
9. Enerji metabolizmasını değiştirme
10. Genetik mutasyonlar

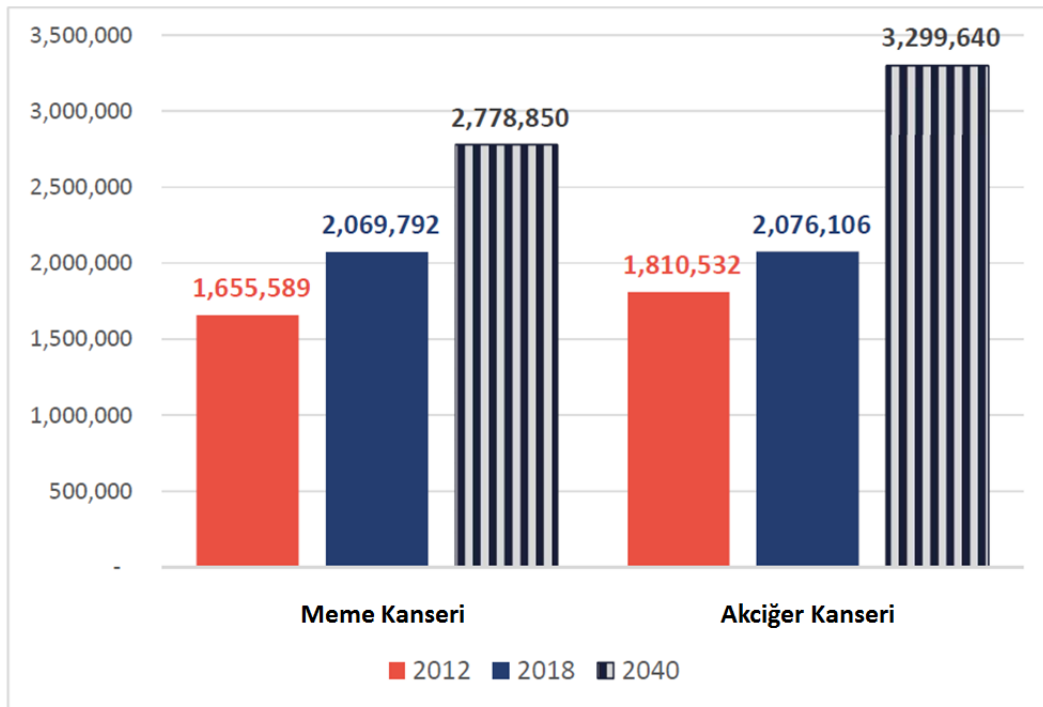
2.1.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri, dünya çapında yılda ortalama 2.20 milyon yeni akciğer kanseri vakası ve 1.79 milyon ölüm sayısı ile en sık teşhis edilen kanserlerden biridir [29]. DSÖ verilerine göre Türkiye ve tüm dünyada 2018 yılında kanser teşhisi konmuş olan vakaların büyük bir kısmını akciğer kanseri oluşturur ve en çok ölüme neden olan kanser türüdür. Dünyada akciğer kanserinin insidansı %5,6 ve mortalite oranı %9’dur (Şekil 2.1). Ayrıca dünya genelinde geçmiş verilere göre yapılan incelemelerde 2040 yılında akciğer kanserinin yıllık vaka sayısı 3.299.640 olarak tahmin edilmiştir (Şekil 2.2). Tüm dünyada akciğer kanserinin hızı cinsiyetlere göre incelendiğinde erkek cinsiyeti için 100.000’de 31,5 iken kadın cinsiyetinde 100.000’de 14,6

olarak bulunmuştur. Akciğer kanseri, dünyada kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırada iken erkeklerde en sık görülen kanser türüdür [24].



Şekil 2.1: Dünya genelinde kanser türlerinin insidans ve mortalite oranları.

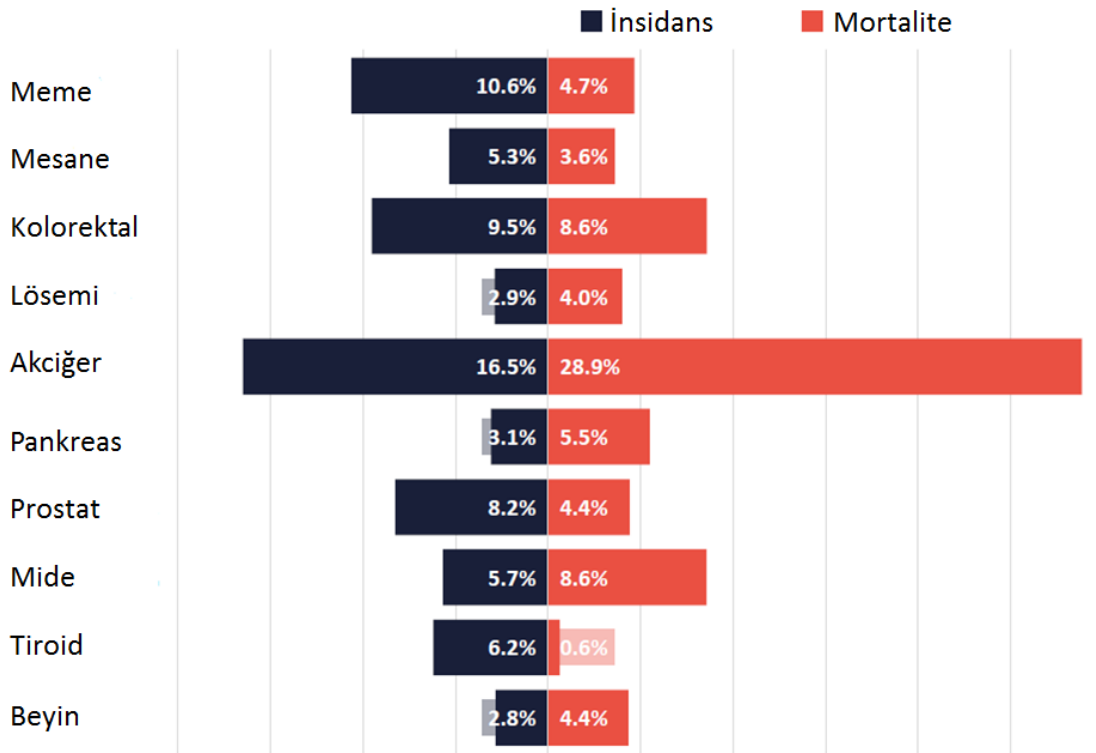


Şekil 2.2: Dünya genelinde geçmiş ve gelecek yıllara ait meme ve akciğer kanserinin tahmini vaka sayıları.

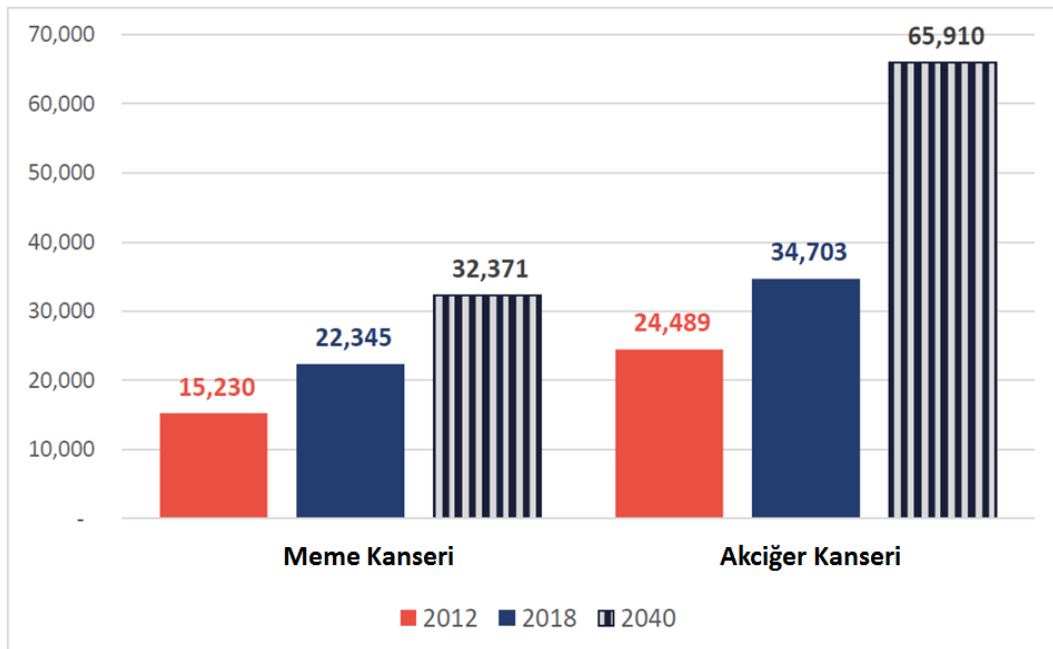
Dünyada olduğu gibi akciğer kanserinin görülme sıklığı ülkemizde de artış gösterir. Türkiye’de akciğer kanseri vaka sayıları 2018 yılında erkeklerde ilk sırada iken kadınlarda beşinci sıradadır [24]. Türkiye’de akciğer kanserinin insidansı %16,5 ve mortalite oranı %28,9’dur (Şekil 2.3). Bununla beraber Türkiye genelinde 2012 ve 2018 yıllarına ait verilere göre yapılan hesaplamalar sonucunda akciğer kanserinin 2040 yılında vaka sayısının 65.610 olacağı tahmin edilmektedir (Şekil 2.4) [24, 29].

Akciğer kanseri dünyada oldukça önemli bir sağlık sorunudur. Çünkü akciğer kanseri tanısı konulan vakalarda yaşam süresi ortalama 1 yıl olup %19 oranında 5 yıllık sağkalım oranı vardır. Akciğer kanseri tanısı konulan vakaların %16’sında tümör akciğerde lokalize olup bu vakaların 5 yıllık sağkalım oranları %57’dir. Diğer yandan metastatik akciğer kanserinde ise 5 yıllık sağkalım oranı %5’in altındadır [30, 31].

Akciğer kanserinin etiyolojisine baktığımızda sigara tüketimi yaklaşık olarak %90 oranında akciğer kanserine neden olurken sigara dumanına pasif olarak maruz kalındığında bile %3,5 oranında akciğer kanserinin gelişmesi söz konusudur. Çevresel ve mesleki faktörlerden dolayı asbeste maruz kalınması %3-4 oranında akciğer kanseri riskini artırır. Bunun dışında çevresel ve mesleki faktörlerden dolayı eter, radon, arsenik, nikel, formaldehit ve vinil klorid gibi maddelere maruz kalınması da akciğer kanserine neden olabilir. Akciğer kanserinin nedenlerinden bir diğeri de enfeksiyon durumudur. Örneğin; akciğer kanserinin insidansı HIV ile enfekte olmuş kişilerde daha yüksektir. Bunlara ek olarak, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve idiyopatik pulmoner fibrozis gibi akciğer hastalıkları ile akciğer kanser riski artış gösterir. Ayrıca genetik faktörlerden dolayı birinci derece akrabalarında akciğer kanseri tanısı konulmuş olan kişilerde akciğer kanser riski daha yüksektir [32-35].



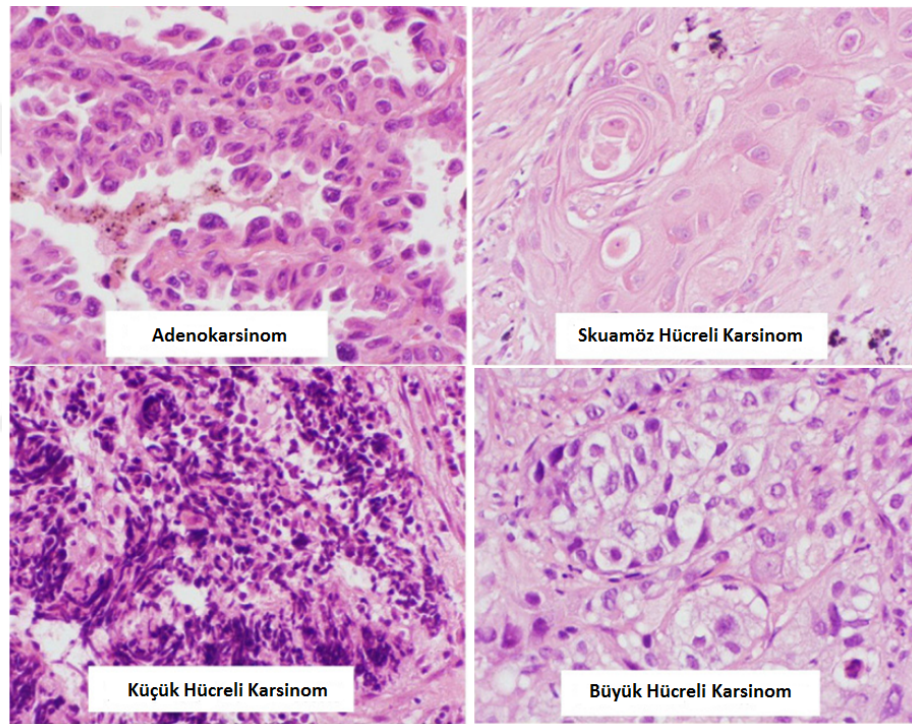
Şekil 2.3: Türkiye'deki kanser türlerinin insidans ve mortalite oranları.



Şekil 2.4: Türkiye’de geçmiş ve gelecek yıllara ait meme ve akciğer kanserinin tahmini vaka sayıları.

2.1.2. Akciğer Kanserinin Histopatolojisi

Akciğer kanseri, histopatolojisi açısından çok çeşitli özelliklere sahip heterojen bir hastalıktır. Akciğer kanserinin neredeyse tüm alt tiplerinde sigara tüketimine bağlı olarak güçlü bir ilişki olmasına rağmen, adenokarsinom alt tipi sigara kullanmamış hastalarda daha sık görülen bir akciğer kanser tipidir. Akciğer kanseri, kanserli hücre popülasyonunun büyüklüğüne bağlı olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki ana gruba ayrılır. Akciğer kanseri tanısı konulmuş vakaların yaklaşık %15'ini KHAK tipi oluştururken vakaların yaklaşık %85'ini KHDAK tipi akciğer kanserleri oluşturur [36-39].



Şekil 2.5: Akciğer kanseri tiplerinin histolojik profilleri.

Küçük hücreli akciğer kanserinin (KHAK) çoğunlukla kemik, karaciğer, beyin ve adrenal bezlere metastaz yapar. Akciğer kanseri vakalarında daha az görülmesine rağmen KHAK tanısı konulduktan sonra çoğu vaka yaklaşık 1 yıl hayatta kalabilirken; 5 yıllık sağkalım oranı %7'den daha azdır. [36, 41, 42]. Ayrıca Şekil 2.5'de görülen akciğer kanserinin hücresel açıdan KHAK tipinin hematoxilen ve eozin boyaması ile histolojik profilidir [40].

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), kendi içinde adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli akciğer karsinomu olarak 3 gruba ayrılır (Şekil 2.5).

KHDAK tanısı konulan vakalarda toplam 5 yıllık sağkalım oranı %19,3 olmakla beraber KHAK vakalarına göre daha yüksektir [36, 38, 42, 43].

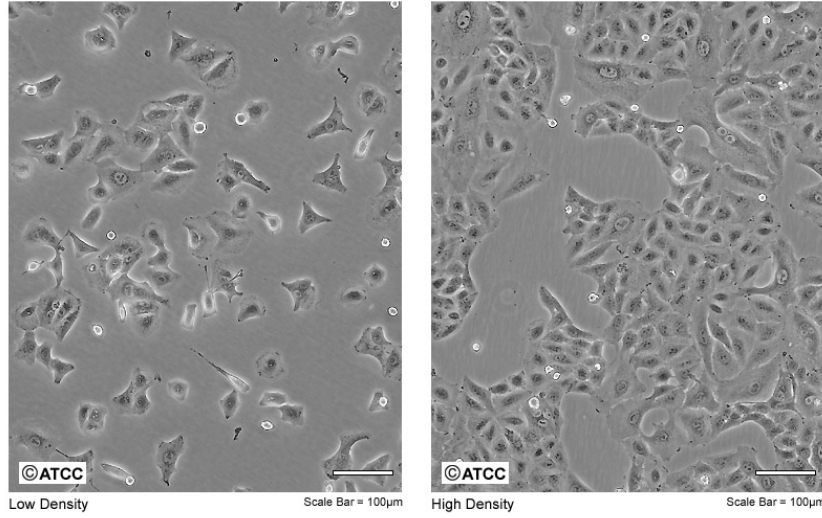
Akciğer kanserinin büyük bir kısmını oluşturan KHDAK tipi, kendi içinde adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak 3 alt tipe ayrılrsa da, bunlardan ayrı olarak sarkomatoid karsinomlar ve tükürük bezi tipi tümörler de KHDAK tipinin çok küçük bir bölümünü oluşturur. KHDAK tanısında, tümör hücrelerinin morfolojik özellikleri değerlendirilir; yani histolojik sınıflandırma yapılmasının ardından yardımcı immünohistokimyasal ve immünositokimyasal yöntemler uygulanır [41, 44, 45]. KHDAK'nın karsinogenez süreci, hücre farklılaşması, büyümesi, hücre göçü ve programlı hücre ölümü olan apoptoz aşamasında görevli genlerin mutasyonları gibi birçok basamaktan oluşan bir süreçtir. Akciğer kanserinin KHDAK tipi vakaları, tedavi yöntemlerinden radyoterapi ve kemoterapiye daha az duyarlıdır [46].

- Adenokarsinom: Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %38,5'ini oluşturan adenokarsinomlar KHDAK tipi akciğer kanserlerinin en çok rastlanan alt tipidir. Genel olarak adenokarsinomlar akciğer dokusunun periferinde bulunur. Kadınlarda daha sık görülür [47, 48].
- Skuamöz hücreli karsinom: Akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturan skuamöz hücreli karsinomlar, genellikle lobar veya ana bronştan kaynaklanan merkezi bir yerde ortaya çıkar. Kadınlara oranla erkeklerde skuamöz hücreli karsinom tipi daha çok görülür [41, 47].
- Büyük hücreli karsinom: Akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %2,9'unu oluşturan büyük hücreli karsinomlar, glandüler, skuamöz hücre veya küçük hücre olarak immünohistokimyasal veya histolojik kanıt göstermeyen bir KHDAK karsinomu olarak tanımlanır [41].

2.1.3. A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattı

A549 akciğer kanser hücreleri, adherent yani yüzeye yapışarak büyüyen, hücre tipi epitel hücre ve morfolojik olarak epitel benzeri olarak sınıflandırılan KHDAK tipi hücrelerdir (Şekil 2.6) [49]. 1973 yılında bir çalışmada 58 yaşında beyaz ırktan bir erkek hastadan alınan pulmoner adenokarsinom hücrelerinin vücut dışında izole edilip kültür edilmesi sonucunda elde edilmiştir [50]. Akciğer kanserinin en sık rastlanan tiplerindendir.

ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**



Şekil 2.6: A549 akciğer kanseri hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.

2.2. MELİTTİN

Arıcılık, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de önemli ve giderek önem kazanan ekonomik kaynaklardan biridir. Ülkemiz arıcılık açısından oldukça verimli bir coğrafyaya sahiptir. Bölgelere göre ülkemiz, Ege kıyılarında Muğla arısı, Gökçeada yöresinde Gökçeada arısı, Hatay yöresinde Suriye arısı, Düzce yöresinde Yığılca arısı, Kuzeydoğu Anadolu’da Kafkas arısı, Orta Anadolu’da Anadolu arısı, Güneydoğu Anadolu’da İran arısı ve Trakya bölgesinde Karniyol arısının olduğu zengin bir tür çeşitliliğine sahiptir [51].

Arıcılık sayesinde insanoğlu yüzyıllardır arı ürünlerini tedavi amaçlı olarak kullanır. Özellikle bal arısı (*Apis mellifera*) ürünlerinden bal, polen, propolis, arı sütü ve arı ekmeğinin yanı sıra arı zehri de oldukça faydalıdır. Bal arısı zehri kokusuz, açık renkli, keskin bir tadı olan acı bir sıvıdır. Şeffaflığı ile suya benzeyen ve asidik bir yapıda olan (pH: 5-5,5) bu zehrin %88’ini su oluşturur. Dolayısıyla, arı zehri oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakika içerisinde kuruyarak ağırlığının yaklaşık %65-70’ini kaybeder ve sarımtırak kahverengimsi bir toz haline gelir [52-55].

Bal arısı zehri, işçi arıların kolonilerini korumak ve kraliçe arının ise rakibini etkisiz bırakabilmek için yaklaşık 12 günlük olduktan sonra alkali ve asit salgı bezlerinde üretilip arı iğnesi ile bağlantılı olan vücutlarının zehir kesesinde depolanır. Bir bal arısının zehir kesesinde yaş olarak 0,3 mg zehir ve bu yaş zehirden 0,1 mg kuru arı zehri elde edilir. Arı zehri elde

edilme yöntemlerinin arasında ilk sırayı elektrik şoku uygulaması alır. Kovana yerleştirilen tel ızgaranın altına steril ve geçirgen bir yüzey oluşturulduktan sonra kovana aralıklı olarak elektrik akımı uygulanır. Arıların bu durumu bir dış tehdit olarak algılaması sonucunda arılar tel ızgara ile temas edip alttaki geçirgen yüzeye iğnelerini batırıp zehirlerini bırakırlar. Bu şekilde zehrin sağım işlemi gerçekleştirilirken bal arıları ciddi bir zarar görmez. Bir kovanda 10.000 arı bulunduğu varsayıldığında sağım işleminin ardından elde edilen kuru arı zehri miktarı yaklaşık 1 gramdır [54-57].

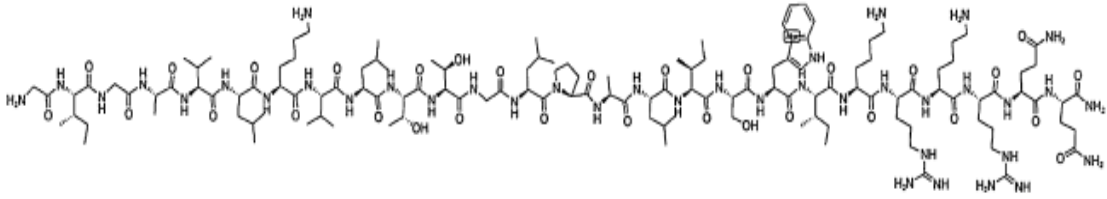


Tablo 2.1: Arı zehri bileşenleri.

Madde Sınıfı	Bileşen	Kuru Arı Zehrinde bulunma miktarı %
Enzimler	Fosfolipaz A2	10-12
	Hiyalüronidaz	1-3
	Asit fosfomonoesteraz	1
	Lizofolipaz	1
	α -Glukozidaz	0,6
Proteinler ve peptitler	Melittin	40-50
	Apamin	1-3
	MCD peptit	1-2
	Sekapine	0,5-2
	Procamine	1-2
	Adolapin	1
	Proteaz inhibitör	0,8
	Tertiapin	0,1
	Diğer küçük peptitler (< 5 amino asit)	13-15
Fizyolojik olarak aktif aminler	Histamin	0,5-2
	Dopamin	0,2-1
	Noradrenalin	0,1-0,7
Amino asitler	Aminobütirik asit	0,5
	α -Amino asitler	1
Şekerler	Glukoz ve fruktoz	2
Fosfolipidler		5
Uçucu bileşikler		4-8

Doğal bir toksik madde olan bal arısı zehri enzimlerin, proteinlerin, peptitlerin, amino asitlerin, biyojenik aminlerin, minerallerin ve şekerlerin oluşturduğu oldukça karışık bir kimyasal içeriğe sahiptir. Arı zehri melittin, adolapamin, apamin ve mast hücre degranüle edici peptitler (MCD peptit) dahil olmak üzere fosfolipaz A2 (PLA2) ve hiyalüronidaz enzimlerini, karbonhidratları, biyolojik olarak aktif aminleri, lipidler, serbest amino asitler dahil peptit olmayan bileşenleri de içerir. Bal arısı zehrinin tüm ana bileşenleri ve bunların arı zehrinin kuru ağırlığında bulunma yüzdeleri Tablo 2.1'de verildi [12]. Tablo 2.1'de de görüldüğü üzere bal arısı zehrinin en temel iki bileşeni melittin ve fosfolipaz A2'dir [58-61].

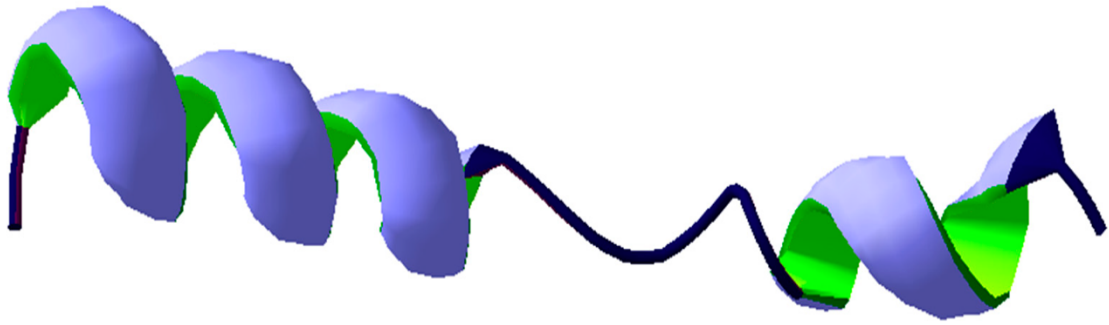
Melittin, bal arısı zehrinden elde edilen doğal bir ürün olup zehrin kuru ağırlığının neredeyse yarısını oluşturan ana toksik maddedir. Güçlü bir hemolitik etkiye sahip olan melittin, moleküler ağırlığı 2846,46 Da ve kimyasal formülü $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ olan lineer bir peptittir (Şekil 2.7) [12]. Melittin, NH_2 ve $CONH_2$ terminal uçları arasında bilinen 26 adet amino asit dizisinden oluşur: NH_2 -Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln- $CONH_2$ [62, 63].



Şekil 2.7: Melittin peptitinin yapısı.

Melittin, peptit zincirindeki 26 adet amino asidinin spesifik düzenlenmesi ile amfoterik özelliğe sahip bir moleküldür. Peptit zincirinde N-terminal ucunda hidrofobik, polar olmayan ve nötr amino asitler (1-20'ye kadar olan amino asitler) bulunurken C-terminal ucunda ise hidrofilik ve bazik amino asitler (21-26 kadar olan amino asitler) bulunur. Ayrıca melittin, yüksek membran ve yüzey gerilimine sahiptir. Bir tetramer olarak melittin molekülü, suda çözünür olmasına rağmen hem sentetik hem de doğal membranlara kendiliğinden entegre olup fosfolipid çift katmanların yapısında düzensizliklere neden olur. Melittinin entegre olarak indüklediği membranlardaki oluşan morfolojik değişiklikler, G-protein, adenilat siklaz, protein kinaz C, fosfolipaz C ve D olmak üzere çeşitli enzimleri uyarır [12, 64, 65]. Bu özelliklere ek olarak, her melittin peptit zinciri iki α -sarmal parça halindedir. Melittin zincirindeki bu iki α -sarmal parçanın üç boyutlu genel hali Şekil 2.8'de görüldüğü gibi bükülmüş bir çubuk şeklindedir [22]. Zincirin N-terminal ucundan sonraki 20 amino asitlik kısım polarite özelliklerine göre melittinin bükülmüş çubuk şeklinin etrafında asimetrik olarak dizilmişken,

C-terminal ucundaki 6 amino asitlik kısım tümüyle polardır. Bu özelliklere sahip olan melittin zinciri, tetramer ve monomer formlara sahiptir. Melittin arının zehir kesesinde tetramer formda iken; hücre lizizi için gereken minimum konsantrasyonda monomer formdadır. Aslında melittin zinciri tetramer formunda iken alt birimler arasındaki etkileşimlerin neredeyse tümü hidrofobik etkileşimlerdir. Monomerlerin hidrofobik etkileşimleri ve tetramer formdaki 24 pozitif yükün elektrostatik itme gücü arasındaki bu denge nedeniyle melittin, arının zehir kesesindeki konsantrasyon miktarında tetramer yapıdadır [62, 66].



Şekil 2.8: Melittin peptitinin 3-boyutlu yapısı.

Melittinin tüm bu yapısal özelliklerinin toksik bir madde olmasında önemli katkıları vardır. Dolayısıyla melittin toksik etkilerinin yanı sıra birçok hücre tipinde anti-bakteriyel, anti-inflamatuar ve anti-viral olmak üzere birçok etkiye sahiptir. Ayrıca kanser hücrelerinin membranında oluşturduğu etki nedeniyle kanser kemoterapisi için hem tek başına hem de kemoterapötik ajanlarla kombinasyonları açısından melittin oldukça ilgi çekici bir moleküldür [12, 67, 68].

2.3. ÇİNKO ESER ELEMENTİ

Organizmanın gelişimi ve canlılığının devam edebilmesi için elementlere ihtiyaç vardır. Elementler, canlı organizmanın günlük gereksinim miktarlarına göre makro ve mikro elementler olarak gruplandırılabilir. Kalsiyum, fosfor ve sodyum gibi organizma tarafından günlük gereksinimi 100 mg/kg'dan fazla olan elementler makro elementler grubunda iken; çinko, demir, bakır, selenyum, mangan ve krom gibi organizmanın günlük gereksinimi 100 mg/kg'dan daha az olan elementler ise mikro ya da diğer bir ifadeyle eser elementler grubundadır [17]. Eser elementler, organizmadaki miktarlarının az olmasına rağmen birçok biyolojik ve fizyolojik faaliyetlerin regülasyonunda, çeşitli vitamin, protein ve enzimlerin yapısına katılarak Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonlarında, vücut pH'sının düzenlenmesinde, kas kasılmasında, sinir

iletiminde ve enerji üretiminde vücut için son derece hayati görevleri vardır [69-78]. Dolayısıyla eser elementler, organizmada yaşamın sürdürülebilmesi için gerekli olan ve yeterli miktarda vücutta bulunmadıklarında fonksiyon bozukluklarına yol açabilen elementlerdir. Diğer taraftan eser elementlerin vücutta olması gerekenden fazla bulunmaları durumunda ise toksikasyona neden olarak ölüme bile yol açabilirler. Bu nedenle, yaşamın sürdürülmesi için eser element miktarı fizyolojik olarak yeterli olan miktarlarda alınması gerekir. Dolayısıyla organizmaya yeterli miktarda eser element alındığında yaşamsal fonksiyonların devam ettirilmesine ek olarak mevcut olan bozuklukları düzelterek ileride oluşabilecek olumsuz durumları da önleyebilirler. Bu durumda, eser elementler miktarlarına bağlı olarak organizma için faydalı veya zararlı özelliklere sahip hale gelebilen elementlerdir [17, 18, 69].

Canlı organizmadaki en önemli eser elementlerden biri olan çinko (Zn), hücre farklılaşması ve proliferasyonu için gerekli bir elementtir. Kimyasal özelliklerine bakıldığında çinko elementi atom numarası 30 olan ve 65,409 g/mol atom ağırlığına sahip periyodik tabloda geçiş elementi olup redoks tepkimelerine katılmayan bir elementtir. Canlı organizmada çinko elementi +2 değerlikli formunda bulunur. Ayrıca çinko, insan vücudunda demir elementinden sonra en çok bulunan eser elementtir. Çinko elementi, yaklaşık 300 enzimin yapısında kofaktör olarak bulunup yapısal bütünlüğün korunmasında rol alır. Klinik olarak önemli olan ve yapısında çinko bulunduran enzimlerden bazıları; glutamat dehidrogenaz, alkalen fosfataz, karbonik anhidraz, timidin kinaz, Zn-Cu süperoksit dismutaz, RNA ve DNA polimeraz, alkol dehidrogenaz ve karboksipeptidaz enzimleridir. Ayrıca, 2000'den fazla transkripsiyon faktörü DNA'ya bağlanırken çinko elementine ihtiyaç duyar. Dolayısıyla, çinko katalitik ve düzenleyici bir eser element olup organizmadaki biyokimyasal fonksiyonların birçoğuna protein yapı ile beraber katılır. Bunlara ek olarak çinko elementi tat ve koku duyularından, büyüme ve normal gelişim sürecinden, immün sistemin cevabından yara iyileşmesine kadar birçok önemli fizyolojik olayda da görev yapar [80-83].

İnsan vücudunda çinko elementinin yoğun olduğu dokular prostat, karaciğer, hipokampus, retina, kemik ve kas dokusudur. Kan dolaşımında çinko elementinin yaklaşık olarak %60-70'i albumin tarafından taşınırken geri kalanının büyük bir miktarı ise α_2 -makroglobulin ile taşınır. Sağlıklı bir insanın plazma Zn konsantrasyon değerleri 80-120 $\mu\text{g/dL}$ civarında olmalıdır. Hücresel metabolizmada ise çinko elementi intrasellüler sıvıda yoğun bir şekilde bulunmasına rağmen büyük kısmı protein yapıya bağlı ve çok daha az miktarı ise serbest iyon halindedir. Çinko konsantrasyonunun homeostazı, Zn taşıyıcılar tarafından düzenlenir.

Hücresel düzeyde moleküler ve biyokimyasal olaylara katkıda bulunan Zn taşıyıcı proteinleri, çinko hücre giriş-çıkışlarından sorumlu olup intrasellüler-ekstrasellüler Zn konsantrasyon miktarını kontrol eder. Moleküler düzeyde, çinko elementi ZnT protein (Zn Transporter; Zn taşıyıcı protein) ailesine ek olarak ZIP (ZRT (Zinc-regulated transporter and IRT (iron-regulated transporter)-like Protein; Zn ve demir düzenleyici taşıyıcılarla bağlantılı proteinler) ailesi proteinlerinin metal taşıyıcıları sayesinde taşınır. İnsanda 10 tane ZnT ailesi ve 14 tane ZIP ailesi üyesi tanımlıdır. Hücrede ZnT proteinleri intrasellüler ortamdan hücre organellerine veya intrasellüler ortamdan ekstrasellüler ortama Zn taşınmasında görev yapar. Diğer yandan, ZIP proteinleri ise hücre organellerinden veya ekstrasellüler ortamdan intrasellüler ortama Zn taşınmasında görevlidir [17, 80, 84-86].

Çinko elementi ve kanser:

Her kanser türünde çinkonun potansiyel etkisi ve mekanizması çeşitlilik gösterir. Kanser gelişimi ile ilerlemesi üzerine çinkonun etkileri sistemik ve hücresel olarak ayrılabilir. Sistemik etkiler, çinkonun bağışıklık sistemi ve vücut fonksiyonları üzerine etkileridir. Çinkonun hücresel etkileri ise sağlıklı hücrelerin malign hücrelere dönüşmesi ile beraber bu hücrelerin gelişimi ve ilerlemesi üzerine etkileridir. Hücresel etkileri daha detaylı ele alacak olursak çinko elementi hedef genler veya transkripsiyon faktörleri üzerine etkisinden dolayı gen ekspresyonunu değiştirebilir. Ayrıca sentetik ve biyoenerjetik gereksinimleri sağlayan hücre metabolizmasını, hücre proliferasyonunu, apoptozu, hücre göçü ve invaziv faaliyetlerini etkileyebilir. Dolayısıyla çinko elementi bu hücresel etkilere doğrudan neden olabileceği gibi biyolojik olarak birbiri ile bağlantılı süreçleri dolaylı yoldan etkilemesi söz konusudur. Ayrıca kanser hücrelerinde çinko taşıyıcıların fonksiyonlarını yerine getirmemesinden dolayı intrasellüler ve ekstrasellüler ortamlardaki çinko homeostazı bozulabilir. Çinko düzeyinin hücre içinde artması da canlılığın artmasına neden olabilir. Fakat kolon, prostat, deri kanseri gibi kanser türlerinde hastaların serum değerlerinde çinko elementi düşük seviyede gözlenirken, göğüs ve akciğer kanseri hastalarında ise yüksek çinko seviyesi tespit edilmiştir [87, 88]. Dolayısıyla dolaşımdaki çinko seviyesi kanser türüne göre farklılık gösterebilir. Diğer yandan hücresel boyutta çinko elementinin apoptoz ile ilişkisi oldukça önemli ve farklılık gösteren bir konudur. Çinkonun konsantrasyona bağlı olarak apoptoz üzerinde indüksiyon ve inhibisyon olmak üzere iki farklı etkisi vardır. Hücresel etkileri açısından çinko elementi, nöronlar ve gliyal hücreler, prostat, yumurtalık, özofagus epitel hücreleri, hepatoma hücreleri gibi hücre tiplerinde apoptozu indüklerken göğüs hücreleri, akciğer epitel hücreleri, böbrek hücreleri,

lenfositler, Hela hücreleri gibi hücre tiplerinde ise apoptozu inhibe eden etkiler gösterir [19, 89, 90]. Hücre tipinin dışında, bazı hücrelerde yüksek çinko konsantrasyonuna maruz kalmak apoptozu engellerken; düşük çinko seviyelerinde ise apoptoz indüklenebilir [19, 91]. Dolayısıyla çinko elementinin değerlendirilmesinde etkileri açısından hücresel çinko düzeyi ile ilgili bilgiler tartışmalıdır. Genel olarak çinkonun apoptoz üzerine etkileri kanser hücrelerinin gelişiminin düzenlenmesinde önemli rol oynamasının yanı sıra bu apoptotik etkiler doz, inkübasyon süresi ve hücre türüne göre de farklılık gösterebilir.

2.4. HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ (HBO)

Medikal alanda yüksek basıncın kullanılması ilk olarak 1662 yılında İngiliz hekim Henshaw tarafından ortaya atılmıştır. Daha sonra oksijen molekülünün 1775 yılında Priestly tarafından tanımlanması ve medikal alanda tedavi edici özelliklerinin ifade edilmesi hiperbarik oksijen (HBO) tedavisinde önemli gelişmelerdir. Günümüzde medikal alanda bilinen anlamıyla HBO tedavisinin kullanımı, 1954 yılında İngiltere’de Churchill Davidson tarafından tümör dokusunun radyosensitivitesini artırmak amacıyla uygulandı. Teknoloji ve HBO tedavisi alanında yapılan çalışmalar sonucunda 1961 yılında Smith ve arkadaşları serebral iskemi tedavisinde, Boerema ve Brummelkamp ise gazlı gangren tedavisinde HBO tedavisini uyguladı. İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar ve toplantılar sonucunda tedavi esasları ortaya kondu. Türkiye’de ise HBO tedavisi 1984 yılında GATA Haydarpaşa Hastanesi’nde Deniz ve Sualtı Hekimliği Anabilim Dalı bünyesinde uygulanmaya başlandı [92-94].

HBO tedavisi deniz seviyesindeki 1 atmosfer mutlak basınçtan ($1 \text{ atm} = 760 \text{ mmHg}$) daha yüksek bir basınç ortamında yaklaşık %100 oksijen gazının verilmesi ile uygulanan medikal bir tedavi yöntemidir. HBO tedavisi, genellikle 2-3 atm arasında basınç ile uygulanır. Ayrıca tedavinin uygulanma süresi ve uygulanma sıklığı hastanın klinik durumuna göre değişiklik gösterir. HBO tedavisi uygulamalarında genellikle tek kişilik veya çok kişilik olarak iki tip basınç odası kullanılır. Tek kişilik olan basınç odalarında HBO tedavisinde, hasta basınç odasında tek olduğundan içeriye verilen oksijen ile basınç uygulanır. Hasta bu ortamdaki oksijeni sürekli solur ya da basınç odası içindeki hava ile basınç uygulanır. Hastaya maske ile oksijen solutulur. Çok kişili basınç odalarında ise HBO tedavisi, birden fazla kişiye uygulanabilir. Bu uygulamada hastalara basınç odasındaki hava ile basınç uygulanır ve maske veya endotrakeal tüp yoluyla oksijen solutulur [95-98].

HBO tedavisinin temeli fizik prensiplerine dayanır. Uygulanan oksijen molekülü diğer gazlar gibi fizik kurallarına uygun olarak gaz yasalarına göre davranır. HBO tedavisinde hastaya uygulanan oksijen dışında yüksek basınç da önemli bir faktördür. Gazların ve basıncın birbirleri ile ilişkisini tanımlayan üç tane fizik yasası vardır. Bunlar Boyle-Mariotte Yasası, Dalton Yasası ve Henry Yasası'dır. Bu üç fizik yasası da HBO tedavisi için oldukça önemlidir.

- Boyle-Mariotte Yasası: Gazların sıkıştırılabildiğini ifade eden Boyle-Mariotte yasası, sıcaklığın sabit kaldığı kapalı bir ortamdaki gazın basıncı ile hacmi arasında ters bir orantı olduğunu söyler. Dolayısıyla kapalı bir ortamda basınç arttıkça hacmin azalacağını ifade eder. Yüksek basınçlı nitrojen gazına maruz kalınması sonucu vücutta birikmesinden dolayı damar içerisinde yüksek hacimli nitrojen gazının bulunması nedeniyle doku perfüzyonunun etkilenmesine neden olan dekompresyon hastalığı ve hava embolileri vakalarında HBO tedavisi uygulanır. Uygulanan HBO tedavisi sonucunda Boyle-Mariotte yasasından dolayı vücuttaki gaz kabarcıklarının hacminin azalması ve uygulanan oksijen ile yerdeğişimi sonucunda rekombinasyon sağlanıp hastalar tedavi edilir [96-99, 100].

$$P.V = \text{sabit}$$

P: Basınç

V: Hacim

- Dalton Yasası: Bir ideal gaz karışımında gazın içindeki her elementin kendine ait bir kısmı ya da parsiyel olarak ifade edilen basıncı vardır. Hava içerisinde başlıca nitrojen, karbon dioksit ve oksijen gazları kendilerine ait kısmı basınca sahiptir. HBO tedavisinde basınç odası içerisinde büyük miktarda nitrojen içeren hava ortamı kullanılarak tedavi uygulanırken dekompresyon olayına oldukça dikkat edilmelidir. Bu nedenle HBO tedavisinin olumlu sonuçlanabilmesi için Dalton yasası önemlidir [96, 101].

$$P_{\text{toplam}} = P_1 + P_2 + \dots + P_n$$

$P_1, \dots, P_n$: Her birleşenin kısmi basıncı

- Henry Yasası: Sabit sıcaklıkta, bir çözelti içerisinde çözünmüş olan gaz miktarı gazın kısmı basıncı ile doğru orantılıdır. Henry kanununa göre HBO tedavisi sonucunda kişinin plazmasında çözünmüş olan oksijen miktarı artar. Deniz seviyesinde %100 oksijen solunsa bile kandaki çözünmüş oksijen miktarı 1,5 ml/dl'ye kadar çıkabilirken, HBO tedavisinde bu durum yaklaşık 4 katına kadar çıkabilir. Böylece hemoglobin oksijene doymuş olsa bile plazmada çözünmüş olan oksijen miktarı artar. Bu sayede HBO tedavisi ile doku perfüzyonu için gerekli

oksijenlenme sağlandığından anemi, karbon monoksit ve siyanür toksikasyon durumlarında, akut ve kronik iskemi vakalarında kullanılabilir [96, 99, 101-103].

$$P=k_H.c$$

P: Sıvı üzerindeki gazın kısmi basıncı

k_H : Henry sabiti

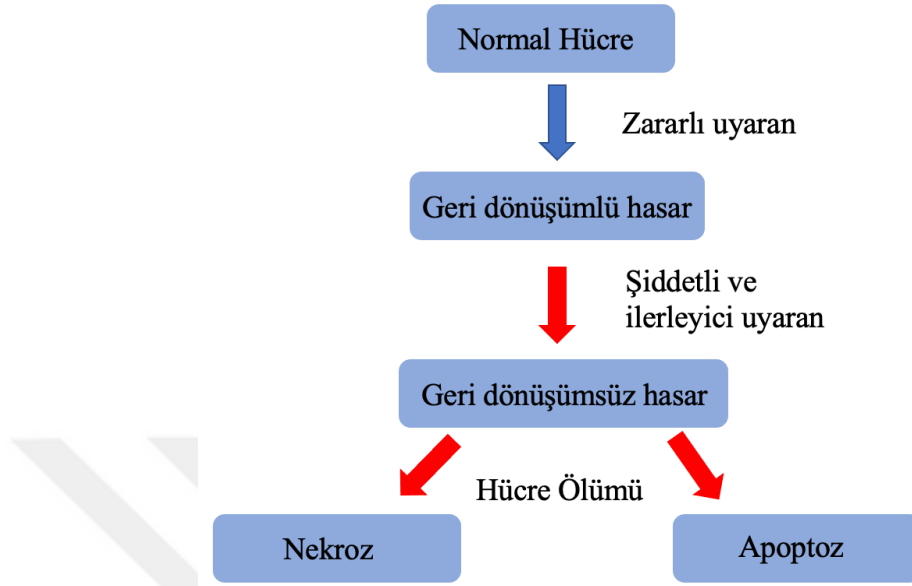
c: Sıvıda çözünen gazın derişimi

HBO tedavisi medikal alanda vazokonstriksiyon, anti-ödem, anti-toksik, anti-hipoksik, anti-bakteriyel ve anti-bakteriyel ajanların etkisini arttırmada ve yara iyileşmesi gibi bir çok durumda faydalı bir yöntem olarak kullanımı devam etmektedir [100, 104-110].

2.5. APOPTOZ VE NEKROZ MEKANİZMALARI

Yaşam süreleri boyunca canlı organizmalar hücre ölümü ve yaşamı arasında bir dengeye sahiptir. Hücre ölümü mekanizması hücrenin geri dönüşümü olmayan büyük hasarlar almasının bir sonucu olarak meydana gelir. Aynı zamanda hücrede hasar olmasa bile özel sinyallerin bir sonucu olarak da hücre ölümleri gerçekleşir. Hücre ölümleri çok hücreli organizmalarda hem erişkin dokularda hem de embriyonik gelişimde önemli fizyolojik bir işlem olan programlanmış hücre ölümüyle de gerçekleşir. Hücre ölümü mekanizmasında meydana gelen anormallikler otoimmün hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıklar ile ilişkilidir. Bu nedenle canlı organizmanın yaşamı boyunca hücre ölümü ve hücre yenilenmesi bir denge halinde devam etmelidir. Hücrede meydana gelen hasarın nedenleri, bir araba kazası sonucunda büyük bir fiziksel travmadan, metabolik bir hastalıkta fonksiyonunu yerine getiremeyen bir enzimden dolayı tek bir gendeki anormallik durumuna kadar uzanır. Genel olarak hücre hasarı nedenlerini sıralayacak olursak hipoksi ve iskemi; böcek ilaçları, karbon monoksit, sigara dumanı, etanol ve bazı ilaçlar gibi toksik maddeler; virüsler, mantarlar, bakteriler ve protozoonlar gibi her türlü hastalığa neden olan enfeksiyon ajanları; travma, yüksek sıcaklık, radyasyon ve atmosferik basınçtaki ani değişiklikler gibi fiziksel ajanlar; immünolojik reaksiyonlar; genetik anormallikler; yaşlanma ve beslenme dengesizlikleridir. Hücrede meydana gelen bu hasarlar, hasarın kaynağına ve şiddetine göre geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz hasarlar olarak iki aşamadan oluşur. Geri dönüşümlü hücre hasarı aşaması; hasara neden olan faktörler kaldırıldığında hasarlı hücre morfolojisinin ve anormal fonksiyonlarının normale dönebildiği aşamadır. Geri dönüşümsüz hücre hasarı aşamasında ise hasarın kaynağı,

şiddeti ve sürekliliğinden dolayı hücreler bu hasarı onaramaz ve ölürlür. Nekroz ve apoptoz ise hücre ölüm mekanizmalarının iki ana yoludur (Şekil 2.9) [111-115].



Şekil 2.9: Hücre ölümü süreci.

Nekroz Mekanizması:

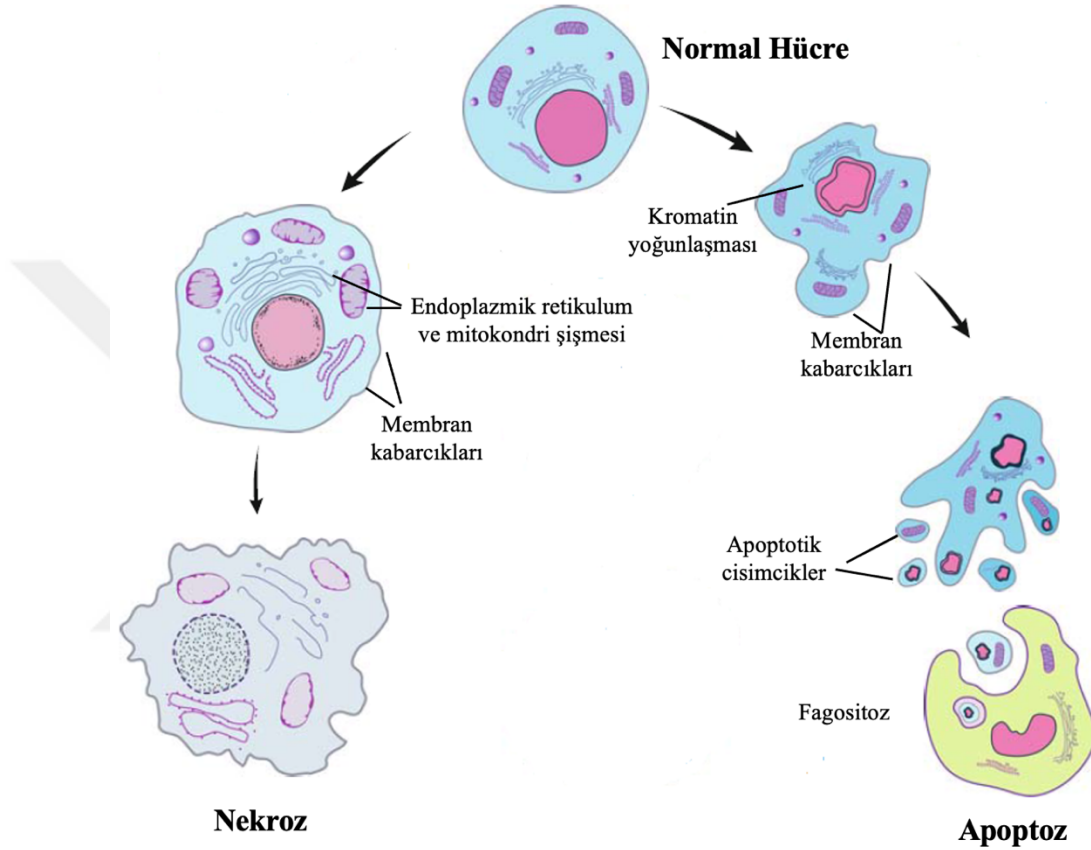
Nekroz veya nekrotik hücre ölümü olarak ifade edilen hücre ölümü durumunda morfolojik olarak hücre hacminde bir artış ile beraber hücrenin şişmesi, organellerin yapısının bozulması, plazma membranının parçalanması ve ardından hücrenin patlamasıyla beraber hücre içeriklerinin hücreler arası ortama salınması gerçekleşir. Hücreler arası ortama salınan hücre içeriklerinden dolayı enflamasyon meydana gelir ve bu durum nekrozun önemli ayırt edici özelliklerindendir. Nekroz morfolojik olarak hasar gören hücrenin çekirdek ve sitoplazmasındaki değişiklikler ile karakterize edilir. Çekirdekte meydana gelen değişimler DNA ve kromatin bozukluklarından kaynaklanır. Sitoplazmik değişikliklerde canlı hücre ile nekrotik hücre karşılaştırıldığında nekrotik hücre camsı ve homojen görünüme sahiptir. Geri dönüşümlü hasarlı hücrelere göre nekroza uğramış hücrelerde miyelin parçacıklar daha fazladır (Şekil 2.10). Nekrozun biyokimyasal mekanizması ise hücre hasarına neden olan uyaranlara göre farklılık gösterir. Plazma membranı ve lizozomal membran dahil olmak üzere hücre membranlarında parçalanma; reaktif oksijen türlerinden (ROS) dolayı hücre protein, lipid ve nükleik asitlerde geri dönüşümsüz hasarlar; oksijen talebinin azalması ya da mitokondriyal hasar sonucu Adenozin trifosfat (ATP) ile enerji üretiminde azalma gibi durumlar nedeniyle nekroz meydana gelir. Ayrıca hücre hasarına dışarıdan hücrenin maruz kaldığı ısı, ışık veya toksik maddeler gibi fiziksel ve kimyasal uyaranların neden olduğu geri dönüşümsüz bir hasar

hücresinin iyon dengesini bozabilir. DNA onarımında görevli olan Poli ADP-riboz polimeraz (PARP) enzimi Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) koenziminin azalmasına neden olur. Bundan dolayı ATP eksikliği membrandaki iyon pompası yetersizliğine neden olduğundan hücre içine sıvı girişi artar. Hücreye sıvı girişinin ardından hücre şişmesi sonucunda plazma membranı parçalanır ve oluşan ozmotik basınçla beraber hücre patlar. Hücrenin patlamasının ardından hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması enflamasyona neden olur. Enflamasyondan dolayı nekrotik hücreye nötrofiller ve makrofajın göç edip hücreyi fagosite etmesi nekrozun önemli bir özelliğidir [111, 112, 116, 117].

Apoptoz Mekanizması:

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü olarak ifade edilen hücre ölümünde hücre kendi DNA'sına, çekirdek ve sitoplazmik proteinlerine hasar veren enzimleri aktive eder. Apoptoz mekanizması, programlı, geri dönüşü olmayan ve enerji gerektiren bir süreçtir. Morfolojik olarak apoptoz sırasında hücrede meydana gelen değişimler kromatin yoğunlaşmasıyla beraber hücrenin çevre ile ilişkisinin azalması sonucu giderek küçülmesi ve hücre membranında kabarcıklar oluşmasıdır. Hücre membranında oluşan bu kabarcıklar zamanla neredeyse küresel ve kapsüllenmiş şekilde içerisinde sitoplazmik kalıntılar içeren apoptotik cisimcikleri oluşturur. Diğer taraftan hücre membranının dış tarafında membrana gömülü bir fosfolipid olan fosfatidilserinden dolayı makrofajlara sinyal verilir ve fagosite edilirler (Şekil 2.10). Hücrelerde apoptozu uyaranlar intrinsik yani hücre içi kaynaklı ve ekstrinsik yani hücre dışı kaynaklı olarak gruplandırılır. Hücre dışı kaynaklı apoptozda transmembran reseptörlerin birleşmesi aktive edilirken; hücre içi kaynaklı apoptozda ise Bcl-2 (B-hücreli lenfoma 2) protein ailesi tarafından mitokondriyal membran geçirgenliğinin kontrol edilmesi ile gerçekleşen bir süreçtir. Apoptozun kontrolünde önemli rol oynayan Bcl-2 protein ailesi üyeleri mitokondride görev yaparlar ve hem apoptozu inhibe ederek yani anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Nr13, A1/Bfl1, Bcl-w ve Mcl-1 gibi) hem de apoptozu indükleyerek yani pro-apoptotik (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bik, Bad ve Bid gibi) şekilde davranırlar. Bcl-2 proteini, anti-apoptotik yani apoptozu engelleyici bir özelliğe sahipken; Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bcl-2-associated X protein) olarak adlandırılan Bax proteini hücrenin apoptoza gidişini hızlandırır yani pro-apoptotik özelliktedir. Ayrıca Bax pro-apoptotik proteinler arasında en iyi çalışılardan olup p53 isimli tümör baskılayıcı proteinin kofaktörüdür. Bax proteinleri aktifleşmesi durumunda mitokondri sitokrom c'nin membranlar arası alana salınmasına neden olur. Sitokrom c salınımı kaspaz aktivasyonunu tetikler. Kaspazlar aktifleştğinde apoptozun

karakteristik morfolojik özellikleri olan çekirdek parçalanması, hücre iskeletinin bozulması, plazma membranının tomurcuklanması, fosfatidilserinin translokasyonuna ve hücrenin parçalanmasına neden olur. Apoptozdaki fonksiyon bozukluğu durumu anti-kanser ilaç direncine veya tümör gelişimine neden olabilir [112, 115, 118, 119].



Şekil 2.10: Nekroz ve apoptozun hücresel değişimleri.

Nekroz ve apoptoz mekanizmalarının farkı:

Nekroz ve apoptoz morfolojik olarak hücrede farklı durumlar meydana getirirler. Normal bir hücrenin geri dönüşümsüz hücre hasarına neden olan uyarının ortadan kaldırılmaması sonucunda meydana gelen nekroz ve programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz olaylarının Şekil 2.10’da hücrede meydana getirdikleri değişimler görülebilir. Hücre boyutlarında nekrozda genişlemiş ve şişmiş bir hücre gözlenirken; apoptozda daralmış yani büzülmüş bir hücre görülür. Çok hücreli canlı organizmalarda hücre ölümleri nekroz ve apoptozun sadece morfolojik değil aynı zamanda biyokimyasal ve fizyolojik açıdan da farklılıkları vardır (Tablo 2.2). Nekrozun karakteristik özelliklerinden biri olan enflamasyon durumu apoptozda görülmez. Hücre içeriği nekrozda hücreler arası ortama sızarken apoptozda

hücre içeriği bozulmadan apoptotik cisimcikler halinde hücreler arası ortama geçer. Nekroz canlı organizmada sadece patolojik bir duruma neden olurken apoptoz bazı durumlarda canlı organizmanın devamlılığı için istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması gibi faydalı bir fizyolojik süreç ya da DNA ve protein hasarı gibi durumlarda patolojik bir süreçte neden olabilir [112, 116, 117].

Tablo 2.2: Nekroz ve apoptoz mekanizmalarının karşılaştırılması.

Özellik	Nekroz	Apoptoz
Hücre boyutu	Genişleme (Şişme)	Daralma (Büzülme)
Çekirdek	Piknozis (Çekirdek büzülmesi) → Karyoreksis (Pinotik çekirdeğin parçalanması) → Karyolizis (Kromatin artışı)	Nükleozom boyutunda parçalara ayrılma
Plazma membranı	Bozulmuş	Bozulmamış fakat değişmiş yapı, özellikle lipidlerin oryantasyonu.
Hücresel içerik	Enzimatik sindirim; hücre dışına sızabilir	Bozulmamış; apoptotik cisimciklerde salınabilir
Enflamasyon	Sık görülür	Görülmez
Fizyolojik veya patolojik rolü	Her zaman patolojik (geri dönüşü olmayan hücre hasarının sonucu)	Genellikle istenmeyen hücreleri ortadan kaldırmanın fizyolojik yolu; bazı hücre hasarı, özellikle DNA ve protein hasarından sonra patolojik olabilir.

3. YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASALLAR VE MALZEMELER

- Melittin ($C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$) (Sigma; Ref No: M2272-5MG, Lot No: 128M4085V)
- RPMI-1640 (PAN Biotech; Ref No:P04-18047, Lot No:4200319)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma; Lot No: SLCC8330)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Cegrogen Biotech; Lot No: C1515)
- Trypsin-EDTA (Gibco; Lot No: 2063511)
- Paraformaldehit (Merck; Ref No: 1.04005.1000, Lot No: K45535705504)
- Hidrojen Peroksit Solüsyonu (%30, Riedel-deHaen, Lot No: 3083A)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Biomatik Corporation; Lot No: 0229B516)
- Penicillin-Streptomycine (Gibco; Lot No: 2058871)
- Tripan Mavisi (Amresco; Lot No: 2275C214)
- Tween-20 (Amresco)
- Çinko klorür ($ZnCl_2$) (Merck; Lot No: B0974516344)
- Lam (Ocean Insight, Ram-Sers-Au)
- Thoma Lamı (Western Germany; 0,100mm, 0,0025mm²)
- Lamel (Isolab; 24x24mm)
- Dairesel lamel (Carolina; Cover Glass-633029)
- T25 Hücre kültürü steril flask (Nest Biotechnology; Lot No: 052719BB01)
- T75 Hücre kültürü steril flask (Nest Biotechnology; Lot No: 071718B01)
- Hücre kültürü steril 6'lı kuyu (Nest Biotechnology; Lot No:100419BA02)
- Hücre kültürü steril 24'lü kuyu (Nest Biotechnology; Lot No:010220BA03)
- Steril kriyoviyal tüpler (Nest Biotechnology; Cat No: 607001)

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR

- Azot tankı (-196 °C) (Lab Systems Taylor-Wharton)
- Otoklav cihazı (Nüve Steam OT40L)
- İnkübatör (Nüve Cooled Incubator ES120)
- Laminer akım kabini (ESCO Class II Type A2, Sentinel Gold Microprocessor Control System)
- CO₂ inkübatörü (ESCO Cell Culture CO₂ Incubator)
- İnvert ışık mikroskobu (Leitz-Diavert)
- Soğutmalı satrifüj (Hermle Labortechnik, Z326K)
- Derin dondurucu (-80 °C) (Nüve Direct Freeze, DF 490)
- Spektrofotometre (UV-1800 Shimadzu UV-VIS Spectrophotometer)
- Hassas Terazî (Kern PFB)
- Deiyonize Su Cihazı (Nüve NS104)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Su banyosu (Nüve BM302)
- 10-100 uL Otomatik pipet (Dragon MicroPette Plus; Seri No: CQ03092)
- 20-200 uL Otomatik pipet (Eppendorf Research Plus; Seri No: J40442I)
- 100-1000 uL Otomatik pipet (Eppendorf Research Plus; Seri No: O48594G)
- Şarjlı pipetör (Axygen Scientific-MotoPet; Seri No: 603750090)
- Vorteks (Vortex Mixer Vm-20)
- Raman Spektroskopu (Ocean Optics QE Raman Pro)
- Lazer (Laser Glow 785 nm 500mW linewidth 0,1 nm)
- Objektif (Nikon 100x 1,3 NA)

3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN SOLÜSYONLAR

Hücre Kültürü Besiyeri

- % 89 RPMI-1640
- % 10 İnaktif FBS
- % 1 Penisilin-Streptomisin

Hücre Kültürü Dondurma Solüsyonu

- % 70 RPMI-1640
- % 20 İnaktif FBS
- % 10 DMSO (Dimetil Sülfoksit)

Morfolojik İncelemede Kullanılan Solüsyonlar

- % 4 Paraformaldehit
- % 0,05 Tween-20/PBS
- % 3 H₂O₂
- Hematoksilen boyası (Santa Cruz Biotechnology; Gill's Hematoxylin Solution)

3.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ LABORATUVARI

Hücre kültürü deneyleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Biyofizik Anabilim Dalı'ndaki Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi. Deneyde kullanılan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı (Non-small-cell lung cancer cell line-A549), İstanbul Medipol Üniversitesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mustafa GÜZEL'den temin edildi. Akciğer kanseri hücre hattı A549 hücreleri, soğuk zincir ile İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı'ndaki Hücre Kültürü Laboratuvarına getirilip çalışma başlayıncaya kadar -196 °C'de sıvı azot tankında (Lab Systems Taylor-Wharton) muhafaza edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Sıvı azot tankı.

Deneyde kullanılan tüm materyaller ve sarf malzemelerin sterilizasyonu için otoklav cihazı (Nüve Steam OT40L) (Şekil 3.2(a)) kullanılarak otoklavlandıktan sonra eldiven ile alınıp steril olarak 37 °C'deki soğutmalı inkübatöre (Nüve Cooled Incubator ES120) (Şekil 3.2(b)) konuldu. Tüm steril malzemeler laminar akım kabini içinde açıldı. Ayrıca deneyde kullanılan tüm solüsyonlar, steril filtrelerden geçirilerek hazırlanıp sıvı sterilizasyon programı kullanılarak otoklav cihazında sterilize edilerek solüsyona uygun olan saklama koşullarında muhafaza edildi.



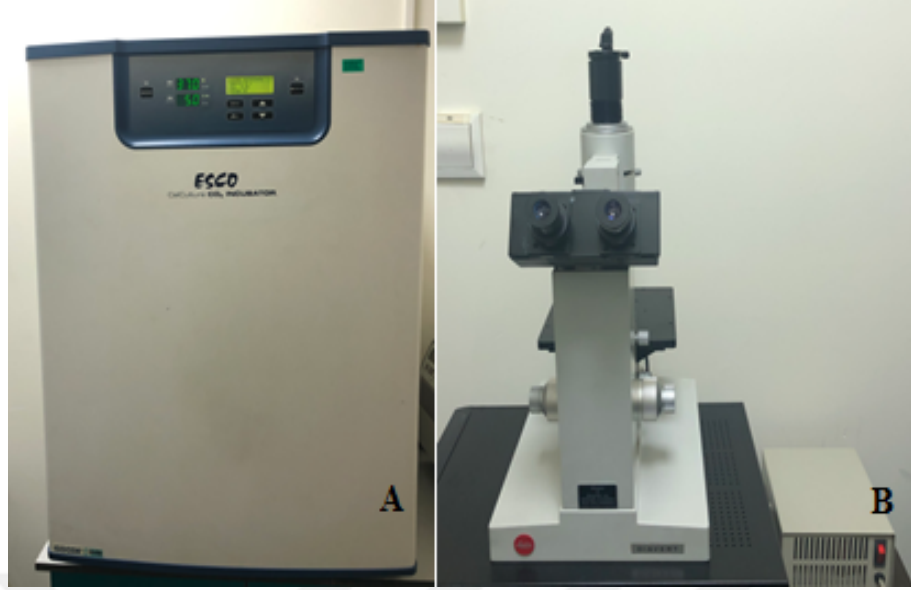
Şekil 3.2: (a) Otoklav cihazı ve (b) soğutmalı inkübatör.

Hücre kültürü laboratuvarında deneysel işlemlere başlamadan önce laminar kabin (ESCO Infinity Class II, ESCO Sentinel Gold Microprocessor Control System, USA) (Şekil 3.3) içerisindeki ultraviyole (UV) lambası ile çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan önce %70'lik etil alkol ile laminar kabin içerisindeki tüm çalışma yüzeyleri silinerek, deneyde kullanılacak tüm malzemeler sterilize edilerek kabin içerisine alındı.



Şekil 3.3: Laminer akım kabini.

Karbondioksit inkübatörü (ESCO Cell Culture CO₂ Incubator) (Şekil 3.4(a)) çalışmaya başlamadan önce steril hale gelmesi için dekontaminasyon işlemi gerçekleştirildi. Dekontaminasyon işleminin ardından karbondioksit inkübatörü, hücrelerin yaşayabileceği ortam koşulları olan 37 °C sıcaklık, %5 CO₂ ve %97 nemli hava ortamına ayarlandı. Hücre kültürünün pasajlanması ve takibinde mikroskoptaki incelemeler için invert mikroskop (Leitz-Diavert) (Şekil 3.4(b)) kullanılarak yapıldı.



Şekil 3.4: (a) Karbondioksit inkübatörü ve (b) invert mikroskop.

3.4.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması Protokolü

Hücre kültürü besiyerinde kullanılan steril fetal sıgır serumu (FBS) (Cegrogen Biotech, RefNo:A0100-3210, Lot No:C1515) -20 °C’de muhafaza edildiği derin dondurucudan çıkarılıp ısı ile inaktivasyon işlemi için 55 °C’ye getirilmiş olan su banyosunda (Nuve BM302) (Şekil 3.5) 30 dk bekletildikten sonra alkolle dış yüzeyi silinip laminar kabin içerisinde açılarak 15 mL’lık falkon tüplere ayrıldı. Deney işlemlerinde tekrar kullanmak üzere inaktive edilmiş olan 15 mL’lık FBS tüpleri tekrar -20 °C’ye derin dondurucuya kondu. Hücre kültürü besiyerinde kullanılan antibiyotik 5,000 U/mL Penisilin ve 5,000 µg/mL Streptomisin içeren steril Penisilin-Streptomisin (Gibco; RefNo:15070-063, Lot No:2058871) -20 °C derin dondurucuda muhafaza edildi. Hücre kültürü ortamı olarak içeriği 2 mM L-Glutamin, 1 mM Sodyum piruvat, 10 mM HEPES, 4,5 g/L Glukoz ve 1,5 g/L NaHCO₃’den oluşan steril Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) (PAN Biotech; Ref No:P04-18047, Lot No:4200319) hücre ortamı seçildi ve +4 °C’de muhafaza edildi. Akciğer kanseri hücre hattı A549 besiyeri olarak cRPMI-1640 (complet RPMI-1640) %89 RPMI-1640, %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanmış olan cRPMI-1640 hücre besiyeri +4 °C’de muhafaza edildi.



Şekil 3.5: Su banyosu cihazı.

3.4.2. Dondurulmuş Hücre Hattının Açılması Protokolü

Akciğer kanseri hücre hattı A549 hücreleri, deneysel süreçte kullanılmak üzere kriyoviyal tüp içerisinde sıvı azot tankından çıkarılıp 37 °C’deki su banyosunda hızlı bir şekilde çözöldü. Çözönen kriyoviyal tüp kurulanıp alkolle silinerek dikkatli ve hızlı bir şekilde laminar akım kabineine alındı.

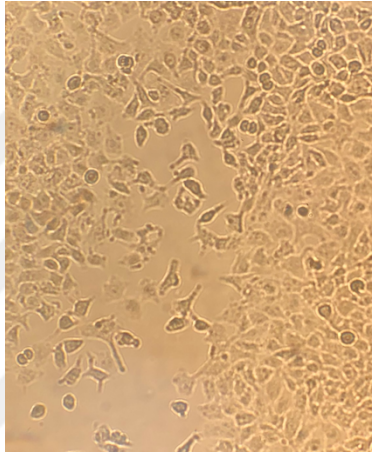
Laminar akım kabinde dondurulmuş hücrelerin çözölme protokolü:

1. Hücre besiyeri cRPMI-1640, santrifüj tüpleri ve ekimin yapılacağı T25’lik flasklar deneye başlanmadan önce 37 °C’ye gelmeleri için ayarlanmış olan inkübatöre alındı.
2. Besiyeri ve tüm malzemeler %70’lik alkol ile silinip laminar kabin içine kondu.
3. Steril 15 mL’lik santrifüj tüpüne 9 mL besiyeri konulduktan sonra kriyoviyal tüp içerisindeki çözönmüş olan hücre solösyonu eklendi.
4. Santrifüj tüpü 1200 rpm’de (revolutions per minute) 5 dakika boyunca santrifüj edilip hücreler çöktüröldü.
5. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan süpernatant kısmı atılıp hücre peleti üzerine 2 mL taze besiyeri konup steril pipet ile nazıkçe en az 20 kez pipetaj işlemi yapıldı.
6. Elde edilen 2mL’lik homojen hücre süspansiyonu T25’lik flaska aktarılıp üzerine 3 mL daha taze besiyeri eklendi.
7. Hücre ekimi yapılan T25’lik flask, laminar akım kabini yüzeyinde nazıkçe “∞” işareti şeklinde hareket ettirilip hücrelerin flaskın tüm yüzeyine yayılması sağlandı.

8. Hücrelerin bulunduğu T25'lik flask karbondioksit inkübatörüne kaldırıldı.
9. 24 saat sonra hücre kültürünün durumu invert mikroskopta incelendi.

3.4.3. Hücrelerin Pasajlanma Protokolü

Hücre kültürünün durumu düzenli olarak her gün invert mikroskop kullanılarak yoğunluğu, besiyerinin rengi ve bulanıklığı kontrol edildi. Herhangi bir kontaminasyon olmayan sağlıklı hücreler flask yüzeyinin yaklaşık %80'ini doldurduğunda pasajlanmak üzere laminar akım kabineye alındı. Şekil 3.6'da deney sürecimizde yaklaşık %80 yoğunluğa gelip pasajlanacak olan A549 hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü görülmektedir.



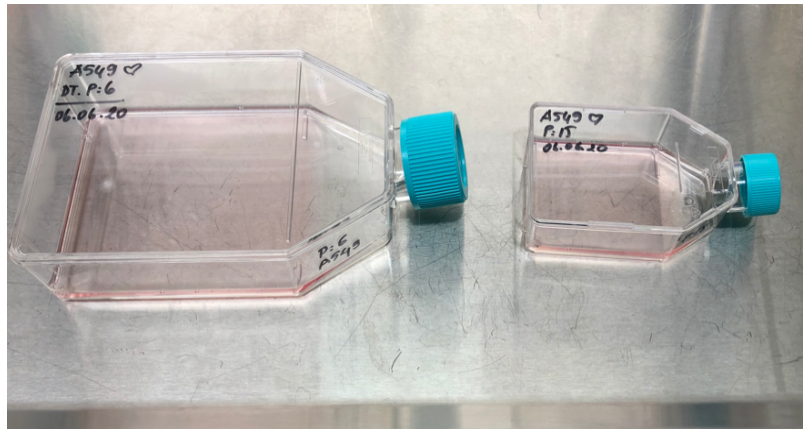
Şekil 3.6: Deney sürecimizde %80 konfluent A549 hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü.

Yeterli doluluk oranındaki hücre kültürünün pasajlanma protokolü:

1. Hücre besiyeri cRPMI-1640, FBS, Tripsin-EDTA (Gibco; Ref No:25200-056, Lot No:2063511) solüsyonları 37 °C'ye ayarlanmış olan inkübatöre kondu.
2. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) (Sigma; Lot No: SLCC8330) ve tüm solüsyonlar %70'lik alkol ile silinerek steril olarak laminar akım kabineye alındı.
3. Hücre kültürü flaskı içindeki kültürlemede kullanılmış olan besiyeri aspire edildi.
4. T25'lik flaskdaki hücreleri yıkamak için 3 mL PBS solüsyonu eklenip 5 dakika beklendikten sonra steril otomatik pipetör yardımıyla aspire edildi.
5. Flask yüzeyine yapışmış olan hücrelerin kaldırılması için % 0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonundan 3 mL eklendi ve karbondioksit inkübatöründe hücre kültürü flaskı 5 dakika inkübe edildi.

6. Hücrelerin yüzeyden ayrılmaları invert mikroskop ile kontrol edildikten sonra hücre kültürü flasksı laminar akım kabine alındı.
7. Tripsin aktivitesini sonlandırmak için flaska cRPMI-1640 besiyerinden 6 mL eklenip steril otomatik pipetör ile en az 20 kez pipetaj yapıp hücrelerin birbirinden tam olarak ayrılması sağlandı.
8. Hücre kültürü flasksında pipetaj işlemi sonrasında oluşan homojen solüsyon 15 mL'lık santrifüj tüpüne aktarılıp 37 °C'de 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj işlemi ardından süpernatant kısmı aspire edilip hücre peleti üzerine 4 mL taze besiyeri kondu ve tekrar steril otomatik pipetör yardımıyla en az 20 kez pipetaj yapıldı.
10. Hücre kültürünün ekim yapılacağı steril T25 flasksı, T75 flasksı, 6'lı ve 24'lü kuyuların yüzey alanlarına uygun sırasıyla 7×10^5 , 21×10^5 , 3×10^5 ve $0,5 \times 10^5$ ekim yoğunluğunda olacak şekilde hücre ekimleri yapıldı.
11. Hücre ekimi yapıldıktan sonra laminar akım kabini yüzeyinde nazikçe "∞" işareti şeklinde hareket ettirilip hücrelerin tüm yüzeye yayılması sağlandı.
12. Hücreler invert mikroskopta incelendikten sonra karbondioksit inkübatörüne kaldırıldı.

Şekil 3.7'de A549 akciğer kanser hücrelerinin steril T75 ve T25 flaskslarına ekilmiş hali görülmektedir.



Şekil 3.7: A549 akciğer kanser hücrelerinin steril T75 ve T25 flaskslarına ekilmiş halleri.

3.4.4. Hücrelerin Dondurulma Protokolü

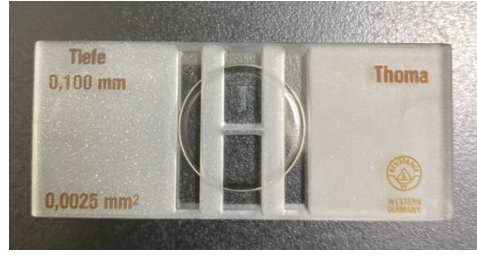
Akciğer kanseri hücre hattı A549 hücreleri, Tripsin-EDTA ile kültür kabından kaldırılmasının ardından tripsinin etkisini inhibe etmek için eklenen taze besiyeri ile oluşturulan süspansiyon 1200 rpm’de 5 dakika 37 °C’de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı steril otomatik pipetör yardımı ile aspire edildikten sonra santrifüj tüpünün dibinde bulunan hücre peleti üzerine taze besiyeri kondu ve en az 20 kez nazikçe pipetaj yapıldı. Homojen hücre süspansiyonunun invert mikroskopta canlılık oranı kontrol edildi. Krioprotektan olan dimetil sülfoksit (DMSO) (Biomatik Corporation; Lot No: 0229B516) içeren dondurma solüsyonu (%70 RPMI-1640, %20 FBS, %10 DMSO) hazırlandı. Soğuk koşullara dayanıklı kriyoviyal tüpler içerisine hücre süspansiyonu 1400 µL, FBS 400 µL ve DMSO 200 µL olarak eklendi. Kriyoviyal tüplerin ağzı laminar akım kabininde kapatılmasının ardından kademeli soğuma işlemine başlandı. Kriyoviyal tüpler +4 °C’de 30 dakika, -20 °C’de 1 saat, -80 °C’de ise 24 saat bekletildikten sonra hiç çözünme olmadan sıvı azot tankına (-196 °C) aktarıldı.

3.4.5. Hücre Sayısı ve Canlılığının Belirlenmesi

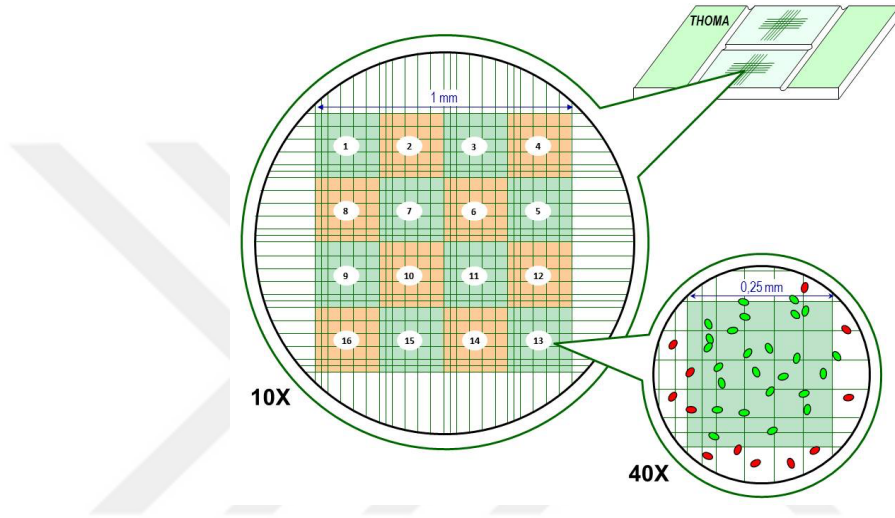
Karbondioksit inkübatöründeki A549 hücre kültürü steril koşullarda laminar akım kabinine alındıktan sonra Tripsin-EDTA ile hücreler yüzeyden kaldırılarak 15 mL’lık santrifüj tüpünde toplandı. 1200 rpm’de 5 dakika 37 °C’de santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edildi ve dipteki hücre peleti üzerine taze besiyeri konularak en az 20 kez steril otomatik pipetör ile nazikçe pipetaj yapıldı. Laminar akım kabininde steril 1,5 mL’lik ependorf tüpü içerisine aktarılan hücre süspansiyonu 1:1 oranında %0,4’lük tripan mavisi (Amresco; Lot No: 2275C214) ile karıştırılıp 5 dakika bekletildi. Sayım işlemine geçmeden önce Thoma Lamı (Western Germany; 0,100mm, 0,0025mm²) (Şekil 3.8) ve lameller (Isolab; 24x24mm) %70’lik alkol ile steril hale getirildi. Steril otomatik pipet yardımıyla homojen haldeki hücre ve tripan mavisi karışımından alınan örnek dikkatlice lam-lamel arasına yayılması sağlandı. Thoma lamı ışık mikroskobunda bakıldığında (Şekil 3.9) her biri 5x5 kareden oluşan 16 adet büyük kareden oluşmaktadır. Thoma lamında her büyük karede ise 25 adet küçük kareden oluştuğundan dolayı toplam (16x25) 400 küçük kare vardır. Thoma lamında hücre sayımında 0,1 mm³ = 10⁻⁴ mL miktarı lam ve lamel arasındaki hücre süspansiyonu hacmi olarak kabul edilir. Thoma lamında mikroskop vasıtasıyla 16 büyük kare içerisindeki hücreler (N) sayılarak toplam hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı} / \text{mL} = N \times 10^4 \times \text{Seyreltme faktörü}$$

$$\text{Toplam hücre sayısı} = (\text{Hücre sayısı} / \text{mL}) \times \text{Toplam hacim}$$



Şekil 3.8: Thoma lamı.



Şekil 3.9: Hücre sayımı şematik anlatımı.

Hücre canlılık yüzdesi hesaplanırken tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanıldı. Canlı hücrelerin membran geçirgenlikleri ve bütünlükleri bozulmadığından tripan mavisi hücre içine geçemez ve dolayısıyla hücrenin boyanması gerçekleşmez. Fakat ölü hücrelerde tripan mavisi hücre içine geçebildiğinden hücrelerin mavi renkte boyanmasına neden olur. Bu özelliğe dayanarak tripan mavisi ile süspansiyon haline getirdiğimiz hücrelerin thoma lamında mikroskop ile incelenmesinde mavi ile boyalı hücreler ölü hücreler, boyanmamış hücreleri ise canlı hücreler olarak kayıt altına alındı. Buradan elde ettiğimiz verilere bağlı olarak hücre canlılık yüzdesi aşağıdaki formülü kullanarak hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = (\text{Canlı hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$$

3.5. HÜCRELERE YAPILAN UYGULAMALAR

Tez çalışmasında akciğer kanseri hücre hattı A549 hücrelerine çinko eser elementi (Zn), bal arısı zehrinden saflaştırılmış olan melittin peptiti ve hiperbarik oksijen (HBO) uygulaması farklı kombinasyonlar halinde yapıldı. Deney süreci boyunca A549 akciğer kanseri hücrelerinin 4. ile 18. pasaj aralığı kullanıldı.

3.5.1. Çinko Uygulaması

Deney protokolüne göre akciğer kanseri hücre hattı A549 hücrelerine, çinko elementi çinko klorür ($ZnCl_2$) (Merck; Lot No: B0974516344) formunda cRPMI-1640 besiyeri içinde çözülerek elde edilen Zn-cRPMI-1640 besiyeri solüsyonu uygulandı.

3.5.2. Melittin Uygulaması

Akciğer kanseri hücre hattı A549 hücrelerine tez çalışmamızda bal arısı zehrinden elde edilmiş olan Melittin peptidinin (Sigma; Ref No: M2272-5MG, Lot No: 128M4085V) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) cihazında en az %85 oranında saflaştırılmış formu uygulandı. Melittinin moleküler ağırlığı 2846,46 gram/mol (Da; dalton) ve ampirik formülü $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ şeklindedir. Melittin uygulaması cRPMI-1640 besiyeri içinde çözülerek elde edilen Melittin-cRPMI-1640 besiyeri solüsyonu olarak uygulandı.

3.5.3. Hiperbarik Oksijen (HBO) Uygulaması

Tez çalışmamızda akciğer kanseri hücre hattı A549 hücrelerine melittin ve çinko uygulaması dışında hiperbarik oksijen uygulaması da yapıldı. Hiperbarik oksijen kabinin iç yüzeyi %70'lık alkol ile silinerek steril hale getirilip kabin ortamı sıcaklığı 37°C ve ortam basıncı yaklaşık 2 atm atmosfer basıncı olacak şekilde ayarlandı (Şekil 3.10). Hiperbarik oksijen kabininde 50 litrelik %99,5'lik solunabilir medikal oksijen (O_2) tüpleri kullanıldı. Kabin içerisinde yaklaşık 15 dakikada 2 atm basınçtaki ortam oluştuktan sonra 60 dakika boyunca A549 hücreleri %99,5'lik oksijene maruz bırakıldı.



Şekil 3.10: Hiperbarik oksijen uygulama kabini.

3.6. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Melittin, çinko ve hiperbarik oksijen uygulamalarının akciğer kanser hücre hattı A549 hücreleri üzerinde etkilerini incelemek için tez çalışmasının deney protokolü iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölüm doz ve uygulanma süresinin belirlenmesi, ikinci bölüm ise belirlenen doz ve sürelerin gruplara uygulanmasıdır.

- **Birinci Bölüm:** A549 akciğer kanser hücrelerine uygulanacak olan çinko (Zn) elementi ve melittin peptiti için uygulanacak en etkin dozun ve uygulama süresinin bulunması amaçlandı. Bu doğrultuda hücreler steril 6'lı kuyulara her kuyuda eşit ve 3×10^5 hücre olacak şekilde ekilip taze besiyeri ile 24 saatlik inkübasyon sürecinin ardından aşağıda belirtilen dozlar uygulandı.
 - Çinko Grubu: A549 akciğer kanser hücrelerine 0 – 5 – 10 – 20 – 50 – 100 – 200 – 300 μM ZnCl_2 uygulandı.
 - Melittin Grubu: A549 akciğer kanser hücrelerine 0 – 0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 $\mu\text{g/mL}$ melittin (Sigma M2272; $\geq 85\%$ HPLC) uygulandı.

Farklı dozlar uygulanan çinko ve melittin grupları 24, 48 ve 72 saat üç ayrı set olarak inkübe edildi. Etkin uygulama süresini belirlerken her inkübasyon süreci üç kez tekrarlandı. Inkübasyon süreleri sonunda hücrelere tripan mavisi kullanılarak canlılık oranları hesaplandı. Elde edilen veriler doğrultusunda melittin ve çinkonun uygulanan doz miktarları için yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu (Half maximal inhibitory concentration – IC50) değerleri her üç inkübasyon süresi (24, 48 ve 72 saat) için ayrı yarı hesaplandı.

- **İkinci Bölüm:** A549 akciğer kanser hücrelerine deney protokolünün birinci bölümünden elde edilen veriler doğrultusunda 48 saat inkübasyon süresi ile melittin uygulaması için 4,572 µg/mL (IC50) ve çinko uygulaması için 61 µM (IC50) dozları uygulandı. A549 akciğer kanser hücreleri steril T75 flasklarda çoğaltıldıktan sonra hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında tripsin uygulanarak kaldırılıp hücre sayımları yapıldı ve steril 6'lı ve 24'lü kuyulara sırasıyla her kuyuda 3×10^5 ve $0,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekilip taze besiyeri ile 24 saat inkübe edildi. Hücreler 24 saatlik inkübasyonun ardından deney grubuna uygun içerikte hazırlanmış olan besiyeri uygulanıp standart hücre kültürü ortamında (37 °C ve %5 CO₂) 48 saat inkübasyona bırakıldı.

Deney Grupları:

1. **Grup (Kontrol grubu – K):** Hücre ekiminin 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyeri taze cRPMI-1640 ile değiştirildi ve 48 saatlik inkübasyon sürecinde hiçbir uygulama yapılmadı.
2. **Grup (Çinko grubu – Zn):** Hücre ekiminin 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyeri taze 61 µM ZnCl₂ içeren cRPMI-1640 ile değiştirildi ve 48 saat standart hücre kültürü ortamında (37 °C ve %5 CO₂) inkübe edildi.
3. **Grup (Melittin grubu – M):** Ekilen hücrelerin 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyeri taze 4,572 µg/mL melittin içeren cRPMI-1640 ile değiştirildi ve 48 saat standart hücre kültürü ortamında (37 °C ve %5 CO₂) inkübe edildi.
4. **Grup (Çinko + Melittin grubu – ZnM):** Hücrelerin 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyeri 61 µM ZnCl₂ ve 4,572 µg/mL melittin içeren taze cRPMI-1640 ile değiştirilip standart hücre kültürü ortamında (37 °C ve %5 CO₂) 48 saat inkübe edildi.
5. **Grup (Hiperbarik oksijen grubu – HBO):** Hücreler ekildikten ve 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyeri taze cRPMI-1640 ile değiştirildi ve 48 saatlik inkübasyon sürecinin ardından 60 dakika boyunca 37°C sıcaklık ve 2 atm basınç altında %99,5'lik O₂ ile hiperbarik oksijen uygulaması yapıldı.
6. **Grup (Çinko + Hiperbarik oksijen grubu – ZnHBO):** Hücre ekiminin 24 saatlik inkübasyonundan sonra hücrelerin besiyeri 61 µM ZnCl₂ içeren taze cRPMI-1640 besiyeri ile değiştirildi ve 48 saat standart hücre kültürü ortamında (37 °C ve %5 CO₂) inkübe edildi. 48 saatlik inkübasyon işleminden hemen sonra hücrelere 60 dakika boyunca 37°C sıcaklık ve 2 atm basınç altında %99,5'lik O₂ ile hiperbarik oksijen uygulaması yapıldı.

- 7. Grup (Melittin + Hiperbarik oksijen grubu – MHBO):** Hücreler 24 saatlik inkübasyonundan sonra besiyerleri 4,572 µg/mL melittin içeren taze cRPMI-1640 besiyeri ile değiştirildi ve 48 saat standart hücre kültürü ortamında (37 °C ve %5 CO₂) inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra hücelere 60 dakika boyunca %99,5'lik O₂, 37°C sıcaklık ve 2 atm basınç altında hiperbarik oksijen uygulaması yapıldı.
- 8. Grup (Çinko + Melittin + Hiperbarik oksijen grubu – ZnMHBO):** Hücrelerin 24 saatlik inkübasyonundan sonra besiyerleri 61 µM ZnCl₂ ve 4,572 µg/mL melittin içeren taze cRPMI-1640 besiyeri ile değiştirildi ve 48 saat standart hücre kültürü ortamında (37 °C ve %5 CO₂) inkübe edildi. 48 saatlik inkübasyondan sonra hücelere 60 dakika boyunca %99,5'lik O₂ ile 37°C sıcaklık ve 2 atm basınç altında hiperbarik oksijen uygulaması yapıldı.

3.7. DOZ BELİRLEME ANALİZİ (YARI MAKSİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU IC50)

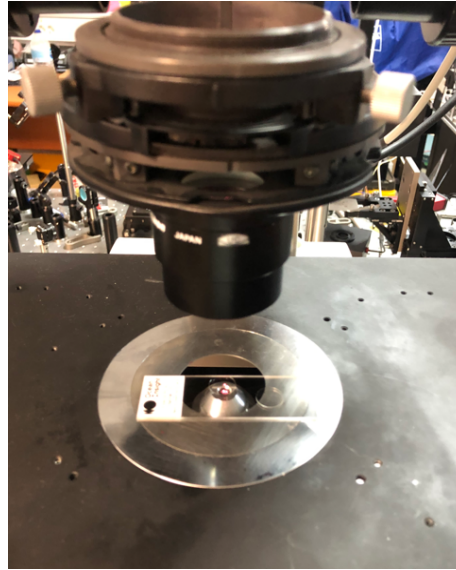
A549 akciğer kanser hücrelerine çinko ve melittin uygulaması yaptığımızda kanser hücrelerini %50 oranında inhibe eden madde konsantrasyonunu tespit etmek için doz belirleme analizi yapıldı. Bunun için yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu olarak ifade edilen IC50 kavramından faydalandık. Kısacası IC50 değeri bize %50 inhibisyon için gerekli madde konsantrasyonunu tanımlar. Bu yüzden bir maddenin düşük konsantrasyonda IC50 değerinin olması yüksek bir inhibisyon değerine sahip olduğunu ifade eder.

Akciğer kanser hücreleri T75 steril hücre kültürü flasklarında çoğaltılıp %80 doluluk oranına geldiğinde tripsin uygulanarak hücreler kültür kabının zemininden kaldırılıp sayımları yapıldı. Her bir kuyuya 3x10⁵ hücre olacak şekilde steril 6'lı kuyulara hücrelerin ekimi yapıp üzerlerine taze besi yeri eklendi. Hücreler 24 saatlik inkübasyonun ardından hücre besiyeri nazikçe aspire edilip taze olarak hücre besiyerinde çözünerek hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardaki çinko (0 – 5 – 10 – 20 – 50 – 100 – 200 – 300 µM ZnCl₂) ve melittin peptiti (0 – 0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 µg/mL) solüsyonları hücelere uygulandı. Zamana bağlı IC50 değerinin analizi için inkübasyon süreleri 24, 48 ve 72 saat olacak şekilde aynı deney setleri üçer kez tekrarlandı. Hücreler, 24 saatlik inkübasyonun ardından farklı dozlarda uygulanan çinko ve melittin hücre besiyerleri aspire edilip tripsin uygulanarak hücreler kaldırıldı. Ardından Thoma lamı yardımı ile tripan mavisi 1:1 kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirilip canlılık oranları hesaplandı. Aynı işlemler 48 ve 72 saatlik inkübasyonlardan sonra da yapıldı. Elde edilen hücre canlılık oranları, çinko ve melittin maddelerinin farklı doz ve farklı

inkübasyon sürelerine bağlı olarak GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) yazılımı kullanılarak IC50 değerleri hesaplandı. Çinko ve melittin maddelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için üçer adet IC50 değeri hesaplandı. Bunların içinden hem çinko hem de melittin için 48 saatlik inkübasyonun ardından elde edilen IC50 değerleri deneysel sürecin ikinci bölümünde kullanıldı.

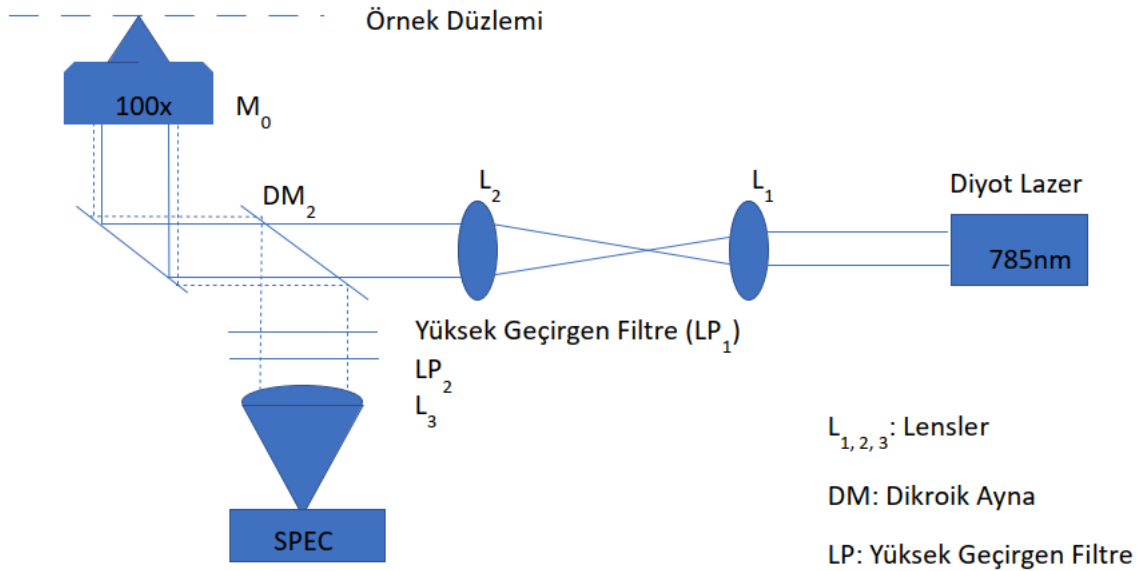
3.8. RAMAN SPEKTROSKOPİSİ ANALİZİ

Raman spektroskopisi incelemeleri için İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı'nda A549 akciğer kanser hücreleri T75 steril hücre flasksında çoğaltılıp yeterli yoğunluğa gelince tripsin uygulanarak hücreler kültür kabı zemininden kaldırılıp hücre sayımları yapıldı. Sterilize edilmiş ve borosilikattan yapılmış 12 mm'lik dairesel lameller (Carolina; Cover Glass-633029) steril 24'lü kuyulara yerleştirildi ve her kuyuya $0,5 \times 10^5$ hücre ekildi. Hücre ekiminin ardından her kuyuya deney protokolündeki gruplarına göre melittin, çinko ve HBO uygulamaları immünohistokimyasal analizlerde yapıldığı gibi hazırlanıp uygulandı. Deney protokolünün uygulanmasının ardından steril 24'lü kuyulardaki hücrelerin üzerinden besiyeri aspire edildi. Tween-20/PBS ile hücreler 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı ve %4'lük paraformaldehit ile 10 dakika fiks edildi. Ardından tekrar Tween-20/PBS ile hücreler 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı. Raman incelemeleri yapılana kadar hücrelerin üzerine 1 mL PBS eklenip +4 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.11: Raman spektroskopisinde lama yerleştirilmiş hücrelerin ölçüm anı.

Hazırlanmış olan fikse haldeki A549 akciğer kanser hücreleri, Boğaziçi Üniversitesi Fizik Bölümü'nde bulunan açık Raman spektroskopi sisteminde incelendi. Raman spektroskopi analizine başlanmadan önce her kuyudaki PBS sıvısı nazıkçe aspire edildi. Her kuyuda, üzerine hücre ekilmiş olan dairesel lameller çıkartılıp Raman analizinde kullanılan özel lamalar (Ocean Insight, Ram-Sers-Au) üzerine konup Şekil 3.11'de görüldüğü gibi ölçüme hazır hale getirildi. Bu sistemde 785 nm DPSS lazer (diyet pompalı katıhal lazer) kullanıldı. Bunun sebebi, Raman spektrometresinde dalga boyu düştükçe şiddetinin artması ve spektrumların daha belirli hale gelmesine rağmen, düşen dalga boyu foton enerjisini artırdığından, örnek, ilgili dalga boyunda soğurma yapıyorsa, foto-hasar olasılığına sebebiyet vermesidir. 785 nm dalga boyu, biyolojik moleküllerin soğurma penceresinin dışında kaldığından dolayı bu kaynak ile çalışıldı. Bu kaynakta lazer çıkış gücü 300 mW'dır. Çalışmamızda hücrelerin boyutlarında uyarma yapılabilmesi için 100X objektif seçildi. Kırılma indisi eşlemesi için bu objektif yağ daldırması prensibi ile çalışarak sayısal açıklığını, yani ışık toplama kapasitesini de artırır ($NA=1.3$). Cihazın sinyal çözme gücü $2-8 \text{ cm}^{-1}$ aralığındadır. Spektrometrede, 600 çizgi/mm kırınım ağı bulunur. Böylece efektif dalga boyu aralığı yaklaşık 100 nm olarak belirlendi.



Şekil 3.12: Raman spektroskopisi ölçüm düzeneği.

Şekil 3.12'de verilen ölçüm düzeneğinde lazerden çıkan demet aynalar yardımı ile mikroskoba paralel hale getirildikten sonra, demetin mikroskop arka açıklığını doldurabilmesi için çapı kepler teleskopu ile 1:3 oranında artırıldı. Çıkıştaki kolime demet, bir periskop yardımı

ile yükseltilerek, ışığı dalga boylarına göre seçen bir dikroik aynadan geçtikten sonra mikroskop objektife ulaşarak örnek düzlemine odaklanmıştır. Odaktan geri saçılan demetler aynı objektif ile toplanarak aynı yolu takip ederek dikroik aynaya kadar ilerlerler. Dikroik aynada Raman demetleri, yani frekansı kaymış elastik olmayan saçılım yapan demetler, yansıtılarak bir lens ile spektrometre slitine bağlanan fiberin ilk ucuna odaklandı. Spektrumların izlenmesi, analizi gibi süreçler kendi oluşturduğumuz, MATLAB üzerinde yazılan kodlarla gerçekleşti.

Tıbbi araştırmalarda doku veya vücut sıvılarının incelenmesi için kullanılan yöntemler genellikle biyo-ajanlar vasıtasıyla olmaktadır. Bir işaretçi kullanmadan ve en hızlı şekilde bu örnekleri incelemenin bir yolu, ilgilenilen örneklerin moleküler yapısını inceleyen Raman spektroskopisidir [120].

Raman spektroskopisinde, ahenkli bir kaynak (lazer) vasıtasıyla ışık ve molekül etkileşimleri sonucu saçılan fotonlar:

- Kaynak ile aynı frekansta (ν_0) saçılan Rayleigh fotonları,
- Kaynak frekansından molekülün titreşim frekansı kadar kayan ($\nu_0 - \nu_m$) veya ($\nu_0 + \nu_m$) Raman fotonları olabilir.

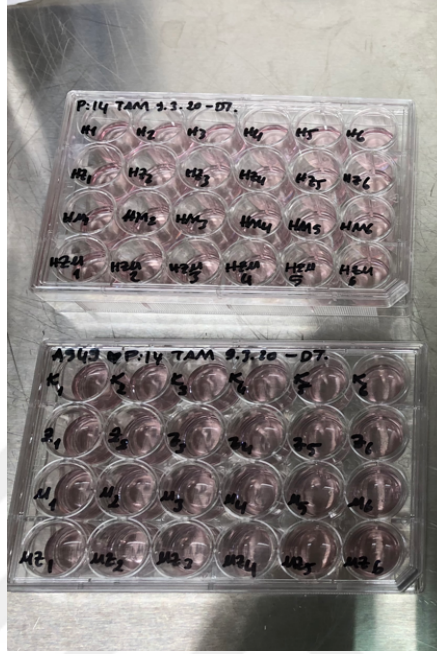
Bu kaymalar, Rayleigh fotonları filtrelenerek gözlendiğinde spektrumun frekans eksenini molekülün titreşim frekansı hakkında doğrudan bilgi verir ve toplanan verilerdeki frekans bilgisi moleküler yapı hakkında yorum yapılmasını sağlar. Spektrumların şiddeti, frekansın dördüncü kuvveti ile orantılıdır ve bu bileşen de piki gözlenen kimyasalın örnek içindeki miktarı hakkında fikir verir.

Hücre ve doku odaklı çalışmalarda boyama yapmadan, dokuya foto-hasar vermeden, herhangi bir örnekleme sürecinden geçirilmeden ve küçük bir bölgeden alınan sinyalle karakterize edebilmesi avantajlarından dolayı Raman spektroskopisi yöntemi moleküler düzeyde incelemeler için oldukça önemli bir yöntemdir [121-123].

3.9. İMMÜNOSİTOKİMYASAL ANALİZ

A549 akciğer kanser hücrelerinde immünositokimyasal incelemeler için işaretlenmiş antikolar kullanılarak hücre antijenlerini bulundukları yerde göstermek amacı ile Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi kullanılarak immünositokimyasal boyama yapıldı. Apoptoz durumunun aydınlatılmasını sağlayacak Bcl-2 antikoru (Santa Cruz Biotechnology; Lot No: E1904, 1:50 dilüsyon) ve Bax antikoru (Santa Cruz Biotechnology; Lot No: E2604, 1:50 dilüsyon) kullanılarak kit (Invitrogen; Histostain-Plus Kit) içinde tavsiye edilen işlem sırası

antikorlara göre modifiye edilerek %4'lük paraformaldehit (Merck; Ref No: 1.04005.1000, Lot No: K45535705 504) ile tespit edilen hücrelere immünohistokimyasal boyama uygulandı.



Şekil 3.13: İmmünohistokimyasal incelemelerde kullanılacak hücrelerin ekimi.

İmmünohistokimyasal incelemelerde ilk önce T75 steril hücre flaskında çoğaltılıp yeterli yoğunluğa gelen A549 akciğer kanser hücreleri tripsin uygulanarak kültür kabı zemininden kaldırılıp hücre sayımları gerçekleştirildi. Daha önce sterilize edilmiş ve borosilikattan yapılmış 12 mm'lik dairesel lameller (Carolina; Cover Glass-633029) steril 24'lü kuyulara yerleştirildi (Şekil 3.13). Kuyulara taze besiyerleri cRPMI-1640 eklenip üzerine her kuyuya $0,5 \times 10^5$ hücre ekildi. Ekim işleminden sonra hücreler karbondioksit inkübatöründe 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücreler 24 saatlik inkübasyonun ardından laminar akım kabinine alınıp kuyulardaki besiyerleri aspire edildi. Her kuyuya deney protokolündeki gruplarına göre hazırlanmış olan taze besiyeri eklendi ve hücreler karbondioksit inkübatöründe 48 saat inkübasyona bırakıldı. HBO uygulanmayacak olan grupların hücrelerine inkübasyon süresinin ardından tespit işlemi uygulandı. HBO uygulanacak olan grupların hücrelerine ise inkübasyon işleminin ardından 60 dakika hiperbarik oksijen uygulamasına maruz bırakıldıktan sonra hücrelere tespit işlemi yapıldı. Steril 24'lü kuyularda bulunan hücrelerin üzerine deneysel protokol uygulandıktan sonra kuyulardaki besiyeri aspire edildi. Hücreler Tween-20/PBS ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı ve %4'lük paraformaldehit ile 10 dakika fikse edildi. Ardından hücreler tekrar Tween-

20/PBS ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı. Morfolojik incelemeler yapılana kadar hücrelerin üzerine 1 mL PBS eklenip +4 °C’de muhafaza edildi.

Uygulama esnasında taze olarak hazırlanan solüsyonlar:

- **%3 H₂O₂** : 1 mL H₂O₂ taze PBS ile 10 mL’ye tamamlandı.
- **%4’lük Paraformaldehit**: 4 gram paraformaldehit PBS ile 100 mL’ye tamamlandı.
- **%0,05’lik Tween-20/PBS**: 25 µL Tween-20 PBS ile 50 mL’ye tamamlandı.

İmmünohistokimyasal işlem protokolü

1. Hücreler 3 kez 5’er dakika PBS ile yıkandı.
2. %3 H₂O₂ eklendi ve 10 dakika uygulandı.
3. Hücreler 3 defa 5’er dakika PBS ile yıkandı.
4. İstenmeyen antijenlerin baskılanması için maskeleme solüsyonu 10 dakika uygulandı.
5. Bcl-2 (1:50) antikoru ve Bax (1:50) antikoru ile bir gece +4 °C’de nemli ortamda muamele edildi.
6. Hücreler 3 defa 5’er dakika PBS ile yıkandı.
7. Biotin ile işaretli ikinci antikor 10 dakika boyunca uygulandı.
8. Hücreler 3 defa 5’er dakika PBS ile yıkandı.
9. Streptavidin-Peroksidaz kompleksinde 8 dakika boyunca muamele edildi.
10. Hücreler 3 defa 5’er dakika PBS ile yıkandı.
11. Substrat-kromojen (AEC: 3-aminoetil 9-karbazol) solüsyonu ile 20 dakika renk reaksiyonu gözlenene kadar inkübe edildi.
12. Distile su ile yıkandı.
13. Hücrelere 30 saniye boyunca Hematoksilen boyası (Santa Cruz Biotechnology; Gill’s Hematoxylin Solution, Ref No: 517-28-2, Lot No: D2314) uygulandı.
14. Distile su ile yıkandı.
15. İmmünohistokimyasal yöntem uygulandıktan sonra kuyulardaki lameller dikkatli bir şekilde ince uçlu pens ile kaldırılıp, lamalar üzerine damlatılan gliserin-jelatin ile kapatıldı ve 1 saat 37 °C’de inkübe edildi.

İmmün boyama özgülüğünün kontrolü:

İmmün boyamanın kontrolü için negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol olarak immünohistokimyasal işlem sırasında primer antikor yerine distile su damlatıldı.

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Ham Raman spektrumları, MATLAB platformunda oluşturulan otomatik önışlem kodu ile analiz için hazır hale getirildi. Bu kod, kalibrasyon, arkaplan düzeltme, taban çizgisi düzeltme ve normalizasyon yapmaktadır. Kalibrasyon aşamasında, spektrometreden dalga boyu biriminde üretilen spektrumlar, dalga boyu ve Raman kayması arasındaki ilişki aşağıdaki denklem ve referans spektrumların Raman kaymaları kullanılarak kalibre edildi.

$$\bar{\nu}(cm^{-1}) = \left(\frac{1}{\lambda_{exc}} - \frac{1}{\lambda_{Raman}} \right) 10^7$$

Her ölçümden sonra alınan su spektrumları, hedef ölçümlerden çıkarılarak bu bileşenden gelen katkıları analize dahil edilmedi. Öte yandan, bu düzeltme sonrasında hala spektrumlarda floresan katkıları birikmiş olarak kalabilir ve spektrumdaki Raman piklerinin tabanlarında üçüncü dereceden bir çizgiye fit olacak şekilde bir yapı sergiler. Bu yapı, matematiksel olarak polinom fiti yardımı ile yaklaşık olarak bulunur ve toplam spektrumdan çıkarılarak floresan katkıları da düzeltilmiş oldu.

Farklı şartlarda oluşturulmuş bileşenlerin karşılaştırılması için bazen ölçümlerin normalize edilmesi gerekir. L2 normalizasyon bu amaç için oldukça uygun olup, birim hacim başına kimyasal cevabın alınmasını sağlar.

Yukarıda bahsedilen işlemler otomatik olarak yapıldıktan sonra verinin incelenmesine geçildi. Bu noktada elimizdeki verinin büyüklüğü önemli rol oynar. Çalışmamızdaki 8 adet deney grubu için her hücreden 10'ar kez spektrum alındı ve her deney grubu için 3 kez tekrarlanıp ortalaması alındı. Deney gruplarında 725-1800 cm^{-1} bölgesinde raman spektrumunda 828 cm^{-1} , 920 cm^{-1} , 980 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} , 1697 cm^{-1} ve 1788 cm^{-1} değerlerinde raman şiddetine katkı sağlayan pikler görüldü. Bu piklerdeki normalize raman şiddeti değerlerinin hepsi işlem kolaylığı açısından 10^{-3} kat olacak şekilde kullanıldı. Raman şiddetine katkı sağlayan piklerdeki normalize raman şiddeti değerlerinden elde edilen veri setlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması için SPSS 21 programı kullanıldı. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Sapma (Mean $\pm$ Standard Deviation; $M \pm S.D.$) olarak verildi. Veri

setlerine uygulanan Shapiro-Wilk Normalite Testi sonucunda 8 grup olan deney gruplarının istatistiksel incelemesinde parametrik olmayan Kruskal-Wallis Testi kullanılırken, deney gruplarının ikili olarak karşılaştırılmalarında ise parametrik olmayan Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Verilerde yaptığımız karşılaştırmalarda $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

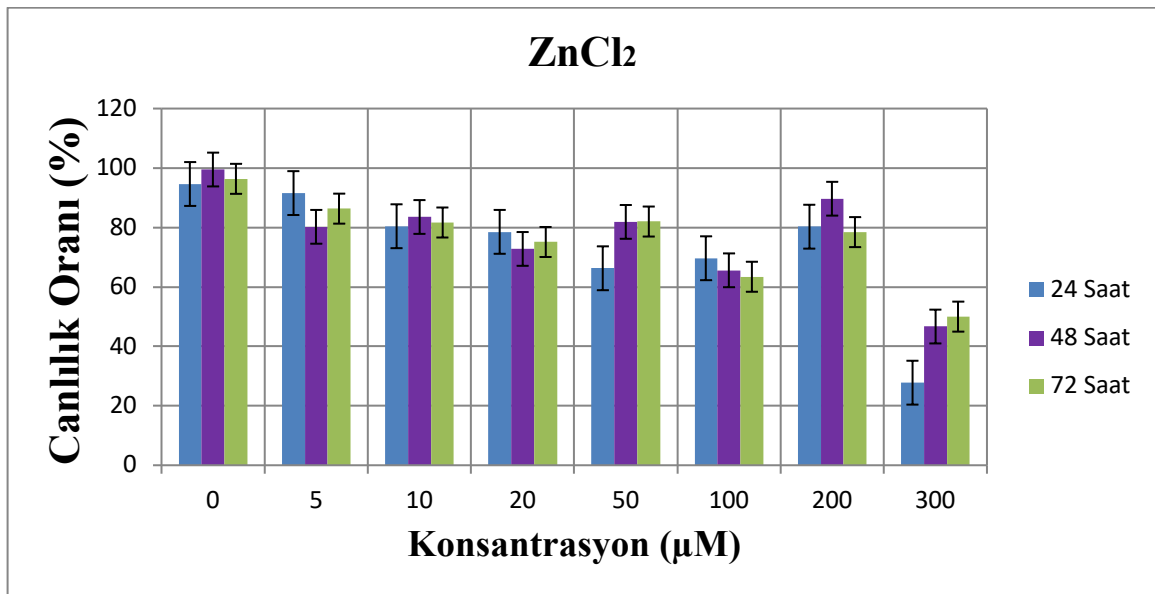


4. BULGULAR

A549 akciğer kanser hücrelerinde Zn, melittin ve HBO uygulamaları sonucunda meydana gelen hücresel değişimler, raman şiddetleri ve immünohistokimyasal farklılıklar açısından incelendi. Zn ve melittinin farklı dozlarda ve inkübasyon sürelerinde uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık analizleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de IC50 analiz sonuçları ise Tablo 4.1’de verildi. Zn, melittin ve HBO uygulamaları sonucunda elde edilen raman spektroskopisi analiz spektrumları Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de, analizden elde edilen veriler ise Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8, Tablo 4.9 ve Tablo 4.10’da verildi. Bunlara ek olarak immünohistokimyasal boyama analizleri sonucunda elde edilen sonuçlar ise Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da ve analizler sonucunda immüno pozitiflik değerlendirmeleri Tablo 4.11’de verildi.

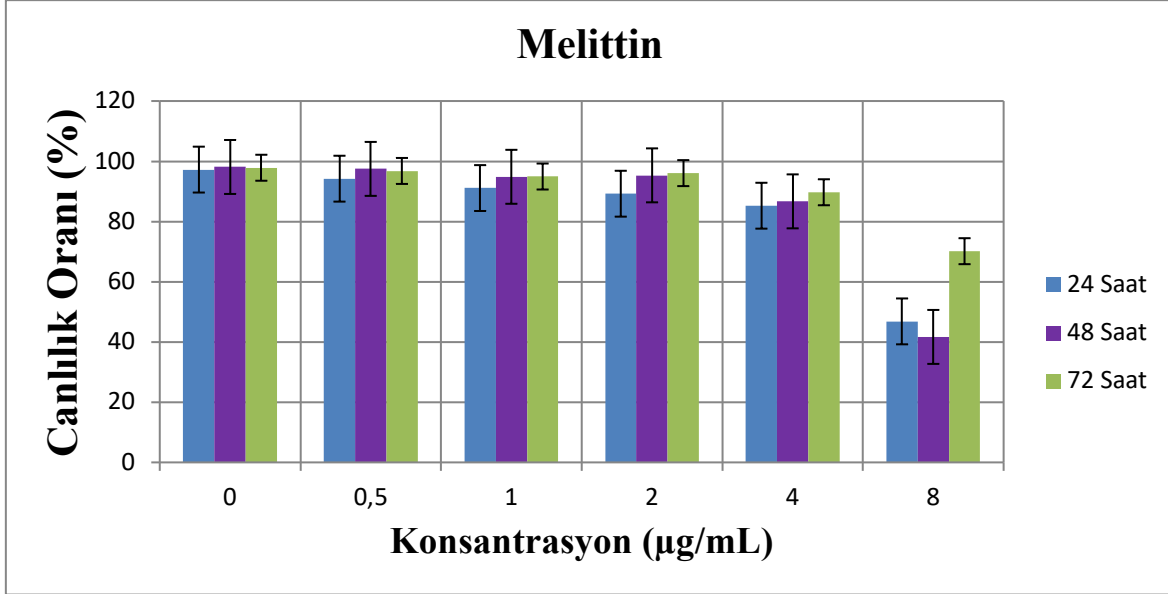
4.1. HÜCRE CANLILIK ANALİZİ

Işık mikroskobu ile yapılan hücre canlılık analizi 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri için ayrı ayrı tespit edildi. A549 kanser hücrelerine 3 ayrı inkübasyon süresi için 0 – 5 – 10 – 20 – 50 – 100 – 200 – 300 μM ZnCl_2 dozları uygulandı. Çinko için uygulanan dozlara ve inkübasyon süresine göre elde edilen hücre canlılık oranları Şekil 4.1’de verildi.



Şekil 4.1: Çinko uygulanan A549 kanser hücrelerinde canlılık oranı.

A549 kanser hücrelerine 0 – 0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 $\mu\text{g/mL}$ miktarlarında melittin uygulaması yapıldı. Hücre canlılık analizi melittinin farklı konsantrasyonları için 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerine göre ayrı ayrı uygulandı. Şekil 4.2’de melittinin farklı konsantrasyonlarının 3 farklı inkübasyon süresine göre hücre canlılık oranları verildi. Uygulanan her bir melittin konsantrasyonunun 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süresi sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları Şekil 4.2’de görülmektedir.



Şekil 4.2: Melittin uygulanan A549 kanser hücrelerinde canlılık oranı.

Çinko ve melittinin farklı konsantrasyonlarını uygularken doz sıralamasında 0 (sıfır) olarak ifade edilen veriler, hiç bir madde uygulaması yapılmamış ve inkübasyon süresinin ardından elde edilen verileri temsil eder.

4.2. DOZ BELİRLEME ANALİZİ SONUÇLARI (IC50)

A549 kanser hücrelerine çinko ve melittin uygulamaları için farklı doz ve farklı inkübasyon sürelerinde doz belirleme analizi yapıldı. Işık mikroskobu kullanılarak tripan mavisi ile yapılan işlem sonucunda hücre canlılık oranları elde edildi. Hücre canlılık oranları, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak çinko ve melittin maddelerinin kanser hücrelerini %50 oranında inhibe eden madde konsantrasyonu hesaplandı. Çinko ve melittin için 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri sonucunda üçer adet IC50 değeri elde edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Çinko ve melittin için farklı inkübasyon sürelerine göre elde edilen yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri.

	24 Saat		48 Saat		72 Saat	
Zn	IC50 (μ M)	R ²	IC50 (μ M)	R ²	IC50 (μ M)	R ²
	128,1	0,440	61	0,300	51,68	0,361
Melittin	IC50 (μ g/mL)	R ²	IC50 (μ g/mL)	R ²	IC50 (μ g/mL)	R ²
	4,656	0,875	4,572	0,930	4,479	0,842

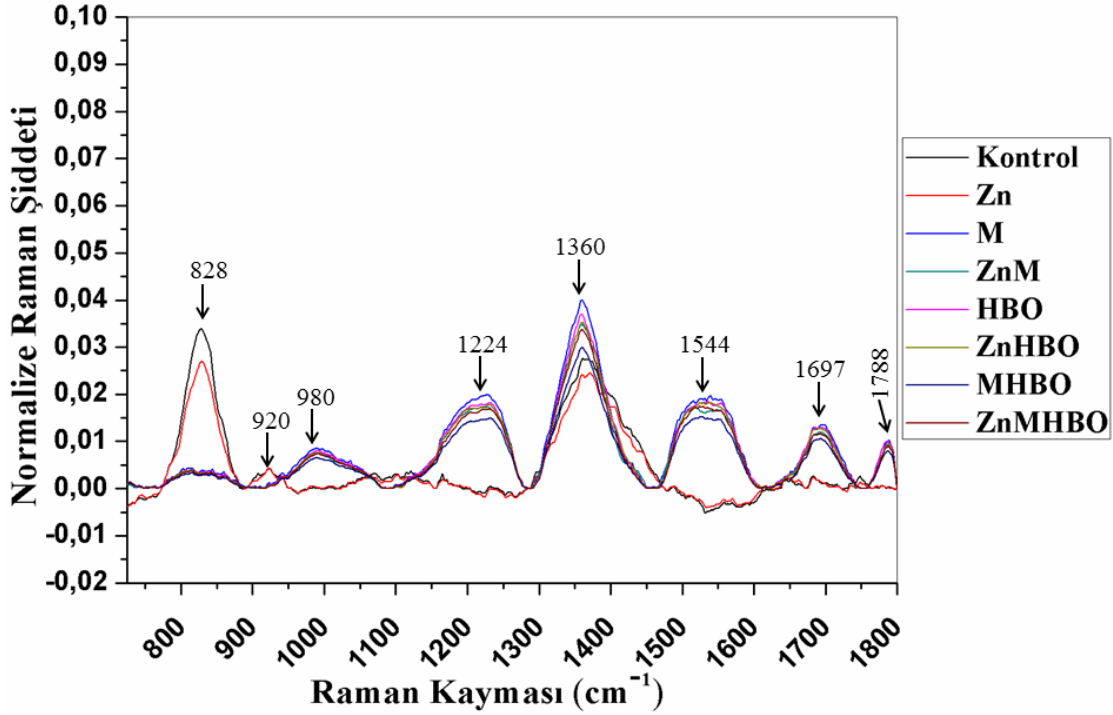
A549 kanser hücrelerine çinko uygulaması için IC50 değerlerine bakıldığında 24 saat inkübasyon süresi için 128,1 μ M, 48 saat inkübasyon süresi için 61 μ M ve 72 saat inkübasyon süresi için 51,68 μ M ZnCl₂ uygulanması gerektiği tespit edildi. Melittinin IC50 değerlerine bakıldığında ise 24 saat inkübasyon süresi için 4,656 μ g/mL, 48 saat inkübasyon süresi için 4,572 μ g/mL ve 72 saat inkübasyon süresi için 4,479 μ g/mL konsantrasyonunda melittin uygulanması gerektiği sonucuna varıldı.

Çinko ve melittinin beraber uygulamalarının da yapılabilmesi için aynı inkübasyon süresi tercih edildi. Bu nedenle elde edilen IC50 değerleri sonucunda deneyin ikinci aşamasında inkübasyon süresi olarak 48 saat ve uygulanacak doz miktarları ise çinko için 61 μ M ve melittin için 4,572 μ g/mL seçildi. Deneyin ikinci aşamasında, tüm çinko uygulamalarında 61 μ M konsantrasyonunda ZnCl₂ ve tüm melittin uygulamalarında 4,572 μ g/mL konsantrasyonunda melittin uygulandı.

4.3. RAMAN SPEKTROSKOPİSİ ANALİZ SONUÇLARI

A549 kanser hücrelerinde çinko ve melittin için doz belirleme aşamasının ardından deney grupları oluşturuldu. Deney grupları; Kontrol, Çinko grubu (Zn), Melittin grubu (M), Çinko+Melittin grubu (ZnM), Hiperbarik Oksijen grubu (HBO), Çinko+Hiperbarik Oksijen grubu (ZnHBO), Melittin+Hiperbarik Oksijen grubu (MHBO) ve Çinko+Melittin+Hiperbarik Oksijen grubu (ZnMHBO)'dur. Deney gruplarında HBO 1 saat, çinko 61 μ M ZnCl₂ ve melittin 4,572 μ g/mL konsantrasyonlarında uygulandı. Deney sürecinin tamamlanmasının ardından hücreler fikse edildi. Fikse edilmiş hücrelerde raman spektroskopisi ölçümleri yapıldı. Normalize

raman şiddeti değerleri, 725 cm^{-1} ve 1800 cm^{-1} aralığındaki raman kaymalarına göre incelendi (Şekil 4.3). Raman spektroskopisi analizinden elde edilen spektrumlar $725\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ bölgesi için Şekil 4.3’de, $725\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ bölgesi için Şekil 4.4’de, $950\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$ bölgesi için Şekil 4.5’de, $1230\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$ bölgesi için Şekil 4.6’da ve $1510\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ bölgesi için Şekil 4.7’de verildi. Raman spektroskopisi analizinde farklı şiddetlerde gözlenen piklerden elde edilen veriler ve istatistiksel analizleri ise Tablo 4.2’de verildi.



Şekil 4.3: Normalize raman şiddeti değerlerinin $725\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ bölgesi için raman spektrumu.

Normalize raman şiddeti $725\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ bölgesine ait Şekil 4.3’deki raman spektrumunda 828 cm^{-1} , 920 cm^{-1} , 980 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} , 1697 cm^{-1} ve 1788 cm^{-1} değerlerinde raman şiddetine katkı sağlayan pikler görüldü. Kontrol ve deney gruplarının Şekil 4.3’deki raman spektrumunu daha yakından inceleyebilmek için $725\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ bölgesi, $950\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$ bölgesi, $1230\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$ bölgesi ve $1510\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ bölgesi olmak üzere 4 bölgeye ayırdık. Her bölgede raman spektrumuna katkı sağlayan raman şiddetlerine ait gruplar arası istatistiksel analizler 828 cm^{-1} için Tablo 4.3’de, 920 cm^{-1} için Tablo 4.4’de, 980 cm^{-1} için Tablo 4.5’de, 1224 cm^{-1} için Tablo 4.6’da, 1360 cm^{-1} için Tablo 4.7’de, 1544 cm^{-1} için Tablo 4.8’de, 1697 cm^{-1} için Tablo 4.9’da ve 1788 cm^{-1} için Tablo 4.10’da ayrı ayrı verildi.

Tablo 4.2: Deney gruplarının 725-1800 cm^{-1} bölgesindeki raman şiddetleri.

	828	920	980	1224
	cm^{-1}	cm^{-1}	cm^{-1}	cm^{-1}
Kontrol	33,8±18,1	4,23±2,26	0,09±0,39	0,05±0,54
Zn	26,9±8,8	4,29±1,37	0,39±0,66	0,82±0,32
M	3,51±0,92	1,07±0,46	7,53±1,49	18,9±3,5
ZnM	2,93±0,23	0,83±0,18	6,97±0,44	17,09±0,6
HBO	3,41±0,42	0,74±0,13	7,26±0,42	17,7±1,2
ZnHBO	3,16±0,27	0,64±0,14	7,07±0,53	17,3±1,3
MHBO	2,73±0,87	0,50±0,18	5,89±1,99	14,4±4,8
ZnMHBO	3,01±0,27	0,54±0,13	6,64±0,36	16,6±1,1
p	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Temsil	Fosfodiester	Glikoz	β - konformasyonu	Amid III
Referans	[122]	[123]	[124]	[125]

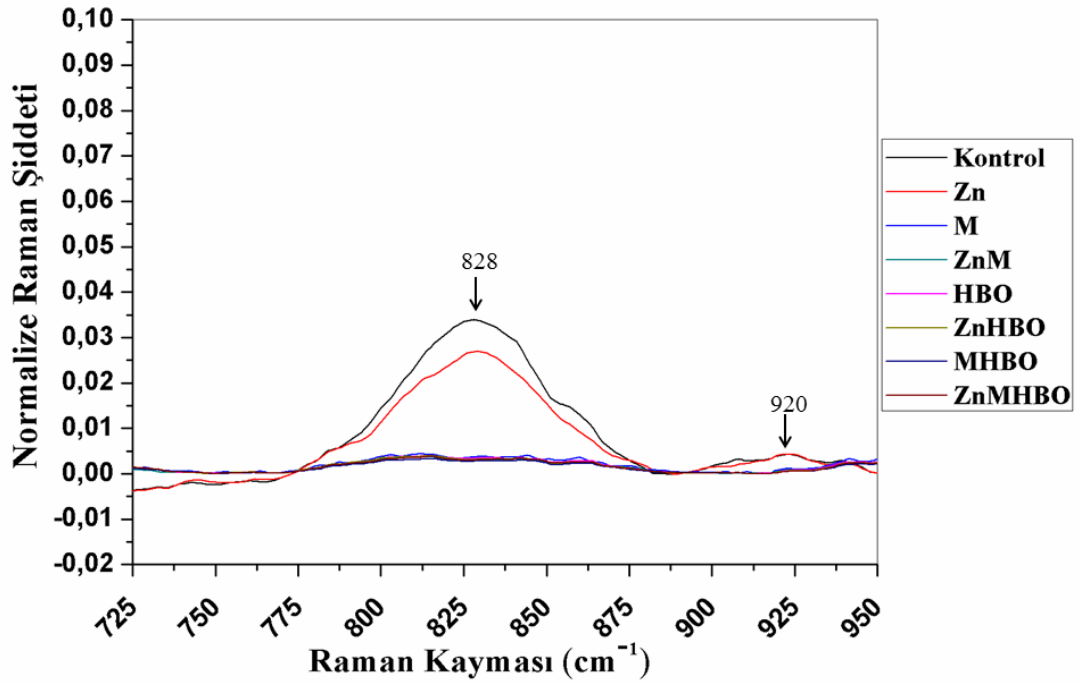
* Normalize raman şiddeti değerleri $\times 10^{-3}$ olarak verildi.

Tablo 4.2 (devamı): Deney gruplarının 725-1800 cm^{-1} bölgesindeki raman şiddetleri.

	1360	1544	1697	1788
	cm^{-1}	cm^{-1}	cm^{-1}	cm^{-1}
Kontrol	27,1 $\pm$ 3,4	0,04 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,36	0,29 $\pm$ 0,51
Zn	24,1 $\pm$ 1,7	0,37 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,39	0,12 $\pm$ 0,09
M	38,3 $\pm$ 6,5	18,2 $\pm$ 2,8	12,8 $\pm$ 2,5	9,6 $\pm$ 2,07
ZnM	34,7 $\pm$ 1,4	16,4 $\pm$ 0,7	11,7 $\pm$ 0,6	9,23 $\pm$ 0,57
HBO	36,8 $\pm$ 2,7	17,5 $\pm$ 1,1	12,8 $\pm$ 0,7	10,1 $\pm$ 0,65
ZnHBO	35,2 $\pm$ 2,6	17,8 $\pm$ 1,3	12,5 $\pm$ 0,6	9,51 $\pm$ 1,03
MHBO	29,6 $\pm$ 9,9	14,4 $\pm$ 4,8	10,1 $\pm$ 3,4	7,91 $\pm$ 2,58
ZnMHBO	33,4 $\pm$ 1,9	16,5 $\pm$ 0,9	11,2 $\pm$ 0,6	8,85 $\pm$ 0,81
p	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Temsil	Triptofan	Amid II	Amid I	Karboksilik asit
Referans	[126]	[127]	[125]	[128]

* Normalize raman şiddeti değerleri $\times 10^{-3}$ olarak verildi.

725-1800 cm^{-1} bölgesinde tüm raman spektrumunda Kontrol grubu ve deney grupları olan Zn, M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO gruplarına ait belirli raman şiddetlerine ait normalize raman değerlerinin ortalaması alınarak Ortalama $\pm$ Standart Sapma şeklinde ve yorumlanmasında kolaylık sağlamak için tüm değerler 10^{-3} katı olarak Tablo 4.2’de verildi. Ayrıca Tablo 4.2’de raman şiddetine katkı sağladığı görülen 828 cm^{-1} , 920 cm^{-1} , 980 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} , 1697 cm^{-1} ve 1788 cm^{-1} piklerini temsil eden biyolojik yapılar ve bunların referansları da belirtildi.



Şekil 4.4: Normalize raman şiddeti değerlerinin 725-950 cm^{-1} bölgesi için raman spektrumu.

Şekil 4.4’de normalize raman şiddeti değerlerinin spektrumunda 828 cm^{-1} ve 920 cm^{-1} pikleri vardır. Raman kayması 828 cm^{-1} değerinde; Kontrol grubunda $33,8 \pm 18,1$ değerinde, Zn grubunda $26,9 \pm 8,8$ değerinde, M grubunda $3,51 \pm 0,92$ değerinde, ZnM grubunda $2,93 \pm 0,23$ değerinde, HBO grubunda $3,41 \pm 0,42$ değerinde, ZnHBO grubunda $3,16 \pm 0,27$ değerinde, MHBO grubunda $2,73 \pm 0,87$ değerinde, ZnMHBO grubunda $3,01 \pm 0,27$ değerinde normalize raman şiddetleri ($\times 10^{-3}$) elde edildi. Raman kayması 920 cm^{-1} değerinde ise Kontrol grubunda $4,23 \pm 2,26$ değerinde, Zn grubunda $4,29 \pm 1,37$ değerinde, M grubunda $1,07 \pm 0,46$ değerinde, ZnM grubunda $0,83 \pm 0,18$ değerinde, HBO grubunda $0,74 \pm 0,13$ değerinde, ZnHBO grubunda $0,64 \pm 0,14$ değerinde, MHBO grubunda $0,50 \pm 0,18$ değerinde, ZnMHBO grubunda $0,54 \pm 0,13$ değerinde normalize raman şiddetleri ($\times 10^{-3}$) elde edildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.3: 828 cm⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.

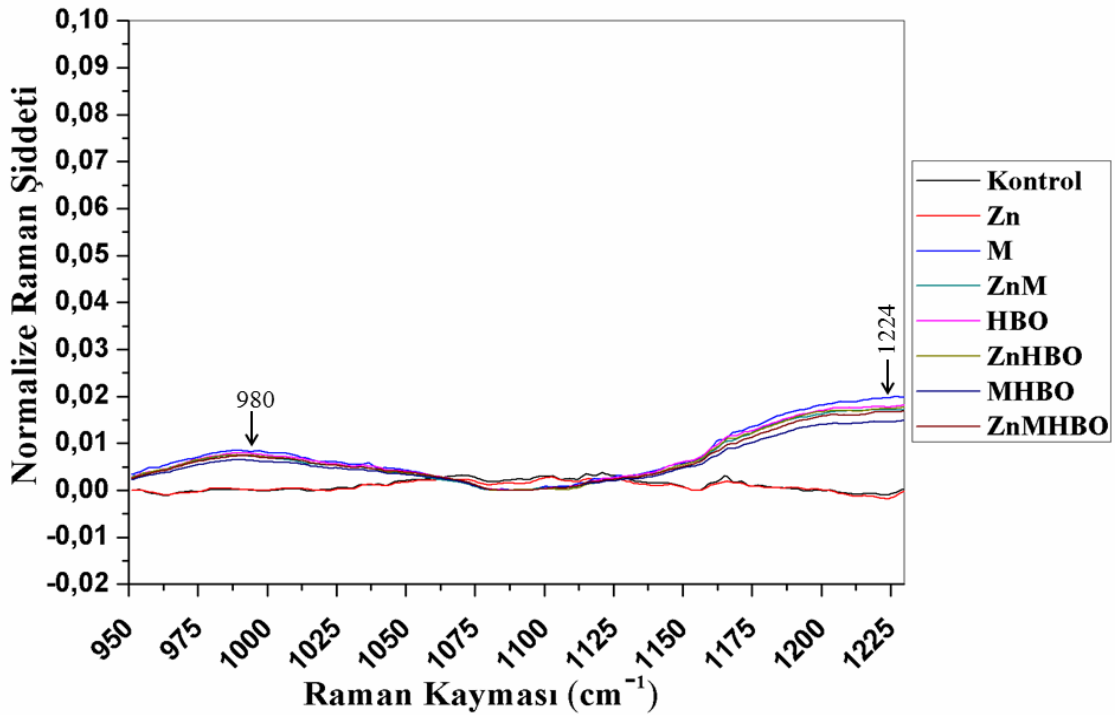
828 cm ⁻¹	Kontrol	Zn	M	ZnM	HBO	ZnHBO	MHBO	ZnMHBO
Kontrol	-	p>0,05	***	***	***	***	***	***
Zn		-	***	***	***	***	***	***
M			-	p>0,05	p>0,05	p>0,05	*	p>0,05
ZnM				-	**	p>0,05	p>0,05	p>0,05
HBO					-	p>0,05	***	**
ZnHBO						-	p>0,05	p>0,05
MHBO							-	p>0,05
ZnMHBO								-
*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.								
p>0,05: İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok.								

Raman kayması 828 cm⁻¹ değerinde Kontrol grubunu M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları ile karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi (p<0,001) (Tablo 4.2). Fakat Kontrol grubunu Zn grubu ile karşılaştırdığımızda matematiksel olarak raman şiddetinde bir azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (Tablo 4.3). Zn grubunu M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (p<0,001). M grubunun ZnM, HBO, ZnHBO ve ZnMHBO grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen M grubu MHBO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ve daha fazladır (p<0,05). ZnM grubunda ise sadece HBO grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ve ZnM grubu HBO grubuna göre daha düşüktür (p<0,01). HBO grubu ile MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır (sırasıyla p<0,001 ve p<0,01).

Tablo 4.4: 920 cm⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.

920 cm ⁻¹	Kontrol	Zn	M	ZnM	HBO	ZnHBO	MHBO	ZnMHBO
Kontrol	-	p>0,05	***	***	***	***	***	***
Zn		-	***	***	***	***	***	***
M			-	p>0,05	*	**	***	***
ZnM				-	p>0,05	*	***	***
HBO					-	p>0,05	***	***
ZnHBO						-	p>0,05	p>0,05
MHBO							-	p>0,05
ZnMHBO								-
*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.								
p>0,05: İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok.								

Raman kayması 920 cm⁻¹ değerinde Kontrol ve Zn gruplarının M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar var (p<0,001). M grubu ile ZnM arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok olmasına rağmen M grubu HBO (p<0,05), ZnHBO (p<0,01), MHBO (p<0,001) ve ZnMHBO (p<0,001) grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha fazladır (Tablo 4.4). ZnM grubu ile ZnHBO (p<0,05), MHBO (p<0,001) ve ZnMHBO (p<0,001) grupları karşılaştırıldığında ZnM grubu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazladır. Ayrıca HBO grubu MHBO ve ZnMHBO gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazladır (p<0,001). Fakat ZnHBO grubu ile MHBO ve ZnMHBO grupları arasında matematiksel olarak bir farklılık olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur.



Şekil 4.5: Normalize raman şiddeti değerlerinin 950-1230 cm^{-1} bölgesi için raman spektrumu.

Şekil 4.5’de normalize raman şiddeti değerlerinin spektrumunda 980 cm^{-1} ve 1224 cm^{-1} pikleri vardır. Raman kayması 980 cm^{-1} değerinde; Kontrol grubunda $0,09 \pm 0,39$ değerinde, Zn grubunda $0,39 \pm 0,66$ değerinde, M grubunda $7,53 \pm 1,49$ değerinde, ZnM grubunda $6,97 \pm 0,44$ değerinde, HBO grubunda $7,26 \pm 0,42$ değerinde, ZnHBO grubunda $7,07 \pm 0,53$ değerinde, MHBO grubunda $5,89 \pm 1,99$ değerinde, ZnMHBO grubunda $6,64 \pm 0,36$ değerinde normalize raman şiddetleri ($\times 10^{-3}$) elde edildi. Ayrıca aynı bölgede 1224 cm^{-1} raman kayması değerinde ise Kontrol grubunda $0,05 \pm 0,54$ değerinde, Zn grubunda $0,82 \pm 0,32$ değerinde, M grubunda $18,9 \pm 3,5$ değerinde, ZnM grubunda $17,09 \pm 0,6$ değerinde, HBO grubunda $17,7 \pm 1,2$ değerinde, ZnHBO grubunda $17,3 \pm 1,3$ değerinde, MHBO grubunda $14,4 \pm 4,8$ değerinde, ZnMHBO grubunda $16,6 \pm 1,1$ değerinde normalize raman şiddeti değerleri ($\times 10^{-3}$) tespit edildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.5: 980 cm⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.

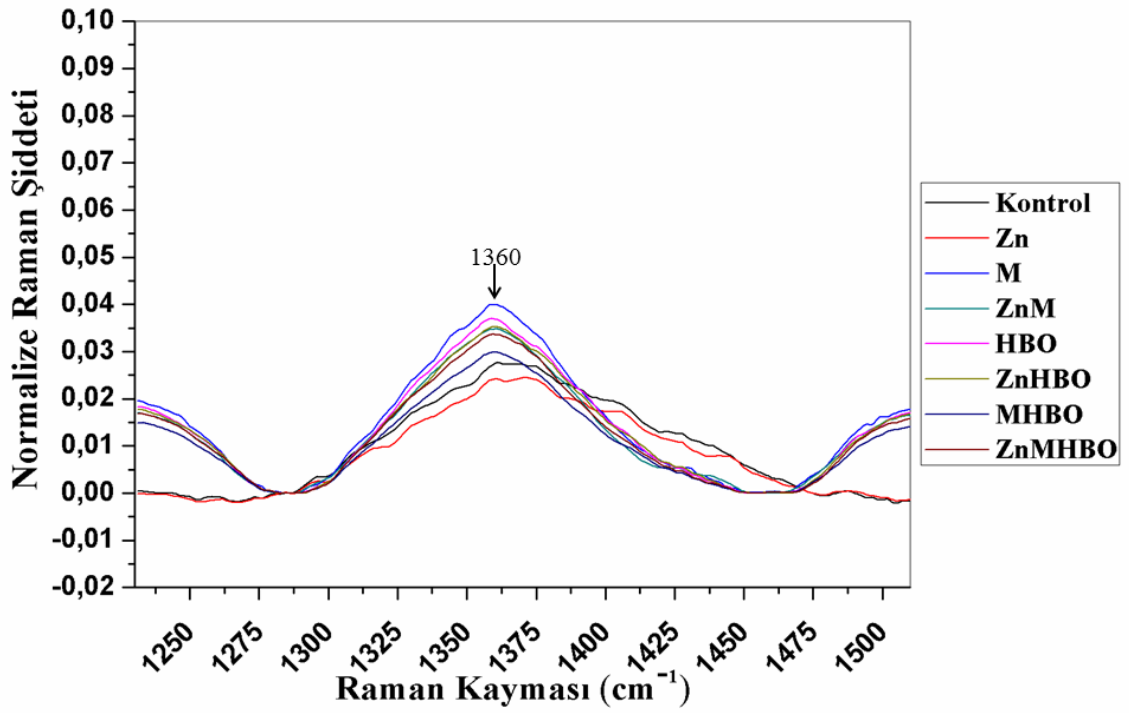
980 cm ⁻¹	Kontrol	Zn	M	ZnM	HBO	ZnHBO	MHBO	ZnMHBO
Kontrol	-	p>0,05	***	***	***	***	***	***
Zn		-	***	***	***	***	***	***
M			-	p>0,05	p>0,05	p>0,05	*	p>0,05
ZnM				-	p>0,05	p>0,05	**	*
HBO					-	p>0,05	***	**
ZnHBO						-	*	*
MHBO							-	p>0,05
ZnMHBO								-
*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.								
p>0,05: İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok.								

Tablo 4.5’de görüldüğü üzere raman kayması 980 cm⁻¹ değerinde Kontrol grubunun M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu (p<0,001). Aynı şekilde Zn grubu ile M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış var (p<0,001). Fakat Kontrol ile Zn grubu arasında matematiksel olarak bir fark olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. M grubu ile MHBO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (p<0,05) olmasına rağmen M grubu ile Zn, HBO, ZnHBO ve ZnMHBO grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. ZnM grubu Kontrol ve Zn grupları haricinde sadece MHBO (p<0,01) ve ZnMHBO (p<0,05) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır. Benzer şekilde, HBO grubu ile MHBO (p<0,001) ve ZnMHBO (p<0,01) grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır. ZnHBO grubu ile MHBO ve ZnMHBO grupları arasında ise p<0,05 düzeyinde de olsa istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır.

Tablo 4.6: 1224 cm⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.

1224 cm ⁻¹	Kontrol	Zn	M	ZnM	HBO	ZnHBO	MHBO	ZnMHBO
Kontrol	-	**	***	***	***	***	***	***
Zn		-	***	***	***	***	***	***
M			-	p>0,05	p>0,05	p>0,05	**	*
ZnM				-	p>0,05	p>0,05	**	p>0,05
HBO					-	p>0,05	**	*
ZnHBO						-	*	*
MHBO							-	**
ZnMHBO								-
*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.								
p>0,05: İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok.								

Raman kayması 1224 cm⁻¹ değerinde Tablo 4.6’da görüldüğü gibi Kontrol grubu ile M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış var (p<0,001). Aynı zamanda diğer raman şiddetlerinden farklı olarak Kontrol grubu ile Zn grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak p<0,01 düzeyinde anlamlı bir artış görüldü. Zn grubunun M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu (p<0,001). M grubunun gruplarla karşılaştırılması sonucunda MHBO (p<0,01) ve ZnMHBO (p<0,05) grupları ile istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü. ZnM grubu ise Kontrol ve Zn grubu dışında sadece MHBO grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p<0,01). Benzer şekilde HBO grubuna baktığımızda MHBO (p<0,01) ve ZnMHBO (p<0,05) grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. ZnHBO grubu ile MHBO grubu ve ZnMHBO grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı bir azalma tespit edildi. Bunlara ek olarak 1224 cm⁻¹ raman kayması değerinde MHBO grubu ZnMHBO grubuna göre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde daha düşüktür.



Şekil 4.6: Normalize raman şiddeti değerlerinin 1230-1510 cm^{-1} bölgesi için raman spektrumu.

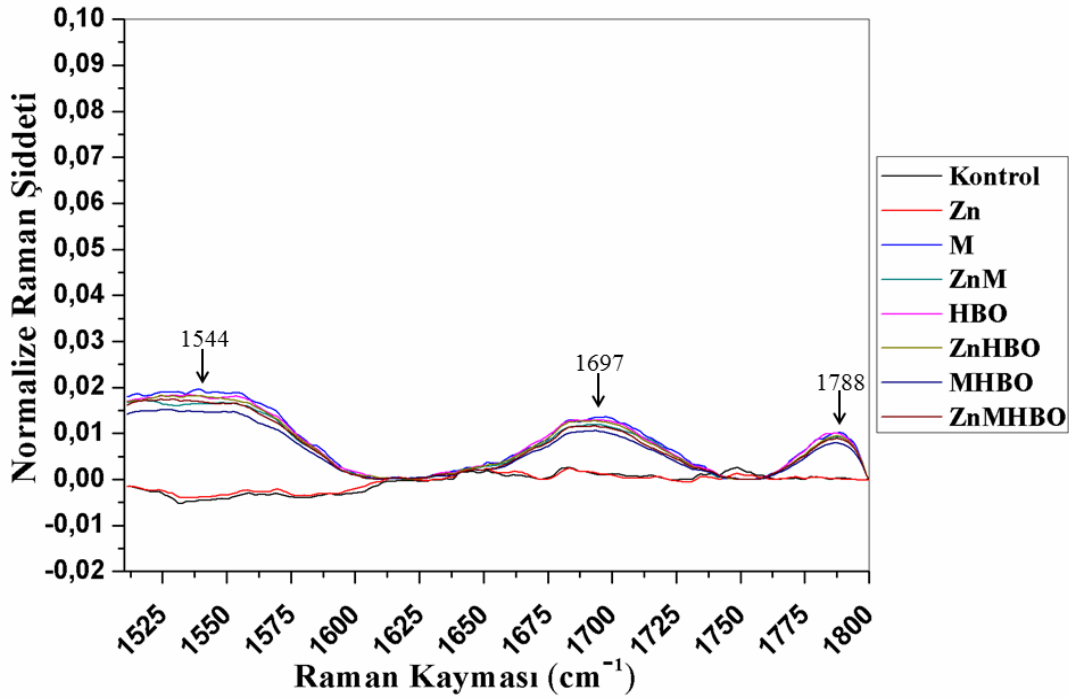
Normalize raman şiddeti 1230-1510 cm^{-1} bölgesindeki spektrumda Şekil 4.6'da görüldüğü üzere sadece 1360 cm^{-1} piki vardır. Raman kayması 1360 cm^{-1} değerindeki pike bakıldığında Kontrol grubunda $27,1 \pm 3,4$ değerinde, Zn grubunda $24,1 \pm 1,7$ değerinde, M grubunda $38,3 \pm 6,5$ değerinde, ZnM grubunda $34,7 \pm 1,4$ değerinde, HBO grubunda $36,8 \pm 2,7$ değerinde, ZnHBO grubunda $35,2 \pm 2,6$ değerinde, MHBO grubunda $29,6 \pm 9,9$ değerinde, ZnMHBO grubunda $33,4 \pm 1,9$ değerinde normalize raman şiddetleri ($\times 10^{-3}$) elde edildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.7: 1360 cm⁻¹ Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.

1360 cm ⁻¹	Kontrol	Zn	M	ZnM	HBO	ZnHBO	MHBO	ZnMHBO
Kontrol	-	p>0,05	***	***	***	***	***	***
Zn		-	***	***	***	***	***	***
M			-	p>0,05	p>0,05	p>0,05	**	**
ZnM				-	p>0,05	p>0,05	**	*
HBO					-	p>0,05	***	**
ZnHBO						-	*	*
MHBO							-	p>0,05
ZnMHBO								-
*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.								
p>0,05: İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok.								

Tablo 4.7’de görüldüğü üzere raman kayması 1360 cm⁻¹ değerinde Kontrol grubu ile Zn grubu arasında matematiksel olarak bir azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir azalma elde edilmedi. Fakat Kontrol grubu ile M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi (p<0,001). Aynı zamanda Zn grubu ile M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak p<0,001 düzeyinde anlamlı bir artış görüldü. M grubunda ZnM, HBO ve ZnHBO grupları ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıkları olmamasına rağmen, M grubu MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulundu (p<0,01). ZnM grubunun gruplarla karşılaştırılması sonucunda MHBO (p<0,01) ve ZnMHBO (p<0,05) grupları ile istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü. HBO grubunu kıyasladığımızda ise sadece MHBO (p<0,001) ve ZnMHBO grupları (p<0,01) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır. ZnHBO grubunda ise sadece MHBO ve ZnMHBO grupları arasında istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı bir fark

bulundu. MHBO grubu ile ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında matematiksel olarak farklılık olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi.



Şekil 4.7: Normalize raman şiddeti değerlerinin 1510-1800 cm⁻¹ bölgesi için raman spektrumu.

Şekil 4.7’de görüldüğü üzere normalize raman şiddeti değerleri 1510-1800 cm⁻¹ bölgesi spektrumunda 1544 cm⁻¹, 1697 cm⁻¹ ve 1788 cm⁻¹ pikleri vardır. Raman kayması 1544 cm⁻¹ değerindeki pike bakıldığında Kontrol grubunda 0,04±0,09 değerinde, Zn grubunda 0,37±0,06 değerinde, M grubunda 18,2±2,8 değerinde, ZnM grubunda 16,4±0,7 değerinde, HBO grubunda 17,5±1,1 değerinde, ZnHBO grubunda 17,8±1,3 değerinde, MHBO grubunda 14,4±4,8 değerinde, ZnMHBO grubunda 16,5±0,9 değerinde normalize raman şiddetleri (x10⁻³) elde edildi (Tablo 4.2). Bu bölgede gözlenen diğer bir pik olan 1697 cm⁻¹ raman kayması değerinde ise Kontrol grubunda 1,03±0,36 değerinde, Zn grubunda 1,14±0,39 değerinde, M grubunda 12,8±2,5 değerinde, ZnM grubunda 11,7±0,6 değerinde, HBO grubunda 12,8±0,7 değerinde, ZnHBO grubunda 12,5±0,6 değerinde, MHBO grubunda 10,1±3,4 değerinde, ZnMHBO grubunda 11,2±0,6 değerinde normalize raman şiddetleri (x10⁻³) bulundu. Ayrıca 1788 cm⁻¹ raman kayması değerinde ise Kontrol grubunda 0,29±0,51 değerinde, Zn grubunda 0,12±0,09 değerinde, M grubunda 9,6±2,07 değerinde, ZnM grubunda 9,23±0,57 değerinde, HBO grubunda 10,1±0,65 değerinde, ZnHBO grubunda 9,51±1,03 değerinde, MHBO

grubunda $7,91 \pm 2,58$ değerinde, ZnMHBO grubunda $8,85 \pm 0,81$ değerinde normalize raman şiddetleri ($\times 10^{-3}$) elde edildi.

Tablo 4.8: 1544 cm^{-1} Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.

1544 cm^{-1}	Kontrol	Zn	M	ZnM	HBO	ZnHBO	MHBO	ZnMHBO
Kontrol	-	$p > 0,05$	***	***	***	***	***	***
Zn		-	***	***	***	***	***	***
M			-	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	**	$p > 0,05$
ZnM				-	**	**	$p > 0,05$	$p > 0,05$
HBO					-	$p > 0,05$	**	**
ZnHBO						-	**	*
MHBO							-	*
ZnMHBO								-
*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.								
$p > 0,05$: İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok.								

Raman kayması 1544 cm^{-1} değerinde Tablo 4.8’de görüldüğü üzere Kontrol grubu ile Zn grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi. Fakat Kontrol grubu ile Zn grubu dışında M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p < 0,001$). Aynı şekilde Zn grubu ile M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,001$). M grubunu karşılaştırdığımızda Kontrol ve Zn grupları dışında sadece MHBO grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0,01$). ZnM grubuna baktığımızda HBO ve ZnHBO grupları arasında istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bir artış görüldü. HBO grubunun MHBO ve ZnMHBO grubu ile karşılaştırılması sonucunda $p < 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. ZnHBO grubu ise MHBO grubu ile $p < 0,01$ düzeyinde, ZnMHBO grubu ile $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. Bunlara ek olarak 1544 cm^{-1} raman kayması değerinde MHBO grubu ile

ZnMHBO grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunup; MHBO grubunun ZnMHBO grubuna göre daha düşük değerde olduğu görüldü.

Tablo 4.9: 1697 cm^{-1} Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.

1697 cm^{-1}	Kontrol	Zn	M	ZnM	HBO	ZnHBO	MHBO	ZnMHBO
Kontrol	-	$p > 0,05$	***	***	***	***	***	***
Zn		-	***	***	***	***	***	***
M			-	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	***	$p > 0,05$
ZnM				-	***	*	$p > 0,05$	*
HBO					-	$p > 0,05$	***	***
ZnHBO						-	*	**
MHBO							-	$p > 0,05$
ZnMHBO								-
*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.								
$p > 0,05$: İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok.								

Raman kayması 1697 cm^{-1} değerinde Tablo 4.9’da görüldüğü üzere Kontrol grubu ile Zn grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi. Diğer taraftan Kontrol grubu ile M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı bir artış tespit edildi. Benzer şekilde, Zn grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardır ($p < 0,001$). Fakat M grubu, Kontrol ve Zn grubu dışındaki diğer gruplarla karşılaştırıldığında sadece MHBO grubu ile istatistiksel olarak $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı bir azalma bulundu. ZnM grubunda ise MHBO grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen HBO grubu ($p < 0,001$), ZnHBO grubu ($p < 0,05$) ve ZnMHBO grubu ($p < 0,05$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi. HBO grubunda MHBO grubu ve ZnMHBO grubu ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı bir azalma vardır. MHBO grubu ile ZnMHBO grubu karşılaştırıldığında matematiksel

olarak farklılık olmasına rağmen 1697 cm^{-1} raman kayması değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Diğer taraftan ZnHBO grubu ile MHBO grubu ($p<0,05$) ve ZnMHBO grubu ($p<0,01$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi.

Tablo 4.10: 1788 cm^{-1} Raman kaymasının gruplar arası istatistiksel analizi.

1788 cm^{-1}	Kontrol	Zn	M	ZnM	HBO	ZnHBO	MHBO	ZnMHBO
Kontrol	-	$p>0,05$	***	***	***	***	***	***
Zn		-	***	***	***	***	***	***
M			-	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$
ZnM				-	**	$p>0,05$	**	$p>0,05$
HBO					-	$p>0,05$	***	***
ZnHBO						-	*	$p>0,05$
MHBO							-	$p>0,05$
ZnMHBO								-

*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$.
 $p>0,05$: İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok.

Son olarak $1510\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ raman spektrumu bölgesindeki 1788 cm^{-1} raman kayması değerinde Kontrol grubu ile Zn grubu arasında matematiksel olarak fark olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi (Tablo 4.10). Kontrol ve Zn grubu ile ayrı ayrı M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardır ($p<0,001$). Diğer taraftan M grubu, Kontrol ve Zn grubu dışında diğer gruplarla karşılaştırıldığında matematiksel olarak gruplar arasında azalma ve artma görülsede istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilemedi. ZnM grubunda ise HBO ve MHBO grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılıklar bulundu. HBO grubunun gruplar arası karşılaştırılması sonucunda Kontrol grubu, Zn grubu, MHBO grubu ve ZnMHBO grubu ile istatistiksel olarak $p<0,001$ düzeyinde ZnM grubu ile istatistiksel olarak $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bir fark tespit edildi. ZnHBO grubu ile MHBO

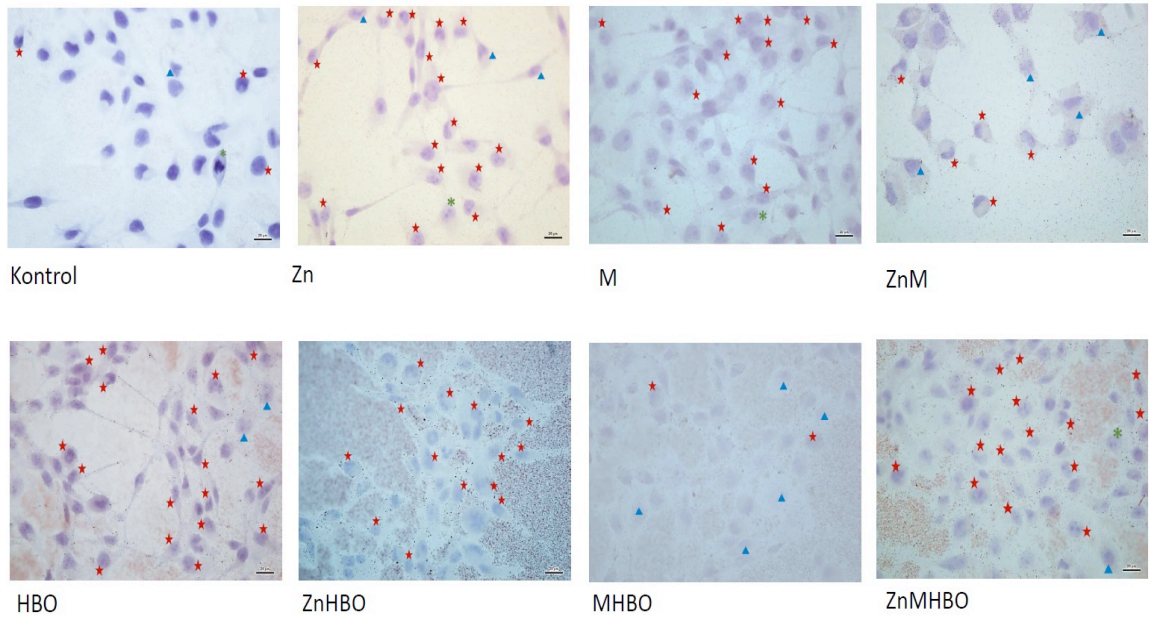
grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır ($p<0,05$). Fakat MHBO grubu ile ZnMHBO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

4.4. İMMUNOSİTOKİMYASAL BOYAMA SONUÇLARI

İmmunositokimyasal boyama işlemleri Bax ve Bcl-2 immün boyama olarak yapılarak verilere göre immünpozitiflik değerlendirmesi Tablo 4.11’de ve elde edilen görüntüler ise Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da verildi.

4.4.1. Bax immün boyama sonuçları

A549 akciğer kanser hücrelerinde uygulanan Zn, melittin ve HBO işlemlerinin ardından immunositokimyasal incelemeler için Bax immün boyama işlemi her grup için yapıldı. Bunun sonucunda Kontrol grubu, Zn, M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO gruplarına ait Bax immün boyama görüntüleri Şekil 4.8’de verildi. Kontrol grubunda çok nadir apoptotik ve nekrotik görünümlü hücrelerin yanı sıra yer yer de hücre bölünmesi karakteristiği bulunan hücreler gözlemlendi. Zn grubunda ise kontrol gruba kıyasla apoptotik morfoloji gösteren hücrelerde Bax immünpozitifliğinde bir artış gözlemlendi. Ayrıca bazı nekrotik görünümlü hücreler ile birlikte hücre bölünmesi karakteristiği bulunan hücreler de görüldü. Melittin uygulanan grupta (M), Kontrol ve Zn gruplarına kıyasla artmış Bax immünpozitifliği gözlemlendi. ZnM uygulanan grupta Bax immünpozitifliğinde melittin uygulanan gruba (M) kıyasla artış vardır. Ayrıca diğer gruplara kıyasla nekrotik görünümlü hücre sayısında da artış olduğu görüldü. HBO grubunda apoptotik hücrelerde Bax immünpozitifliği artmış olarak gözlemlendi. Nekrotik karakterli hücre sayısında artmış olarak gözlemlendi. ZnHBO grubunda Bax immünpozitifliği azalmış olmakla beraber yer yer apoptotik görünümlü hücreler vardır. MHBO grubunda apoptotik hücrelerde Bax immünpozitifliği azalmış olmakla birlikte nekrotik karakterli hücre sayısında artış gözlemlendi. ZnMHBO grubunda ise apoptotik hücrelerde Bax immünpozitifliğinde belirgin bir artış olmamakla birlikte nekrotik karakterli hücre sayısında artış vardır.

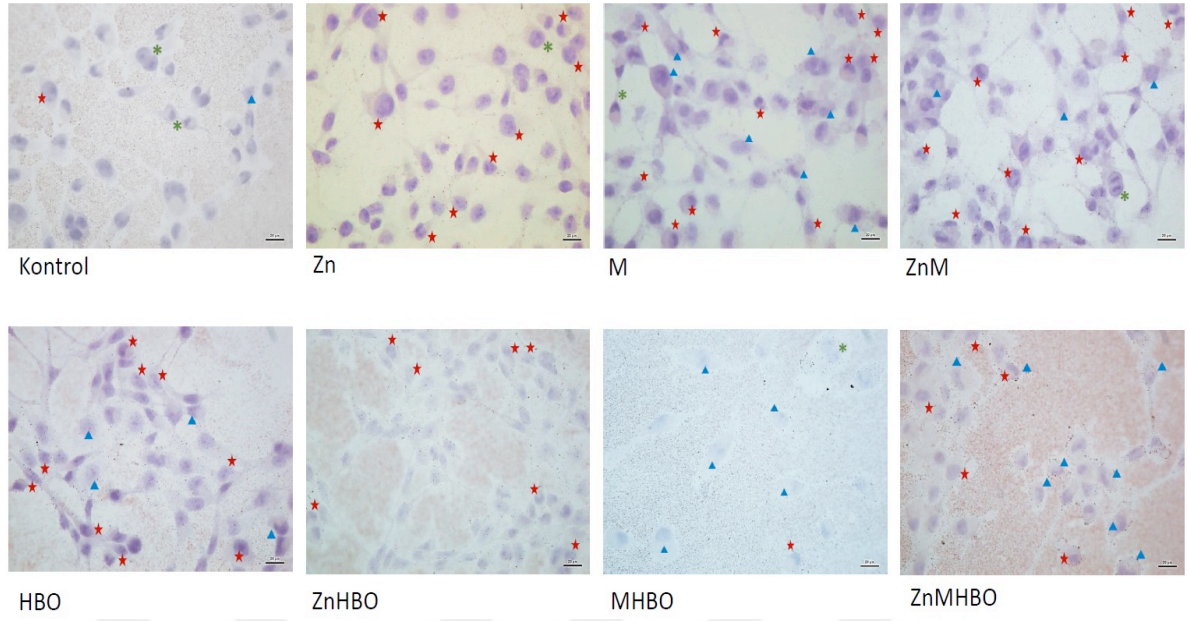


Şekil 4.8: Bax immunositokimyasal boyama yapılan gruplara ait görüntüler.

★: apoptik, ▲: nekroz, *: hücre bölünmesi. İmmunboyama: Streptavidin Biotin Peroksidaz yöntemi.

4.4.2. Bcl-2 immün boyama sonuçları

Zn, melittin ve HBO uygulamaları sonucunda A549 akciğer kanser hücrelerinde immunositokimyasal incelemeler için Bcl-2 immün boyama işlemi Kontrol grubu, Zn, M, ZnM, HBO, ZnHBO, MHBO ve ZnMHBO grupları için yapıldı ve elde edilen Bcl-2 immün boyama görüntüleri Şekil 4.9’da verildi. Zn grubunda Kontrol gruba kıyasla apoptotik morfoloji gösteren hücrelerin sitoplazmasında Bcl-2 immünpozitifliğinde bir artış gözlemlendi. Melittin uygulanan grupta (M) Zn grubuna kıyasla artmış Bcl-2 immünpozitifliği gözlemlendi. ZnM uygulanan grupta melittin uygulanan gruba (M) kıyasla Bcl-2 immünpozitifliğinde bir azalma gözlemlendi. HBO grubunda Bcl-2 immünpozitifliği gösteren apoptotik hücrelerde bir azalma ile birlikte nekrotik karakterli hücre sayısında bir artış gözlemlendi. ZnHBO grubunda Bcl-2 immünpozitifliği azalmış olarak gözlemlendi. MHBO grubunda apoptotik hücrelerde Bcl-2 immünpozitifliği azalmış olmakla birlikte nekrotik karakterli hücre sayısında bir artış gözlemlendi. Son olarak, ZnMHBO grubunda ise Bcl-2 immünpozitifliğinde belirgin bir artış olmamakla birlikte apoptotik ve nekrotik karakterli hücreler de gözlemlendi.



Şekil 4.9: Bcl-2 immunositokimyasal boyama yapılan gruplara ait görüntüler.

★: apoptik, ▲: nekroz, *: hücre bölünmesi. İmmunboyama: Streptavidin Biotin Peroksidaz yöntemi.

Bax immunositokimyasal boyama görüntüleri Şekil 4.8 ve Bcl-8 immunositokimyasal boyama görüntüleri ise Şekil 4.9’da verilirken her görüntüde 20µm’lik bir ölçek kullanıldı. Görüntülerin üzerinde “★” sembolü ile apoptoz, “▲” sembolü ile nekroz ve “*” sembolü ile hücre bölünmesi olan hücreler gösterildi.

Tablo 4.11: Bax ve Bcl-2 immunopozitifliklerinin değerlendirilmesi.

Gruplar	Bax immunopozitifliği	Bcl-2 immunopozitifliği
Kontrol	-	-
Zn	+	+
M	+ / ++	++ / +++
ZnM	++	++
HBO	+ / ++	+
ZnHBO	- / +	- / +
MHBO	- / +	- / +
ZnMHBO	- / +	- / +
(-: boyanma yok, -/+ : hafif boyanma, +: immunopozitif, ++: yoğun immunopozitiflik)		

Bax ve Bcl-2 immunopozitifliklerinin her grup için değerlendirilmesinde bir tablo oluşturuldu (Tablo 4.11). Bu tabloda “-” sembolü immun boyanmanın olmadığını; “-/+” sembolü hafif miktarda immun boyamanın olduğunu; “+” sembolü immunopozitifliğin olduğunu ve “++” sembolü ise yoğun miktarda immunopozitiflik olduğunu ifade etmektedir. Her gruptaki Bax ve Bcl-2 immunositokimyasal boyama işlemlerinden elde edilen hücresel görüntülerden (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) yararlanarak immunopozitifliklerini değerlendirmek üzere derecelendirildi.

5. TARTIŞMA

Kanser hücreleri, hücre büyümesi ve çoğalmasını denetleyen mekanizmalardan kaçarak kontrolsüzce çoğalır. Dolayısıyla kanser hücreleri DNA yapılarında mutasyona uğramış olmalarına rağmen özellikle programlı hücre ölümü olarak ifade edilen apoptoz mekanizmasından kaçarlar. Bir çok bilim insanı, kanser hücrelerinde apoptoz mekanizmalarını aktive edebilen ya da kanser tedavilerinde radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarının etkisini artırabilen maddeler ve uygulamalar üzerinde çalışmalar yapmaktadır. Bazı tedavi yöntemleri tek başına olumlu etki oluşturmazken ya da etkisi az iken farklı uygulamalar ile kombinasyon halinde kullanılmasında tedavi etkileri artabilmektedir. Diğer yandan kanser hücrelerine uygulanacak olan madde ya da tedavi yönteminin farklı dozlarda ve sürelerde uygulanması tedaviye verilen cevabı değiştirebilir. Ayrıca kanser türü de tedavi yönteminin belirlenmesinde önemli bir faktördür. Özellikle çinko eser elementi, organizmada protein sentezinden yara iyileşmesine kadar bir çok süreçte önemli rol oynamasına rağmen kanser hücreleri üzerindeki davranışı hala net bir şekilde açıklanamadı. Bunun nedeni çinko elementinin kanser hücresine uygulanan doz miktarı, uygulama süresi ve kanser türüne göre farklı etki oluşturmastır. Çinko, Lie ve arkadaşlarının çalışmasında [15] pankreas kanserinde anti-apoptotik etki oluştururken Donadelli ve arkadaşlarının çalışmasında [14] pankreas kanserinde, Ding ve arkadaşlarının çalışmasında [16] ise yumurtalık kanserinde apoptozu artırıcı bir etkiye neden olduğu ileri sürülmüştür. Diğer yandan arı zehrinin yaklaşık yarısını oluşturan melittin peptiti, hücre membranının kimyasal ve fiziksel olarak yapısının bozulmasına neden olarak membran geçirgenliğini artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle melittin hem doğrudan kanser hücresinin yapısını bozarak hem de dolaylı yoldan kanser hücresinin membran geçirgenliğini artırarak farklı moleküllerin etkisini artırabilir veya azaltabilir. Bu yüzden melittin peptiti, anti-kanser bir ajan olarak kanser çalışmalarında oldukça dikkat çeken bir moleküldür. Çinko elementi ve melittin peptiti dışında bir çok hastalığın tedavisinde kullanılan bir uygulama olan hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi ise hem yüksek basınç hem de oksijen uygulaması ile hücresel boyutta fizikokimyasal etkilerin oluşmasına sebep olabilir. Çinko ve melittin madde uygulamaları ile HBO uygulamasının hem tek tek hem de beraber uygulanmaları durumunda moleküler düzeyde kanser hücreleri üzerinde meydana getirdikleri değişimler olası tedavi yöntemlerine önemli derecede fayda sağlayacağına inanılmaktadır. Bu nedenle tez çalışmamızın amacı, oldukça sık

görülen bir kanser türü olan A549 akciğer kanseri hücreleri üzerinde çinko elementi, melittin peptiti ve HBO uygulamasının hem tek tek hem de kombinasyonlar halinde Raman spektroskopisi ile moleküler düzeyde meydana getirdikleri değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

A549 akciğer kanseri hücrelerinde yaptığımız 61 μM ZnCl_2 , 4,571 $\mu\text{g/mL}$ melittin peptiti ve 1 saatlik HBO uygulamaları sonucunda elde ettiğimiz raman spektroskopisi analiz sonuçlarımızda 828 cm^{-1} , 920 cm^{-1} , 980 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} , 1697 cm^{-1} ve 1788 cm^{-1} değerlerinde raman şiddetine katkı sağlayan pikler elde edildi. Bu elde ettiğimiz piklerin her biri biyolojik yapıda amino asitlerden bağ yapılarına kadar bir çok yapıyı temsil eden karakteristik değerlerdir. Ruiz-Chica ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış olduğu çalışma sonucunda 828 cm^{-1} raman kayması değerinin biyolojik bir yapıda fosfodiester bağlarını temsil ettiği gösterilmiştir [122]. Fosfodiester bağı, kovalent bir bağıdır ve nükleotidlerin polimerleşmesinde bir nükleotidin 5' fosfatı ile bir diğerinin 3' hidroksil grubu arasında kurulur. Ayrıca bilindiği üzere hücrenin bilgi molekülleri olan DNA ve RNA, birer nükleotid polimerleridir. Dolayısıyla, fosfodiester bağlarının varlığı bize dolaylı yoldan DNA ve RNA hakkında da bilgi verebilir. Çalışmamızın raman spektroskopisi analiz sonuçlarında fosfodiester bağlarını temsil eden 828 cm^{-1} değerinde normalize raman şiddetine katkısının Kontrol grubunda en fazla olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu durum, Kontrol grubundaki hücrelerde fosfodiester bağlarının bozulmadığını gösterir. Benzer şekilde, sadece Zn uygulanmış olan gruptaki (Zn) hücrelerde de 828 cm^{-1} değerinde yüksek raman şiddeti tespit ettik. Ancak Kontrol grubu ile Zn grubu arasında 828 cm^{-1} değerinde fosfodiester bağlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık (Tablo 4.3). Oysa ki matematiksel olarak karşılaştırıldığında Kontrol grubunda fosfodiester bağlarından gelen raman şiddeti, Zn grubundakinden çok daha yüksektir. Fakat bu matematiksel fark istatistiksel olarak anlam yaratacak kadar değildir. Hiç bir uygulamanın yapılmadığı Kontrol grubunda fosfodiester bağlarının daha iyi durumda olduğunu gösterir ki bu da biyolojik olarak beklenen bir durumdur. Ayrıca, sonuçlarımız uyguladığımız Zn dozunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fosfodiester bağlarını kıramadığını ve dolayısıyla kanser hücrelerinin DNA ve RNA yapısında büyük bir hasar oluşturmadığını gösterir. Diğer yandan, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Zn grubu fosfodiester bağlarına Kontrol grubundan daha az katkı sağladığı için Zn elementinin az da olsa hasar oluşturmaya başladığı görüşündeyiz. Melittin uyguladığımız gruptaki hücrelerde ise ciddi oranda fosfodiester bağlarının kırıldığı ve bu nedenle raman şiddetine katkı sağlayamadığını tespit ettik. Zn ve melittin beraber uygulandığında (ZnM grubunda) çinko

elementinin melittinin etkisini artırdığı ve A549 hücrelerinde fosfodiester bağları üzerinde beraber daha etkili olduklarını elde ettik. HBO uygulamasının, hücrelerdeki fosfodiester bağlarını kırabildiği ve fosfodiester bağları üzerine etkisinin melittin ile yaklaşık olarak aynı düzeyde olduğunu gördük. Fakat tüm gruplar arasında melittin ile HBO uygulaması beraber yapıldığında (MHBO grubu) istatistiksel olarak çok daha anlamlı bir etkisi olduğunu tespit ettik. MHBO grubundaki fosfodiester bağları üzerindeki etkiye en yakın etkiyi ZnMHBO grubundaki hücrelerde de gördük. Fosfodiester bağları için ZnMHBO grubundaki hücrelerde, MHBO grubundan daha az raman şiddeti değeri elde etmemizin nedeni Zn elementinin antioksidan özelliğinden kaynaklandığı görüşündeyiz. Çalışmamız sonucunda diğer gruplara kıyasla MHBO grubundaki hücrelerin fosfodiester bağlarından daha az raman şiddeti elde ettiğimiz için A549 kanser hücreleri üzerinde hem melittin hem de HBO uygulamasının fosfodiester bağları ve dolayısıyla DNA ve RNA yapıları üzerinde daha etkili hasara neden olabileceği görüşündeyiz.

Stone ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada raman spektrumunda 920 cm^{-1} değerinin glikoz hakkında bilgi verdiğini belirtmişler [123]. Bilindiği üzere, glikoz 6 adet karbon atomu ve 1 adet aldehit grubuna sahip olan monosakkarit yapıda bir karbonhidrattır. Ayrıca hücresel solunumda glikoz oldukça önemlidir. Kanser hücrelerinde ise glikozun ayrı bir yeri vardır. Çünkü kanser hücreleri hızlı büyüme ve çoğalma için ihtiyaç duydukları fazla enerjiyi glikozu aerobik ortamda laktada dönüştürerek sağlar. Dolayısıyla kanser hücreleri artan glikoz alımı eğilimindedir. Çalışmamızın raman analizi sonucunda, 920 cm^{-1} pikinde Kontrol ve Zn grubundaki hücrelerden daha kuvvetli bir raman şiddeti tespit edildi. Bu durum, Kontrol ve Zn grubundaki kanser hücrelerinin glikoz miktarının diğer gruplara göre daha fazla olmasından kaynaklanabilir. Diğer taraftan, M grubundan tespit edilen raman şiddeti daha azdır. Çünkü melittin uygulaması hücrelerde glikoz miktarının azalmasına neden olmuştur. Bu durumda melittin glikoz molekülünün parçalanmasına neden olmuş olabilir ya da melittin tarafından uğradığı hasarın onarımı için hücre daha fazla glikoz kullanarak bu durumu onarma enerjisini elde etmeye çalışmış olabilir. ZnM grubu ile M grubu; ZnHBO grubu ile HBO grubu; ZnMHBO grubu ile MHBO grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı (Tablo 4.4). Dolayısıyla ZnM, ZnHBO ve ZnMHBO gruplarındaki hücrelerde oluşan etkinin büyük miktarını melittin ve HBO uygulamaları neden olmuştur. MHBO grubundaki hücreler raman şiddetine en az katkı sağlayan gruptur. Dolayısıyla MHBO grubundaki hücrelerde glikoz daha az miktardadır. Melittin ve HBO beraber uygulanması durumunda tek tek oluşturdukları yıkıcı etkiyi daha da artırdıkları ve hücrenin glikoz miktarının

azalmasına neden olduğunu söyleyebiliriz. Kanser hücresinin glikoz miktarının azalması sonucu hücre çoğalması ve büyümesi için ihtiyacı olan enerjiyi sağlayamamasına neden olur. Dolayısıyla, melittin ve HBO uygulama kombinasyonunun kanser hücresinin gelişimini engellediği görüşündeyiz.

Proteinler, hücrelerde en çok bulunan makro moleküller olup yaklaşık 22 adet bilinen amino asitin belirli sıra ve sayıda dizilimi ile oluşurlar. Proteinlerin konformasyonu dört yapıda gerçekleşir. Proteinlerin birinci yapısı amino asitlerin peptit bağları ile oluşturduğu polipeptit zincirlerdir. İkinci yapısında ise oluşan polipeptit zincirlerinin bükülüp kırılması ile α -sarmal ve β -konformasyon yapıları oluşur. Bu oluşan yapıların farklı katlanmalarıyla van der Waals ve iyonik bağlar gibi moleküler bağların oluşması sonucunda üç boyutlu, tam konformasyonlu ve yoğunlaşmış protein molekülü meydana gelir. Bu yapıya proteinlerin üçüncü yapısı denir. Birinci, ikinci ve üçüncü yapıya sahip olan polipeptit zincirlerinin bir araya gelerek çok daha büyük bir yapı oluşturmaya proteinin dördüncü yapısı denir. Her proteinin dördüncü yapısı olmak zorunda değildir; fakat molekül ağırlığı yaklaşık olarak 100.000 Da'dan büyük olan proteinler dördüncü yapıdadır. Proteinler yapılarındaki bu konformasyonlar sayesinde çeşitlilik ve görevlerinde fonksiyonellik kazanırlar. Dolayısıyla dördüncü yapıdaki bir proteinin yapısının bozulması sonucu üçüncü yapı haline gelmesi durumunda fonksiyonları da değişir. Çalışmamızda A549 kanser hücreleri üzerinde raman spektroskopi analizlerimiz sonucunda moleküler düzeyde elde ettiğimiz farklılıklardan biri de 980 cm^{-1} raman kayması değerinde oluşan şiddetli raman pikleridir. Notingham ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [124], 980 cm^{-1} raman kayması proteinin ikinci yapılarından biri olan β -konformasyon yapısını karakterize ettiği belirtilmiştir. Çalışmamızda 980 cm^{-1} değerinde, Kontrol ve Zn grubundaki hücrelerden diğer gruplara kıyasla oldukça düşük raman şiddetleri tespit edildi. Kontrol grubu ile diğer gruplardaki hücrelerden elde edilen raman şiddeti değerleri karşılaştırıldığında yaptığımız uygulamaların hücrelerdeki proteinlerin ikinci yapıya kadar bozulmuş olabileceğini gösterir. Proteinin ikinci yapılarından biri olan β -konformasyon yapısından en fazla raman şiddeti M grubundaki hücrelerden tespit edildi. Melittin uygulaması sonucunda M grubundaki hücrelerin protein yapıları daha fazla deforme olup, bu nedenle β -konformasyon yapısından daha kuvvetli bir pik elde edildiği görüşündeyiz. Benzer bir durumda HBO grubundaki hücrelerde de görüldü. Fakat HBO ve melittinin beraber uygulandığı MHBO grubundan elde edilen raman şiddeti HBO ve M grubundan daha azdır. Benzer şekilde HBO ve Zn elementinin beraber uygulandığı ZnHBO grubu HBO grubundan daha az raman şiddeti tespit edildi. Zn elementinin

uygulanması HBO uygulamasının etkisini azalttığı söylenebilir. Zn elementi ile melittin uygulamasının HBO üzerine etkisi kıyaslanacak olursa çinkonun kullanımı istatistiksel olarak bir fark yaratmazken (Tablo 4.5), melittin kullanımı istatistiksel olarak anlamlı oranda HBO etkisini azalttığı bulundu ($p<0,001$). Benzer şekilde, melittin tek başına çok daha etkiliyken HBO uygulaması melittinin etkisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmıştır ($p<0,05$). Dolayısıyla, çalışmamız sonucunda moleküler düzeyde β -konformasyon yapısı en fazla M grubunda tespit edilmiştir.

Proteinlerde, amino asitlerin en önemli reaksiyonu peptit bağlarının oluşmasıdır. Bir amino asidin karboksil grubu ile diğer bir amino asidin amino grubu arasında reaksiyon sonucunda suyun serbest bırakılması ile peptit bağı oluşur. Bu peptit bağı ile diğer bir ifadeyle amid bağı ya da amid yapısı oluşur. Amidler en kararlı asit türevi yapılardır. Amid yapıları, karbonil grubundaki karbon atomuna doğrudan bağlı bir nitrojen içerir. Dolayısıyla bu kararlılık durumu kısmen nitrojen üzerindeki bağlanmayan elektronlar ile karbonil grubu arasındaki güçlü etkileşimden kaynaklanır. Amidlerden elde edilen spektrumlar yapıdaki N-H deformasyonları, N-H ve C=O gerilmeleri ve amid bantları olarak ifade edilen Amid I, Amid II ve Amid III gibi karışık titreşimler nedeniyle olur. Amid I bandı, biyolojik yapıdaki C=O grubunun gerilmesinden kaynaklanır. Amid II bandı ise esas olarak birincil amidlerdeki NH_2 deformasyonundan gelir. Son olarak Amid III bandı, ikincil amidlerde N-H bükülmesi ve C-N gerilmesinin katıldığı karışık bir titreşiminden kaynaklanır. Dolayısıyla amidlerin spektrumları, protein ve polipeptit yapıları için oldukça önemlidir. Çalışmamızda raman spektrumu sonuçlarında 1697 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} ve 1224 cm^{-1} değerlerinde şiddetli raman pikleri görüldü. Lakshimi ve arkadaşlarının çalışmasında 1697 cm^{-1} Amid I bandını ve 1224 cm^{-1} Amid III bandını temsil ettiğini ifade etmişler [125]. R.K. Dukor'un çalışmasında ise 1544 cm^{-1} değerinin Amid II bandını temsil ettiği tespit edilmiştir [127]. Amid I, II ve III bantları, protein yapısı hakkında oldukça detaylı bilgi verir. Çalışmamızda, Amid I, II ve III bantlarından elde edilen raman şiddetlerine bakıldığında her üçünde de Kontrol grubundaki hücrelerden elde ettiğimiz raman şiddetleri diğer gruplardakinden daha azdır. Kontrol ve Zn grubu karşılaştırıldığında çinko uygulaması amid bantlarına etkisi var ama bu istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 4.6, Tablo 4.8, Tablo 4.9). Amid I, II ve III bantları için en yüksek raman şiddeti, melittin uyguladığımız M grubunda elde edildi ($p<0,001$). Çinko uygulaması melittinin etkisini azaltırken; benzer şekilde HBO uygulamasının tek başına olan etkisini de azaltır. M grubu ile MHBO karşılaştırıldığında tek başına melittinin etkisi HBO uygulamasından daha yüksektir. Bu durum istatistiksel olarak da anlamlı düzeydedir (Amid I için $p<0,001$; Amid II ve III için

$p < 0,01$). Zn, melittin ve HBO uygulamasının beraber yapılması durumunda ZnMHBO grubunu sadece melittin uygulanan M grubu ile karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak sadece Amid III bandında $p < 0,05$ düzeyinde bir fark elde edildi. Dolayısıyla M grubundaki hücrelerin protein yapısından N-H bükülmesi, C-N gerilmesi, C=O gerilmesinin ve NH_2 deformasyonunun daha fazla raman şiddetine katkı sağladığını söyleyebiliriz.

Proteinlerin birincil yapısını oluşturan amino asitlerden biri olan triptofan insan vücudunda sentezlenemediği için dışardan alınan esansiyel amino asitler grubundadır. Shetty ve arkadaşları çalışmaları sonucunda 1360 cm^{-1} değerinin biyolojik yapılarda triptofan amino asit yapısını belirttiği sonucuna varmıştır [126]. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz raman spektrumunda 1360 cm^{-1} değerine Kontrol ve Zn grubundaki hücrelerden daha az raman şiddeti elde ederken sırasıyla M grubundan, HBO grubundan ve ZnHBO grubundan daha fazla raman şiddeti tespit ettik. Matematiksel olarak raman şiddetine en fazla katkıyı M grubundaki hücrelerden elde edilmiş olsada M, HBO ve ZnHBO grupları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark yoktur (Tablo 4.7). MHBO ve ZnMHBO gruplarında benzer etkiye sahiptir. Fakat MHBO ve ZnMHBO grupları, M ve HBO grubundan 1360 cm^{-1} değerinde raman şiddetine daha az katkı sağlamıştır. Dolayısıyla triptofan amino asit düzeyi M, HBO ve ZnHBO gruplarında daha fazladır. Triptofan düzeyi, akciğer kanseri hastalarında yapılan çalışmalarda, dolaşım ve tümör dokusunda düşük miktarda tespit edilmiştir [129, 130]. Bu duruma kanser hastalarında, triptofanı metabolize edici enzimlerin ekspresyonu ve aktivitesinde artışın neden olabileceği öne sürülmüştür. Triptofan, hücre iskeleti ve protein sentezi için temel bir bileşen olduğu için oldukça önemlidir. Dolayısıyla çalışmamızda Kontrol grubunda hiç bir uygulama yapmadığımız akciğer kanseri hücrelerinde triptofan miktarını diğer gruplara kıyasladığımızda daha düşük tespit ettik. Çalışmamız sonucunda yaptığımız uygulamaların kanser hücrelerini olumsuz etkilemesinden dolayı sayılarında oluşabilecek azalma ya da hücresel tedavi sürecinden dolayı triptofan miktarında artışa neden olduğu ve kanser hücrelerinde triptofan metabolizmasına etki ettiğini gösterdik.

Son olarak, çalışmamızdan elde ettiğimiz raman spektrumunda 1788 cm^{-1} değerinde bir pik tespit edildi. 2016 yılında Mark Fields'ın doktora tez çalışmasında 1788 cm^{-1} değerinin biyolojik yapılarda karboksilik asit yapısı temsil ettiği belirtilmiştir [128]. Karboksilik asit, bir organik bileşiktir ve C=O gerilim titreşimini yansıtan önemli bir fonksiyonel gruptur. İnsan oral epitel hücreleri üzerine yapılan bir çalışma kısa zincirli karboksilik asitlerin düşük konsantrasyonlarda hücre büyümesini baskımlarken yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümüne

yol açtığı belirtilmiş [131]. Bu çalışma ile paralel olarak çalışmamızda karboksilik asit bandında raman şiddeti Kontrol grubundaki hücrelerde diğer gruplara oranlar daha azdır. Zn grubu ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark olmamasına rağmen raman şiddetine baktığımızda Zn grubu Kontrol grubundan daha fazla karboksilik asit içermektedir. Bu durumda çinko elementinin tam olarak hücreleri apoptoza götürecektir miktarda olmadığını gösterir. Diğer yandan melittin uygulaması yerine HBO uygulaması karboksilik asit bandında raman şiddetine en fazla katkı sağlayan gruptur. Fakat istatistiksel olarak M grubu ile HBO grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4.10). HBO grubunun diğer MHBO ve ZnMHBO grupları ile kıyasladığımızda ise istatistiksel olarak $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı farklılık bulundu. HBO grubundaki hücrelerde MHBO ve ZnMHBO grubundakilere oranla daha fazla karboksilik asitin olduğunu tespit ettik. Dolayısıyla HBO grubundaki hücrelerin daha fazla ölüme uğradıklarını ve HBO uygulamasının tek başına daha etkili olduğunu düşünebiliriz.

Çinko, melittin ve HBO uyguladığımız A549 akciğer kanseri hücrelerindeki değişimleri raman spektroskopi analizi ile yaptığımız moleküler inceleme dışında yapmış olduğumuz immunositokimyasal analiz sonuçlarımıza baktığımızda, çinko uygulamasında apoptotik hücreler görülse de raman spektroskopisi ile moleküler incelemelerde tek başına özellikle hücrenin protein yapısında yüksek bir etkiye sahip değildir. Melittin ve HBO uygulamaları protein yapıları ve kanser hücre metabolizmasına da etki ettiği gibi beraber uygulandıklarında (MHBO) apoptotik hücreler dışında nekrotik hücreler de tespit ettik. İmmunopozitifliklerinin ise M ve HBO gruplarının tek tek uygulanmaları durumunda çok daha yoğun olduğunu gördük (Tablo 4.11). Apoptoz sinyalleri hücrede verilmeye başlandığında artık geri dönüşü olmayan bir yola girilir ve hücre ölümü gerçekleşir. Nekroz süreci apoptoz sürecine kıyasla durdurulabilir ve hücre ölümden kaçabilir. Fakat nekrotik ve apoptotik hücrelerle karşılaşmış olmamız uygulamaların hücreleri ölüme götürdüğünün bir kanıtı olarak düşünebiliriz. Çalışmamızda her uygulama benzer etkiyi göstermemektedir. Bu nedenle çalışmamızdaki tek tek ve beraber olan uygulamaların hem moleküler boyutta hem de apoptoz ve nekroz süreçlerine etkileri açısından baktığımızda melittin ve HBO uygulamalarının beraber yapıldığı MHBO grubu akciğer kanser hücrelerinin tedavisinde oldukça başarılı bir sonuç vermiş olduğu kanısındayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, A549 akciğer kanseri hücreleri üzerine uyguladığımız Zn miktarı hücre ölümüne veya hücre metabolizmayı etkileyecek protein, glikoz, fosfodiester bağları ve karboksilik asit gibi yapılarda çok fazla etkili olmadığını ve melittin ile HBO uygulamalarının etkisini de azaltabildiğini tespit ettik. Zn elementinin uyguladığımız 61 μM miktarında ve 48 saatlik inkübasyon süresinde antioksidan bir etki oluşturduğunu ve bu nedenle A549 hücreleri üzerinde yıkıcı bir etki oluşturamadığı görüşündeyiz. Fakat melittin ve HBO uygulamalarına bakıldığında tek tek etkili oldukları gibi beraber uygulandıkları takdirde kanser hücrelerinin yapısını ve metabolizmalarını bozan etkilere sahip olduklarını tespit ettik. Dolayısıyla 4,571 $\mu\text{g/mL}$ miktarında ve 48 saat inkübasyon ile melittin uygulamasının ve 1 saat HBO uygulamasının A549 hücrelerini hem apoptotoza hem de nekroza götürdüğünü hücre morfolojilerine baktığımızda gözlemledik. Ayrıca moleküler incelemelerde özellikle fosfodiester bağlarında ve glikoz metabolizmasında HBO ve melittinin beraber uygulanmasının kanser hücrelerini olumsuz etkilediğini belirledik. Zn, melittin ve HBO uygulamasının beraber yapılması kanser hücrelerinde moleküler yapıları ve kanser hücre metabolizması üzerine MHBO kadar olmasa da etkili olduğu sonucuna vardık. Zn uygulamasının tek başına değil de melittin ve HBO uygulaması ile beraber yapılması durumunda kanseri tedavi edici etkiye sahip olduğunu tespit ettik.

Çalışmamızda uygulanan doz miktarları, inkübasyon süreleri ve uygulama sürelerine göre melittin peptiti ve hiperbarik oksijen uygulamasının beraber yapılması sonucunda akciğer kanserinin tedavisinde oldukça umut verici bir gelişme sağlayacağı görüşündeyiz.

Öneriler:

Akciğer kanserinin en yaygın çeşidi olan A549 hücreleri üzerinde moleküler düzeyde elde ettiğimiz bu veriler ışığında ilerleyen çalışmalarda melittin ve HBO uygulamalarının deney hayvanları üzerinde yapılmasının tüm metabolizmanın tedaviye yanıtını değerlendirmek açısından önemli olacağı ve çinko elementinin dozunun kademeli olarak artırılarak tedaviye verdiği yanıtın takibinin yapılmasının, hangi doza kadar tedavi edici hangi doz miktarından

sonra tedaviyi olumsuz etkilediğinin belirlenmesi açısından ilerleyen çalışmaların planlanmasının literatürdeki eksikliği tamamlayabileceği görüşündeyiz.



KAYNAKLAR

- [1]. Todd, R., Wong, D.T., 1999, Oncogenes, *Anticancer Research*, 19(6A), 4729-4746.
- [2]. Yılmaz, H.H., Yazıhan, N., Tunca, D., Sevinc, A., Özen Olcayto, E., Özgül, N., Tuncer, M., 2011, Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 41(1), 10-16.
- [3]. Speit, G., Bonzheim, I., 2003, Genotoxic and protective effects of hyperbaric oxygen in A549 lung cell, *Mutagenesis*, 18(6), 545-548.
- [4]. Hanna, J.M., Onaitis, M.W., 2013, Cell of origin of lung cancer, *Journal of Carcinogenesis*, 12: 6.
- [5]. Brahimi Horn, M.C., Pouyssegur, J., 2007, Oxygen, a source of life and stress, *FEBS Letters*, 581, 3582-3591.
- [6]. Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessupet, J.M., Vantuinen, P., Ledbetter D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R., Vogelstein, B., 1989, Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas, *Science*, 244, 217-221.
- [7]. Brizel, D.M., Scully, S.P., Harrelson, J.M., Layfield, L.J., Bean, J.M., Prosnitz, L.R., Dewhirst, M.W., 1996, Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma, *Cancer Research*, 56(5), 941-943.
- [8]. Daruwalla, J., Christophi, C., 2006, Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: A review, *World Journal of Surgery*, 30, 2112-2131.
- [9]. Hammarlund, C., 2002, *The Physiologic effects of hyperbaric oxygenation*, Hyperbaric medicine practice, In: Kindwall, E.P., Whelan, H.T., (eds.), Best Publishing Company, USA, 37-68.
- [10]. Tibbles, P.M., Edelsberg, J.S., 1996, Hyperbaric-oxygen therapy, *The New England Journal of Medicine*, 334, 1642-1648.
- [11]. Çakkalkurt, A., 2012, *Hiperbarik oksijen uygulamasının meme kanseri hücre kültürü üzerine etkileri*, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- [12]. Gajski, G., Garaj Vrhovac., V., 2013, Melittin: A lytic peptide with anticancer properties, *Environmental Toxicology Pharmacology*, 36(2), 697-705.
- [13]. Lee, C., Bae, S.J.S., Joo, H., Bae, H., 2017, Melittin suppresses tumor progression by regulating tumor associated macrophages in a Lewis lung carcinoma mouse model, *Oncotarget*, 8(33), 54951-54965.
- [14]. Donadelli, M., Dalla, P.E., Scupoli, M.T., 2009, Costanzo, C., Scarpa, A., Palmieri, M., Intracellular zinc increase inhibits p53(-/-) pancreatic adenocarcinoma cell growth by ROS/AIF mediated apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(2), 273-280.
- [15]. Li, M., Zhang, Y., Liu, Z., Bharadwaj, U., Wang, H., Wang, X., Zhang, S., Liuzzi, J.P., Chang, S.M., Cousins. R.J., Fisher, W.E., Brunicardi, F.C., Logsdon, C.D., Chen, C., Yao, Q., 2007, Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18636-18641.
- [16]. Ding, W.Q., Yu, H.J., Lind, S.E., 2008, Zinc-binding compounds induce cancer cell death via distinct modes of action. *Cancer Letters*, 271, 251-259.
- [17]. Kaya, S., 2012, *Biyoelementler*, Biyokimya Ders Kitabı, In: Burçak, G. (ed.), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul, Türkiye, 843-870.

- [18]. Mertz, W., 1981, The essential trace elements, *Science*, 213(4514), 1332-1338.
- [19]. Franklin, R.B., Costello, L.C., 2009, The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers, *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(5), 750-757.
- [20]. Wang, Y., Qi, Y., Wei, X., Chen, S., Jia, N., Zhou, Q., Zhang, S., Gui, S., Wang, Y., 2018, Hyperbaric oxygen rescues lung cancer cells from chemical hypoxia-induced low differentiation and apoptosis resistance, *Experimental Lung Research*, 44(8-9), 417-423.
- [21]. Liu, S., Yu, M., He, Y., Xiao, L., Wang, F., Song, C., Sun, S., Ling, C., Xu, Z., 2008, Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway, *Hepatology*, 47(6), 1964-1973.
- [22]. Ceremuga, M., Stela, M., Janik, E., Gorniak, L., Synowiec, E., Sliwinski, T., Sitarek, P., Saluk Bijak, J., Bijak, M., 2020, Melittin-A natural peptide from bee venom which induces apoptosis in human leukaemia cells, *Biomolecules*, 10(2), 247.
- [23]. Hajdu, S.I., 2011, A note from history: landmarks in history of cancer, part 1, *Cancer*, 117(5), 1097-1102.
- [24]. Dünya Sağlık Örgütü, 2022, *Cancer*, <https://www.who.int/health-topics/#C>, [Ziyaret tarihi: 27.02.2022].
- [25]. Baran, Y., 2021, *Kanser moleküler biyolojisi*, 2nd ed., Hipokrat Kitapevi, ISBN: 9786257399050.
- [26]. Pecorino, L., 2012, *Molecular biology of cancer*, 10th ed., Oxford University Press, United Kingdom, ISBN: 978-0-19-957717-0.
- [27]. Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144(5), 646-674.
- [28]. Berretta, R., Moscato, P., 2010, Cancer biomarker discovery: the entropic hallmark, *PLoS One*, 5(8), 1-44.
- [29]. International Agency for Research on Cancer, *Global cancer observatory: cancer today*, <https://gco.iarc.fr/today>, [Ziyaret tarihi: 20.02.2022].
- [30]. Henley, S.J., Ward, E.M., Scott, S., Ma, J., Anderson, R.N., Firth, A.U., Thomas, C.C., Islami, F., Weir, H.K., Lewis, D.R., Sherman, R.L., Wu, M., Benard, V.B., Richardson, L.C., Jemal, A., Cronin, K., Kohler, B.A., 2020, Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics, *Cancer*, 126(10), 2225-2249.
- [31]. Siegel, R.L., Miller, K.D., Goding Sauer, A., Fedewa, S.A., Butterly, L.F., Anderson, J.C., Cercek, A., Smith, R.A., Jemal, A., 2020, Colorectal cancer statistics, 2020, *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(3), 145-164.
- [32]. Alberg, A.J., Samet, J.M., 2003, Epidemiology of lung cancer, *Chest*, 123(1), 21S-49S.
- [33]. Omenn, G.S., Merchant, J., Boatman, E., Dement, J.M., Kuschner, M., Nicholson, W., Peto, J., Rosenstock, L., 1986, Contribution of environmental fibers to respiratory cancer, *Environmental Health Perspectives*, 70, 51-56.
- [34]. Grulich, A.E., Van Leeuwen, M.T., Falster, M.O., Vajdic, C.M., 2007, Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis, *The Lancet*, 370(9581), 59-67.
- [35]. Matakidou, A., Eisen, T., Houlston, R.S., 2005, Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk, *British Journal of Cancer*, 93(7), 825-833.
- [36]. Herbst, R.S., Heymach, J.V., Lippman, S.M., 2008, Lung cancer, *The New England Journal of Medicine*, 359(13), 1367-1380.
- [37]. Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K., Yatabe, Y., Ishikawa, Y., Wistuba, I., Flieder, D.B., Franklin, W., Gazdar, A., Hasleton, P.S., Henderson, D.W., Kerr, K.M., Nakatani, Y., Petersen, I., Roggli, V., Thunnissen, E.,

- Tsao, M., 2013, Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification, *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137(5), 685-705.
- [38]. Travis, W.D., Brambilla, E., Riely, G.J., 2013, New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials, *Journal of Clinical Oncology*, 31(8), 992-1001.
- [39]. Fujimoto, J., Wistuba, I.I., 2014, Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma, *Seminars in Diagnostic Pathology*, 31(4), 306-313.
- [40]. Motadi, L.R., Misso, N.L., Dlamini, Z., Bhoola, K.D., 2007, Molecular genetic and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: Therapeutic targets, *International Immunopharmacology*, 14, 1934-1947.
- [41]. Reckamp, K.L., 2016, *Lung cancer treatment and research*, Springer, İsviçre, ISBN: 978-3-319-40389-2.
- [42]. Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Garshell, J., Neyman, N., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J., Cronin, K.A., 2013, *SEER cancer statistics review 1975–2010*, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, [Ziyaret tarihi: 07.01.2022].
- [43]. Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K.R., Yatabe, Y., Beer, D.G., Powell, C.A., Riely, G.J., Van Schil, P.E., Garg, K., Austin, J.H., Asamura, H., Rusch, V.W., Hirsch, F.R., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R.M., Ishikawa, Y., Jett, J., Sanchez Cespedes, M., Sculier, J.P., Takahashi, T., Tsuboi, M., Vansteenkiste, J., Wistuba, I., Yang, P.C., Aberle, D., Brambilla, C., Flieder, D., Franklin, W., Gazdar, A., Gould, M., Hasleton, P., Henderson, D., Johnson, B., Johnson, D., Kerr, K., Kuriyama, K., Lee, J.S., Miller, V.A., Petersen, I., Roggli, V., Rosell, R., Saijo, N., Thunnissen, E., Tsao, M., Yankelwitz, D., 2011, International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma, *Journal of Thoracic Oncology*, 6(2), 244-285.
- [44]. Khuder, S.A., 2001, Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis, *Lung Cancer*, 31(2-3), 139-148.
- [45]. Rosai, J., 2007, Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology, *Laboratory Investigation*, 87(5), 403-408.
- [46]. Zhou, C., Wu, Y.L., Chen, G., Liu, X., Zhu, Y., Lu, S., Yin, A.Y., 2015, Beyond: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, phase III study of first-line carboplatin/paclitaxel plus bevacizumab or placebo in Chinese patients with advanced or recurrent nonsquamous non-small-cell lung cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 33(19), 2197-2204.
- [47]. Dela Cruz, C.S., Tanoue, L.T., Matthay, R.A., 2011, Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention, *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 605-644.
- [48]. Shimosato, Y., Suzuki, A., Hashimoto, T., Nishiwaki, Y., Kodama, T., Yoneyama, T., Kameya, T., 1980, Prognostic implications of fibrotic focus (scar) in small peripheral lung cancers, *The American Journal of Surgical Pathology*, 4(4), 365-373.
- [49]. American Type Culture Collection (ATCC), A549, <https://www.atcc.org/products/ccl-185#detailed-product-images>, [Ziyaret tarihi: 25.01.2022].
- [50]. Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P., 1973, In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, *Journal of the National Cancer Institute*, 51: 1417-1423.

- [51]. Güler, A., Kaftanoğlu, O., 1999, Türkiye’deki önemli balarısı (*apis mellifera* l.) ırk ve ekotiplerinin göçer arıcılık koşullarında performanslarının karşılaştırılması, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23(3), 577-581.
- [52]. Bogdanov, S., 2012, Bee venom: Composition, health, medicine, *Bee Product Science*, 1-20.
- [53]. Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., Obeid, D.E., Sabatier, J.M., Fajloun, Z., 2019, Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests, *Molecules*, 24(16), 2997.
- [54]. Derebaşı, E., Cankabal, K.E., 2009, Arı zehirinin kimyasal yapısı ve tıbbi çalışmalarda kullanımı, *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 32-34.
- [55]. Denk, B., Fidan, A.F., 2015, Apis venomunun diabetes mellitus ve pankreas üzerine etkileri, *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 8(2), 51-63.
- [56]. Kelle, İ., 2007, Apiterapi, *Dicle Tıp Dergisi*, 34(4), 311-315.
- [57]. Krell, R., 1996, *Value-added products from beekeeping*, Fao Agricultural Services Bulletin, Roma, İtalya, ISBN 92-5-103819-8.
- [58]. Dotimas, E.M., Hamid, K.R., Hider, R.C., Ragnarsson, U., 1987, Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 911, 285-293.
- [59]. Shipolini, R.A., 1984, *Biochemistry of bee venom*, Handbook of natural toxins, In: Tu, T.A. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 49–85.
- [60]. Hider, R.C., Ragnarsson, U., 1980, A proposal for the structure of apamin, *FEBS Letters*, 111, 189-193.
- [61]. Lariviere, W.R., Melzack, R., 1996, The bee venom test: a new tonic-pain test, *Pain*, 66, 271-277.
- [62]. Terwilliger, T.C., Eisenberg, D., 1982, The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement, *Journal of Biological Chemistry*, 257, 6010-6015.
- [63]. Terwilliger, T.C., Eisenberg, D., 1982, The structure of melittin. II. Interpretation of the structure, *Journal of Biological Chemistry*, 257, 6016-6022.
- [64]. Raghuraman, H., Chattopadhyay, A., 2007, Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions, *Bioscience Reports*, 27, 189-223.
- [65]. Terra, R.M., Guimaraes, J.A., Verli, H., 2007, Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 25, 767-772.
- [66]. Ladokhin, A.S., White, S.H., 1999, Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin, *Journal of Molecular Biology*, 285, 1363-1369.
- [67]. Pan, H., Soman, N.R., Schlesinger, P.H., Lanza, G.M., Wickline, S.A., 2011, Cytolytic peptide nanoparticles (‘NanoBees’) for cancer therapy, *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*, 3, 318-327.
- [68]. Hui, L., Leung, K., Chen, H.M., 2002, The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells, *Anticancer Research*, 22, 2811-2816.
- [69]. Choong, Y.Y., Norli, I., Abdullah, A.Z., Yhaya, M.F., 2016, Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review, *Bioresource Technology*, 209, 369-379.
- [70]. Hardy, G., Menendez, A.M., Manzanares, W., 2009, Trace element supplementation in parenteral nutrition: Pharmacy, posology, and monitoring guidance, *Nutrition*, 25, 1073-1084.

- [71]. Goldhaber, S.B., Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity, 2003, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38, 232-242.
- [72]. Nordberga, M., Nordberg, G.F., 2016, Trace element research-historical and future aspects, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38, 46-52.
- [73]. Klevay, I.M., 1984, *The role of copper, zinc, and other chemical elements in ischemic heart disease*, Metabolism of Trace Elements in Man, Rennert, O.M., Chan, W.Y. (eds.), Developmental Aspects, CRC Press, Boca Raton, FL, 129-157.
- [74]. Hetzel, B.S., Maberly, G.F., Mertz, W., 1986, *Trace elements in human and animal nutrition*, 5th ed., Academic Press, New York, ISBN: 9780124912526.
- [75]. Prasad, A.S., 1978, *Trace elements and iron in human metabolism*, Springer Science and Business Media, New York, ISBN: 978-1-4684-0793-8.
- [76]. Copius Peereboom, J.W., 1985, General aspects of trace elements and health, *The Science of the Total Environment*, 42, 1-27.
- [77]. Reusser, M.E., Mc Carron, D.A., 1994, Micronutrient effects on blood pressure regulation, *Nutrient Review*, 52, 367-375.
- [78]. Aydemir, B., Kıziler, A.R., Onaran, I., Alici, B., Ozkara, H., Akyolcu, M.C., 2006, Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility, *Biological Trace Element Research*, 112, 193-204.
- [79]. Mertz, W., 1981, The essential trace elements, *Science*, 213(4514), 1332-1338.
- [80]. Donma, M.M., Donma, O., Michalke, B., Halbach, S., Nischwitz, V., 2012, *Vitamins, minerals, and metabolic pathways in health and diseases*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, ISBN 978-975-404-890-2.
- [81]. McCarthy, T.J., Zeelie, J.J., Krause, D.J., 1992, The antimicrobial action of zinc ion/antioxidant combinations, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 17(1), 5-11.
- [82]. Solomons, N.W., 1998, Mild human zinc deficiency produces an imbalance between cell-mediated and humoral immunity, *Nutrition Reviews*, 56, 27-28.
- [83]. Prasad, A.S., 1995, Zinc: an overview, *Nutrition*, 11, 93-99.
- [84]. Kambe, T., Hashimoto, A., Fujimoto, S., 2014, Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(17), 3281-3295.
- [85]. Gallerher, M.L., 2011, *The nutrients and their metabolism*, Krause's food and the nutrition care process, In: Mahan, L.K., Escott-Stump, S., Raymond, J.L., Krause, M.V. (eds.), Saunders, United States, 54-128.
- [86]. Tapiero, H., Tew, K.D., 2003, Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57(9), 399-411.
- [87]. John, E., Laskow, T.C., Buchser, W.J., Pitt, B.R., Basse, P.H., Butterfield, L.H., Kalinski, P., Lotze, M.T., 2010, Zinc in innate and adaptive tumor immunity, *Journal of Translational Medicine*, 8:118.
- [88]. Jeong, J., Eidei D.J., 2013, The SLC39 family of zinc transporters, *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 612-619.
- [89]. Bae, S.N., Lee, Y.S., Kim, M.Y., Kim, J.D., Park, L.O., 2006, Antiproliferative and apoptotic effects of zinc-citrate compound (CIZAR(R)) on human epithelial ovarian cancer cell line, OVCAR-3, *Gynecologic Oncology*, 103, 127-136.
- [90]. Ostrakhovitch, E.A., Cherian, M.G., 2005, Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells, *Apoptosis*, 10, 111-121.

- [91]. Provinciali, M., DiStefano, G., Fabris, N., 1995, Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes, *International Journal of Immunopharmacology*, 17, 735-744.
- [92]. Sheridan, R.L., Shank, E.S., 1999, Hyperbaric oxygen treatment, *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 47(2), 426-435.
- [93]. Jain, K.K., 2017, *History of hyperbaric medicine*, Text book of hyperbaric medicine, In: Jain, K.K. (ed.), Springer, 3-9.
- [94]. Topal, T., Korkmaz, A., 2008, Hiperbarik oksijen tedavisi, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 28(2), 206-216.
- [95]. Çimşit, M., 2009, *Basınç odaları*, Hiperbarik tıp, In: Çimşit, M. (ed.), Eflatun Yayınevi, Ankara, 13-22.
- [96]. Jain, K.K., 2017, *Hyperbaric chambers: Equipment, technique, and safety*, Textbook of hyperbaric medicine, In: Jain, K.K. (ed.), Springer, 61-78.
- [97]. Kemmer A, Claus, M., Mathieu, D., 2006, *Patient management*, Handbook on hyperbaric medicine, In: Mathieu, D. (ed.), Springer, Netherland, 651-669.
- [98]. Ozan, F., Altay, T., Kayalı, C., 2017, Hiperbarik oksijen tedavisi, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Derigisi*, 16, 187-195.
- [99]. Leach, R.M., Rees, P.J., Wilmshurst, P., 1998, Hyperbaric oxygen therapy, *BMJ*, 317, 1140.
- [100]. Nylander, G., Lewis, D., Nordström, H., Larsson, J., 1985, Reduction of postischemic edema with hyperbaric oxygen, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 76(4), 596-603.
- [101]. Gill, A.L., Bell, C.N., 2004, Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes, *QJM*, 97(7), 385-395.
- [102]. Pace, N., Strajman, E., Walker, E.L., 1950, Acceleration of carbonmonoxide elimination in man by high pressure oxygen. *Science*, 111(2894), 652-654.
- [103]. Wattel, F., Mathieu, D., Nevriere, R., Bocquillon, N., 1998, Acute peripheral ischemia and compartment syndromes: a role for hyperbaric oxygenation, *Anaesthesia*, 53, Suppl 2, 63-65.
- [104]. Kaye, D., 1967, Effect of hyperbaric oxygen on clostridia in vitro and in vivo, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 124(2), 360-366.
- [105]. Knighton, D.R., Fiegel, V.D., Halverson, T., Schneider, S., Brown, T., Wells, C.L., 1990, Oxygen as an antibiotic: The effect of inspired oxygen on bacterial clearance, *Archives of Surgery*, 125, 97-100.
- [106]. Forman, H.J., Thomas, M.J., 1986, Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes, *Annual Review of Physiology*, 48, 669-680.
- [107]. Kindwall, E.P., 1994, *Hyperbaric medicine practice*, 2nd ed., Best Publishing Co., Arizona, ISBN: 9780941332293.
- [108]. Mathieu, D., 2006, *Handbook on hyperbaric medicine*, Springer Dordrecht, Netherlands, ISBN: 978-1-4020-4376-5.
- [109]. Canarslan Demir, K., 2021, *Hiperbarik oksijen tedavisinin diyabetik hastalarda kardiyovasküler etkisinin analizi*, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi.
- [110]. Bulutlar, E., 2019, *Deneyisel over torsiyonu sonrasi detorsiyon uygulanan ratlarda iskemi ve reperfüzyon hasari üzerine hiperbarik oksijen tedavisinin etkinliğinin değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- [111]. Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C., 2018, *Robbins basic pathology*, 10th ed., Elsevier, Philadelphia, ISBN: 978-0-323-35317-5.

- [112]. Cooper, G.M., 2016, *The cell: a molecular approach*, 7th ed., Sinauer Associates, ISBN: 978-1-60535-290-9.
- [113]. Artun, F.T., 2018, *Bazi bitki ekstrelerinin in vitro antikanser ve apoptotik aktivitelerinin değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- [114]. Chaabane, W., User, S.D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., Los, M.J., 2013, Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 43-58.
- [115]. Cagle, P.T., Allen, T.C., 2009, *Basic concepts of molecular pathology*, Springer, ISBN: 978-0-387-89625-0.
- [116]. Golstein, P., Kroemer, G., 2007, Cell death by necrosis: towards a molecular definition, *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 37-43.
- [117]. Nicotera, P., Bernassola, F., Melino, G., 2004, Regulation of the apoptosis-necrosis switch, *Oncogene*, 23, 2757-2765.
- [118]. Cory, S., Adams, J.M., 2002, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.
- [119]. Reed, J.C., 1998, Bcl-2 family proteins, *Oncogene*, 17(25), 3225-3236.
- [120]. Raman, C.V., Krishnan, K.S., 1928, A new type of secondary radiation. *Nature*, 121(3048), 501.
- [121]. Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I.U., 2007, Raman spectroscopy of biological tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5), 493-541.
- [122]. Ruiz-Chica, A.J., Medina, M.A., Sanchez-Jimenez, F., Ramirez, F.J., 2004, Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guaninecytosine and adenine-thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine, *Journal of Raman Spectroscopy*, 35, 93-100.
- [123]. Stone, N., Kendall, C., Smith, J., Crow, P., Barr, H., 2004, Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers, *Faraday Discuss*, 126, 141-157.
- [124]. Notingher, I., Green, C., Dyer, C., 2004, Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy, *Journal of the Royal Society Interface*, 1, 79-90.
- [125]. Lakshmi, R.J., Kartha, V.B., Krishna, C.M., Solomon, J.G.R., Ullas, G., Uma Devi, P., 2002, Tissue Raman spectroscopy for the study of radiation damage: Brain irradiation of mice, *Radiation Research*, 157, 175-182.
- [126]. Shetty, G., Kedall, C., Shepherd, N., Stone, N., Barr, H., 2006, Raman spectroscopy: Evaluation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus, *British Journal of Cancer*, 94, 1460-1464.
- [127]. Dukor, R.K., 2002, Vibrational spectroscopy in the detection of cancer, *Biomedical Applications*, 5, 3335-3359.
- [128]. Fields, M., 2016, *Characterisation of articular cartilage by micro-beam Raman spectroscopy*, Thesis (PhD), University College London.
- [129]. Ren, Y.P., Tang, A.G., Zhou, Q.X., Xiang, Z.Y., 2011, Clinical significance of simultaneous determination of serum tryptophan and tyrosine in patients with lung cancer, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 25, 246-250.
- [130]. Miyamoto, S., Taylor, S.L., Barupal, D.K., Taguchi, A., Wohlgemuth, G., Wikoff, W.R., Yoneda, K.Y., Gandara, D.R., Hanash, S.M., Kim, K., Fiehn, O., 2015, Systemic metabolomic changes in blood samples of lung cancer patients identified by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Metabolites*, 5(2), 192-210.
- [131]. Zhang, J., Kashket, S., 1997, Cytotoxic effects of short-chain carboxylic acids on human gingival epithelial cells, *Oral Microbiology and Immunology*, 12(6), 345-349.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MELİTTİN, ÇİNKO ve HİPERBARİK OKSİJENİN A549 HÜCRE
HATTINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 15	% 14	% 4	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 2
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Izmir Katip Ėelebi Ėniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
5	www.archeoweb.com İnternet Kaynağı	% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
7	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1

dspace.trakya.edu.tr:8080