



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**Anadolu Arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) Zehrinin
Nano-taşıyıcı Sistemlere Konjugasyonu ve Biyoaktivite
Etkinliğinin Belirlenmesi**

Yüksek Lisans Tezi

Batuhan ORMAN

Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**Anadolu Arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) Zehrinin Nano-
taşıyıcı Sistemlere Konjugasyonu ve Biyoaktivite
Etkinliğinin Belirlenmesi**

Batuhan ORMAN

Danışmanlar : Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY,

II. Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Didem Şen KARAMAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir
2021

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Anadolu Arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) Zehrinin Nano-taşıyıcı Sistemlere Konjugasyonu ve Biyoaktivite Etkinliğinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08 / 09 / 2021

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET**Anadolu Arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) Zehrinin Nano-taşıyıcı Sistemlere Konjugasyonu ve Biyoaktivite Etkinliğinin Belirlenmesi**

ORMAN, Batuhan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

II. Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Didem Şen KARAMAN

2021, 72 sayfa

Bal arısı zehri, içerdiği çeşitli aktif bileşenler ile birçok hastalıkta olumlu etkileri bildirilen bir zehirdir. Terapötik etkinliğinin genellikle içerdiği litik, nörotoksin vb. özelliklere sahip peptidlerden ve enzimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kanserin günümüz büyük problemlerinden biri olması, yeni tedavi arayışları ile son yıllarda arı zehrinin de kanser üzerindeki çalışmaları ilgi odağı olmuş ve etkili olabileceği gösterilmiştir. Biyomoleküllerin kararsız yapıları ve zehrin oluşturabileceği yan etkiler kullanımlarını kısıtlayabilir. Nanotaşıyıcılar, bu dezavantajların üstesinden gelmek için umut vadeden yaklaşımlar sunar. Mezoporlu silika nanopartiküller (MSN), biyouyumlulukları, porlarının sağladığı yükleme kapasitesi, kimyasal ve biyolojik stabiliteleri sebebiyle ve tümöre ulaşabilme kabiliyetleri ile biyomoleküllerin taşınması için avantajlıdır. Ayrıca fonksiyonelleştirilebilir yüzey kimyası diğer nanopartiküler sistemlere göre kanserin tedavisinde MSN'leri öne çıkarmıştır. Bu sebeplerle, arı zehrinin potansiyel antikanser etkisinin mezoporlu silika nanopartiküllere yüklenerek artırılması sağlanabilir.

Çalışma kapsamında, floresan etiketli mezoporlu silika nanopartiküller sentezlendi, karakterizasyonları yapıldı. Nanoboyutlu MSN'lere zehir peptidleri yüklendi. Ham zehrin ve zehir yüklü MSN'lerin etkinlikleri MDA-MB 231 (insan meme adenokarsinoma), PC3 (insan prostat adenokarsinoma), HeLa (insan serviks adenokarsinoma) kanser hücreleri üzerinde, biyouyumlulukları, sağlıklı insan hücre hatları CCD34-Lu (insan sağlıklı akciğer fibroblast hücresi), tümörojenik olmayan HEK-293 (insan embriyonik böbrek hücreleri) üzerinde araştırıldı. MSN'lerin içerdiği floresan etiketi sayesinde, zehir peptidlerinin PC3 ve MDA-MB 231 hücrelerinin içine taşınıp taşınmadığı floresan mikroskopi ve akış sitometri ile araştırıldı. Tümör hücrelerinde genellikle istenen apoptotik etki akış sitometri ile incelendi. Ardından mitokondrinin hücre metabolizması ve apoptozu düzenlemedeki rolleri sebebiyle, arı zehri ve zehir MSN kombinasyonlarının mitokondriyal membran potansiyeline etkileri incelendi.

Sonuç olarak, arı zehri ve ülkemizde yetişen arı türü *Apis mellifera anatoliaca* zehri kanserin maliyetli, ciddi yan etkilere sebep olan ve kanserin direnç geliştirdiği tedavilere ekonomik, kolay ulaşılabilir, yenilikçi tedavi seçeneklerinin sunulması potansiyeline sahiptir. MSN'lerin zehir peptidlerinin, prostat kanseri üzerindeki apoptotik etkisini artırarak, etkin bir kanser tedavisi sağlayabileceği gösterilmiştir. MSN ve zehir birlikteliği sadece prostat kanseri değil çok çeşitli kanser türleri üzerinde etkili olabilecek potansiyele sahiptir.

Anahtar Sözcükler: Arı zehri, *Apis mellifera anatoliaca*, anti-kanser biyomolekül, mezoporlu silika nanopartikül



ABSTRACT**The Conjugation of Anatolian Bee (*Apis mellifera anatoliaca*) Venom to Nano-carrier Systems and Determination of Bioactivity Effectiveness**

ORMAN, Batuhan

Msc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

II. Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Didem Şen KARAMAN

2021, 72 pages

Previous studies show that honey bee venom is a venom with various active ingredients and positive effects in many diseases. Its therapeutic efficacy is generally thought to be due to the peptides and enzymes it contains, which have lytic, neurotoxin, etc. properties. The fact that cancer is one of the major problems of our time, the search for new treatments has increased the studies of bee venom on cancer in recent years and it has been shown that it can be effective. The highly laible nature of biomolecules and the side effects of the venom may limit their use. Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) arose as promising drug delivery platforms because of their outstanding biocompatibility, their loading capacity provided by their pores, their great chemical and biological robustness, and their ability to reach tumors. In addition, functionalizable surface chemistry has highlighted MSNs in the treatment of cancer over other nanoparticulate systems. For these reasons, the potential anticancer effect of bee venom can be increased with mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems.

In the present study, fluorescently labeled mesoporous silica nanoparticles were synthesized and characterization studies were carried out. Venom peptides were loaded into nanosized MSNs. The cytotoxicity of venom and venom-loaded MSNs were determined on MDA-MB 231 (human breast adenocarcinoma), PC3 (human prostate adenocarcinoma), HeLa (human cervical adenocarcinoma) cancer cells, and their biocompatibility were investigated on HEK-293 (human embryonic kidney) and CCD34-Lu (normal human lung fibroblast) normal cell lines. With the fluorescent label contained in MSNs, it was investigated by fluorescence microscopy and flow cytometry whether the venom peptides were transported into PC3 and MDA-MB 231 cells. The generally desired apoptotic effect on tumor cells was examined by flow cytometry. After that, the effects of bee venom and venom MSN combinations on mitochondrial membrane potential were examined because of the important roles of mitochondria in regulating cell metabolism and apoptosis.

In conclusion, bee venom and the venom of *Apis mellifera anatoliaca* grown in our country have the potential to offer cost-effective, easily accessible, and innovative treatment options for treatments of cancers that cause costly, serious side effects, and cancer resistance. MSNs can provide an effective cancer treatment with

an increased apoptotic effect on prostate cancer by increasing the effects of venom peptides. Venom-loaded MSNs have the potential to affect not only prostate cancer but also a wide variety of cancer types.

Keywords: Bee venom, *Apis mellifera anatoliaca*, anti-cancer biomolecule, mesoporous silica nanoparticles.



ÖNSÖZ

Kanser yıllardır olduğu gibi günümüzde de büyük bir problem olmaya devam etmektedir. Mevcut terapötik yöntemler, maliyet ve ciddi yan etkilerle hayat kalitesini olumsuz etkilemesinin yanında, kanseri yenmede yetersiz kalmaktadırlar. Binlerce yıldır insanlar tarafından kullanılan bal arısı (*Apis mellifera*) zehrinin anti kanser etkisinin detaylı anlaşılması, düşük maliyetli, herkes tarafından ulaşılabilir etkili terapötiklerin geliştirilmesini sağlayabilir. Farklı arı genotipleri zehirlerinin etkileri değişebilir, çeşitli arı türü zehirlerinin incelenmesi yeni terapötiklerin geliştirilmesi amacına katkı sağlayabilir. Bunun yanında kanserin direnç mekanizmalarının aşılmasına yardımcı mezoporlu silika nanopartiküller (MSN) gibi taşıyıcı sistemler, arı zehrinin etkinliğini göstermesine ve kanserle mücadeleye katkı sağlayabilir.

Bu amaçla çalışmada ülkemizde sıklıkla rastlanan *Apis mellifera anatoliaca* zehri, floresan işaretli MSN'lere yüklenerek, MDA-MB 231 (insan meme adenokarsinoma), PC3 (insan prostat adenokarsinoma), HeLa (insan serviks adenokarsinoma) kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile araştırılmıştır. MSN'lerin biyouyumlulukları CCD34-Lu (insan sağlıklı akciğer fibroblast), tümörojenik olmayan HEK-293 (insan embriyonik böbrek) hücreleri üzerinde incelenmiştir. Seçilen MSN sistemi ve kanser hücre hatları ile, MSN'lerin zehri hücre içine taşıyabilirliği flow sitometri ve floresan mikroskopi ile araştırılmıştır. Ardından apoptotik etkileri flow sitometri ile araştırılmıştır ve mitokondriyal membran potansiyeline etkileri floresan spektroskopisi ve floresan mikroskopi ile incelenmiştir.

İZMİR

08/09/2021

Batuhan ORMAN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde bana laboratuvarını açan ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a,

Tezimin mezoporlu silika nanoparçacık sentezlerinin gerçekleştirilmesi sağlayan, laboratuvarını açan ve her zaman yanımda olan eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Didem Şen KARAMAN'a,

Yüksek Lisans çalışmalarında, floresan görüntülerin alınmasında yardımcı olan, bizleri hep güler yüz ile karşılayan, Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ'a ve kanser moleküler biyolojisi laboratuvar üyelerine,

Hücre kültürü tekniklerini öğrenmemize yardımcı olan üst dönem arkadaşlarıma,

Nanopartikül sentezi için gittiğim Katip Çelebi Üniversitesinde, beni yardım sever ve güler yüzle karşılayan Biyomedikal Mühendisliği üyelerine ve Nanotıp ve Biyomalzeme Laboratuvarındaki arkadaşlarıma,

Yüksek lisans dönem arkadaşlarım olan birçok zorluğu beraber aştığımız, Fulya İŞEN, Seray GÜR, Hüseyin Yiğit ŞAHİN, Karar ALSAKİNİ'ye ve tüm immüno-biyoteknoloji ve biyoaktivite laboratuvarı üyelerine,

Yüksek lisans boyunca kahrımı çeken, desteğini hep belli eden kız arkadaşım, en yakın arkadaşım Pınar DAŞIK'e ve aynı zamanda ev arkadaşım ve ağabeyim olan Egemen ORMAN'a

Ve bize hep güven veren, aramızda kilometreler olsa da yanımızda olan aileme, Sebile ORMAN, Kemal ORMAN, Mediha ORMAN'a

Yüksek linsans tez çalışmamı kapsayan FLY-2021-22654 numaralı bu projeyi destekleyen ve burs sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) koordinatörlüğüne ve Aegene Biyoteknoloji şirketine en içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
TEŞEKKÜR	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
TABLolar DİZİNİ.....	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Kanser	3
2.2 Arı Zehri	6
2.2.1 Ülkemizdeki Bal Arıları (<i>Apis mellifera</i>)	6
2.2.2 Arı Zehri ve Genel Etkileri.....	6
2.2.3 Arı Zehri Yapısı.....	7
2.2.4 Arı Zehrinin Kanserde Etkili Olan Bileşenleri.....	9
2.2.5 Melittin	10
2.2.6 Fosfolipaz A2.....	12
2.2.7 Apamin	13
2.3 Kanserde Nanoteknoloji.....	14
2.3.1 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Mezoporlu Silika Nanopartiküller (MSN)	16
2.3.2 MSN'ler ile Terapötik Peptidlerin Taşınması	17
2.3.2 Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin Kimyası	18
3. MATERYAL METOD.....	22
3.1 MATERYAL	22
3.1.1 Arı Zehri.....	22
3.1.2 Silika Nanopartikül Sentez Çalışmaların Kullanılan Malzemeler ..	22
3.1.3 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	23
3.1.4 Cihazlar	23
3.2 METOD	23
3.2.1 Arı Zehri Protein İçeriğinin Belirlenmesi	23
3.2.2 Mezoporlu Silika Nanopartikül Sentezi	23

3.2.3 Florofor Konjuge Mezoporlu Silika Nanopartikül Sentezi (MSN) ve Yüzey Modifikasyonu	25
3.2.4 Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin (MSN) Karakterizasyon Çalışmaları	26
3.2.5 Mezoporlu Silika Nanopartiküllere Arı Zehri Yüklemeesi	26
3.2.6 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	27
3.2.7 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	27
3.2.8 Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Hücre İçi Alım Testleri.....	28
3.2.9 Arı Zehri, Floresan Boya İçermeyen Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	29
3.2.10 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Mitokondriyal Memran Potansiyeline Etkilerinin Belirlenmesi	30
3.2.11 İstatiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	30
4.1 Arı Zehri Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	30
4.2 Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin (MSN) Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	31
4.3 Mezoporlu Silika Nanopartiküllere Arı Zehri Yükleneesi	33
4.3 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	35
4.4 Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Hücre İçi Alım Testleri	39
4.4.1 Flow Sitometri ile Hücre İçi Alım Testleri	39
4.4.2 Floresan Mikroskopu ile Hücre İçi Alım Testleri	42
4.5 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi.....	43
4.6 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Mitokondriyal Memran Potansiyeline Etkilerinin Belirlenmesi.....	44
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇLAR	49
7. ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR DİZİNİ	52

EKLER	63
ÖZGEÇMİŞ	73



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Arı zehrinin, mezoporlu silika nanopartiküllere yüklenmesi ve kanser hücrelerini ölüme sürüklemesi şematik gösterimi (Biorender programı ile oluşturulmuştur).....	3
Şekil 2. 1 Kanser Belirteçleri (Hanahan & Weinberg, 2011).	4
Şekil 2. 2 Dünya genelindeki her yaş ve cinsiyete göre toplanan veriler ile elde edilen tahmini vaka ve ölüm sayıları	5
Şekil 2. 3 Bal arısı zehir salım sistemi (Elieh et al., 2018).....	7
Şekil 2. 4 Arı zehrinin biyolojik olarak aktif ve kanserde etkili olduğu düşünülen bileşenleri (Hesham et al., 2020)	9
Şekil 2. 5 Melittin kimyasal yapısı (Rady et al., 2017)	10
Şekil 2. 6 Melittinin 3 boyutlu yapısı A) Tetramer B) Monomer (Görüntüler PDB ID: 2MLT kaynağından alınmıştır.).....	11
Şekil 2. 7 Melittinin membranla etkileşimi, porlar oluşturmaları ve hücreyi lizise sürükleyişi (Rady et al., 2017)	11
Şekil 2. 8 Melittinin literatürdeki çeşitli kanser hücrelerine olası etki mekanizmaları derlenerek oluşturmuş şablon (Rady et al., 2017).....	12
Şekil 2. 9 Bal arısı zehrinden elde edilen fosfolipaz A2 3 boyutlu yapısı (PDB ID: 1POC, PyMOL programı ile düzenlenmiştir)	13
Şekil 2. 10 Arı zehri, melittin, fosfolipaz A2 ve apaminin olası etki mekanizmaları (Or, 2012).....	14
Şekil 2. 11 Özellikle biyomoleküller ile birlikte kullanımıyla birlikte nanoteknolojinin kanserdeki uygulama alanları (Nie et al., 2007)	14
Şekil 2. 12 Tümör dokularındaki artmış geçirgenlik (EPR) etkisi sebebiyle nanopartiküllerin pasif olarak tümörü hedeflemesi (Nie et al., 2007)	16
Şekil 2. 13 Mezoporlu silika nanopartiküllerin biyomedikal uygulamardaki esnek kullanılabilirliği (Rosenholm, Mamaeva, & Sahlgren, 2012; Zhou, Quan, Wu, Zhang, & Niu, 2018).....	17
Şekil 2. 14 Mezoporlu nano silika teknolojisi ile kullanılabilecek ana grup biyomoleküller ve terapötik peptidlerin salım stratejileri (Castillo & Lozano, 2020)	18
Şekil 2. 15 İlaç salım uygulamaları için sıklıkla kullanılan MSN tipleri A) Altıgen MCM-41 B) Kübik MCM-48 C) Mikroporlu bağlantılara sahip SBA-15 (Mart & Gun, 2018)	19
Şekil 2. 16 Stöber methodu ile silika nanopartikül sentezi gösterimi (Selvarajan et al., 2020)	19
Şekil 2. 17 MSN'lere yüzey modifikasyonu ile kan uyumluluğu, kolloidal stabilite ve hedefli taşıma özelliklerinin sağlanması (Castillo & Lozano, 2020)	20
Şekil 2. 18 Ko-kondenzasyon yöntemi ile fonksiyonel grupların mezoporlu silika nanopartiküllere eklenmesi (Hoffmann, Cornelius, Morell, & Fröba, 2006)	21
Şekil 2. 19 Mezoporlu silika nanopartiküllerin Post sentetik ve ko-kondenzasyon yöntemleri ile fonksiyonelleştirilmesinin şematik gösterimi (Cheng et al., 2015)	22

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Şekil 3. 1 FITC-konjuge Mezoporlu Silika Nanopartikül (MSN) Sentezi Düzenegi	24
Şekil 3. 2 Oluşturulması planlanan MSN % 10 APTES-FITC şematik gösterimi	24
Şekil 3. 3 Mezoporlu Silika Nanopartikül (MSN) Yüzey Modifikasyon Çalışmaları Düzenegi	25
Şekil 3. 4 Yüzey modifikasyonu sonucu oluşturulması amaçlanan MSN-PPI şematik gösterimi	26
Şekil 3. 5 MTT'nin formazana dönüşüm reaksiyonu (Farooq, Mazhar, Ghouri, Ul-Haq, & Ullah, 2020)	28
Şekil 4. 1 Pierce™ BCA Protein Assay Kit içerisindeki BSA standartları ile hazırlanıp oluşturulan BSA Standart Grafiği	31
Şekil 4. 2 Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) görüntüleri	32
Şekil 4. 3 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile MSN'lerin ortalama hidrodinamik çaplarının belirlenmesi A) MSN %10 APTES - FITC B) MSN %1 APTES	33
Şekil 4. 4 Adsorpsiyon izotermi A) Başlangıç total zehir proteinine karşılık nanopartiküle yüklenen protein grafiği B) Başlangıç zehir miktarına karşılık yüklenen zehir proteinin grafiği	34
Şekil 4. 5 Testlerde kullanılan hücrelerin inverted mikroskop ile alınmış görüntüleri, yukarıda soldan sağa sağlıklı hücreler CCD34Lu, HEK293 ve aşağıda kanser hücreleri PC3, MDA-MD 231, HeLa (10x büyütme, Ölçek çubuğu: 100 µm)	35
Şekil 4. 6 MSN %10 APTES ve MSN-PPI nanopartiküllerin sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri % canlılık grafiği A) HEK293 (insan embriyonik böbrek hücreleri) ve B) CCD34Lu (sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri)	36
Şekil 4. 7 Arı zehri yüklü nanopartiküller ve yüklenen eşlenik zehir miktarlarının 24 ve 48 saatlik % canlılık grafikleri A) MDA-MB 231 meme kanseri hücreleri, B) HeLa serviks kanseri hücreleri, C) PC3 prostat kanseri hücreleri (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)	38
Şekil 4. 8 MSN %10 APTES – FITC 4 saat ve 24 saat muamele sonrası % hücre içine alım grafikleri A) MDA-MB 231 B) PC3 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)	40
Şekil 4. 9 MSN %10 APTES – FITC 4 saat ve 24 saat muamele sonrası medyan floresan yoğunluğu (MFI) değerleri ile hücre içine alım grafikleri A) MDA-MB 231 B) PC3 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)	42
Şekil 4. 10 Zehir Yüklü MSN %10 APTES – FITC 4 saat muamele sonrası MDA-MB 231 ve PC3 hücreleri (Ölçek Çubuğu : 20µm)	43
Şekil 4. 11 Flow sitometri ile Aneksin V boyama yöntemi kullanılarak elde edilen analiz sonuçları. A) PC3 % apoptoz grafiği B) MDA-MB 231 % apoptoz grafiği (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)	44

Şekil 4. 12 Arı zehri, arı zehri yüklü MSN ve yüklenmemiş MSN'lerin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi, soldan sağa kırmızı, yeşil ve çakıştırılmış halleri. A) MDA-MB 231 floresan mikroskobu görüntüleri, B) PC3 floresan mikroskobu görüntüleri C) PC3 kırmızı ve yeşil floresan oranları grafiği D) MDA-MB 231 kırmızı ve yeşil floresan oranları grafiği (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$) (Ölçek çubuğu : 100 μm).....45

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2. 1 Arı zehri bileşenleri ve biyolojik etkileri (ALTINTAS ve BEKTAS, 2019; Or, 2012; Rady et al., 2017).....7

Tablo 2. 2 Arı zehri ve melittinin çalışmada kullanılan kanser ve hücre hatlarına karşı olası etkileri (Jeong et al., 2014; Oršolić, 2009; M. H. Park et al., 2011).....10

Tablo 2. 3 Kanser tedavisi için FDA onaylı nanopartikül ilaçlar (Dang & Guan, 2020)15

Tablo 4. 1 Arı zehrinin PierceTM BCA kiti ile belirlen protein miktarı.....31

Tablo 4. 2 MSN'lerin HEPES tamponu içerisindeki hidrodinamik boyut (nm) ve zeta potansiyel (mV) sonuçları33

Tablo 4. 3 Yükleme çalışmalarında kullanılacak zehir miktarları ve verimleri35

Tablo 4. 4 Arı zehrinin nanopartiküllerin içerisindeki eşlenik zehir miktarları ile kanser hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri ($\mu\text{g/mL}$).....38

Tablo 4. 5 Arı zehri yüklü nanopartiküllerin kanser hücrelerine uygulanması sonucu nanopartiküllerin içerisindeki %50 canlılığı inhibe eden zehir konsantrasyonları (sonuçlar $\mu\text{g/mL}$ olarak verilmiştir).....39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
µm	Mikrometre
mg	Miligram
°C	Santigrat
%	Yüzde
mL	Mililitre
kV	Kilovolt
nm	Nanometre
µL	Mikrolitre
IC ₅₀	%50 inhibe eden konsantrasyon
pH	Hidrojen gücü
mV	Milivolt
mM	Milimolar

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MCM-41, MCM-48	Mobil kristal malzemeler
SBA-15	Santa Barbara Amorf
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane
MSN	Mezoporlu silika nanopartikül
MSN %10 APTES	% 10 (3-Aminopropyl)triethoxysilane içeren MSN
MSN-FITC-PPI	MSN – Floresan izotiyosiyonat - Polipropilenimin
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
BCA	Bikinkoninik Asit
FITC	Floresan izotiyosiyonat
FLA2	Fosfolipaz A2

<u>Kısaltmalar (Devamı)</u>	<u>Açıklama (Devamı)</u>
NP	Nanopartikül
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
TEOS	Tetraetilortosilikat
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
EtOH	Etanol
NH ₂ OH	Amonyum Hidroksit
NaOH	Sodyum Hidroksit
H ₂ O	Su
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol dihidroklorür
MeOH	Metanol
MMP	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
MTT bromür	3-(4,5-dimetiltiyazol2- yl)-2,5-difeniltetrazolyum-
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
BSA	Sığır Serum Albumini
PEG	Polietilenglikol
PLGA	poly(lactic-co-glycolic asit)
CO ₂	Karbondioksit
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetan sulfonik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
UV	Ultraviyole
PBS	Fosfat tamponlu salin
EPR	Artmış geçirgenlik ve alıkonma

Kısaltmalar (Devamı)Açıklama (Devamı)

PDI

Polidispersite İndeksi

MFI

Medyan Floresan Yoğunluğu



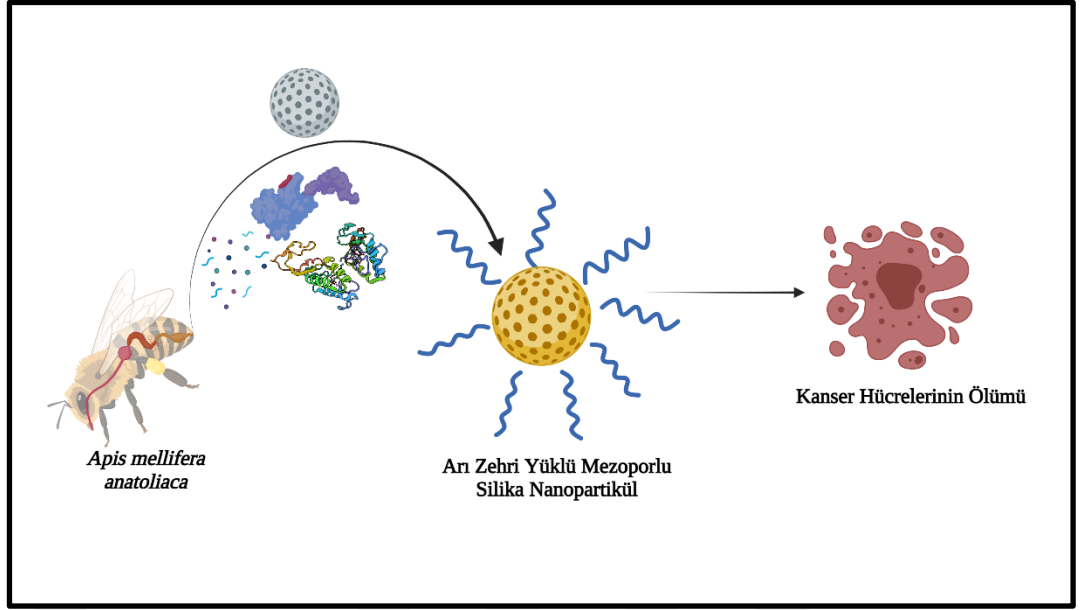
1. GİRİŞ

Kanser bilinen tarih boyunca sık görülen bir problem olarak karşımıza çıkmıştır ve günümüzde de insan yaşamı için büyük bir tehdit olmaya devam etmektedir (Ginsburg et al., 2017; Sung et al., 2021). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2020 istatistikleri, 19,3 milyon kanser vakasının görüldüğünü ve 10 milyon kadar insanın hayatını kaybettiğini bildirmiştir. Bilinen tedavi yöntemleri zorlu ve hayat kalitesini olumsuz etkilemesi yanı sıra ciddi yan etkilere sebep olmaktadır (Baykara, 2016). Ayrıca bu tedavi yöntemleri ile hastalığın nüksetme riski bulunmakta ve kanser hücrelerinin oluşturduğu direnç, yöntemlerin seçiciliğinin düşük olması ve kanser hücrelerinin heterojenitesi sebebiyle yetersiz kalmaktadır (Jo et al., 2012; Naz et al., 2019). Kullanılan yenilikçi biyolojik tedaviler ise biyomateriyallerin hassas yapıları, kanser hücrelerine ulaşamamaları ve maliyetleri sebebiyle kısıtlanmaktadır (Castillo & Lozano, 2020). Başta kötü prognoza sahip ve sık görülen kanserler olmakla birlikte yeni tedavi yöntemlerinin araştırılması gerekliliği açıktır.

Bal arısı (*Apis mellifera*) ürünleri binlerce yıldır insanlar tarafından tedavi amaçlı kullanılmıştır (Ju et al., 2007). Bal arısı zehri, içerdiği çeşitli aktif bileşenler ile birçok hastalıkta olumlu etkileri bildirilen bir zehirdir. Bu asidik, kompleks karışım başlıca biyolojik olarak aktif melittin, apamin, adolapin, mast hücresi degranülasyon peptidi gibi peptidlerden, fosfolipaz A2, hyaluronidaz gibi enzimlerden, bunun yanında histamin, dopamin, nörepinefrin gibi biyojen aminlerden ve peptid olmayan bileşenlerden oluşmaktadır (Sengul & Vatansev, 2021). Arı zehri ve zehrin %50'sini oluşturan melittinin, prostat (Badawi, 2021), glioblastoma (Sisakht et al., 2017), akciğer (Bai, 2018), meme (Duffy et al., 2020) gibi kanser türlerine karşı normal hücrelere kıyasla daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Wang et al., 2018). Anti-kanser etkilerinin içeriğinde bulunan melittin, fosfolipaz A2 ve apaminden kaynaklandığı düşünülmektedir, bunun yanında yüksek dozları inflamatuvar, nörotoksik ve hemolitik olabilir (Or, 2012). Farklı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar arı zehri ve bileşenlerinin apoptoz, proliferasyon, metastaz, anjiyogenez, motilite ve invazyonun düzenlenmesinde görev alan kaspazlar, ölüm reseptörleri, NF-k β , VEGF, HIF-1 α , p53, metalloproteinazlar gibi farklı gen ve proteinleri modüle ettiği gösterilmiştir (Jeong et al., 2014; Moon et al., 2008; Or, 2012; Rady, Siddiqui, Rady, & Mukhtar, 2017). Bu kompleks etkileri tam olarak anlaşılamamış olsa da birbirini tamamlayan etkiler olmaları, arı zehri ve bileşenlerini oldukça potansiyel bir anti-kanser ajan yapmaktadır (Badawi, 2021). Arı zehrinin kanser üzerindeki bilinen etkileri, ülkemizin zengin fitocoğrafik karakteri, konumu, iklimi, arıcılık faaliyetleri için oldukça elverişli olması, *Apis mellifera anatoliaca* türünün ülkemizde yaygın yayılım gösteren arı türü olması sebebiyle etkilerinin detaylı incelenmesi ve potansiyelinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

Her geçen gün arı zehrinin ve bileşenlerinin etki mekanizmaları anlaşılacak potansiyeli fark edilmektedir. Ancak maalesef çoğu biyomakromolekül *in vivo* olarak oldukça kararsızdır. Arıların kendilerini korumak için ürettikleri zehrin büyük çoğunluğunu oluşturan farmakolojik olarak aktif protein ve peptidler önemli terapötik adaylar olsalar da bir kısmının sindirim sisteminde elimine olması sebebiyle beklenen etkiyi yaratamamaktadırlar (Ağan ve Kekeçoğlu, 2020). Nanoteknolojinin hızlı gelişimiyle birlikte, biyomoleküllerin korunmasını ve istenilen hedefe ulaşmasını sağlayan taşıyıcı nanopartiküler sistemler devrim niteliğindedir (Xu, Lei, & Yu, 2019). Tümörlerin tedavisi için nanopartiküllerin kullanımına odaklanılmasına neden olan diğer bir nokta da tümör çevresindeki damarların endotel hücreleri kaplayan perisit sayısındaki azalma, bazal membrandaki anomalilikler, artmış büyüme faktörleri sebebiyle normal dokudakilere göre daha büyük, geçirgen bir yapıya sahiptir. Bu da nanopartiküllerin pasif bir şekilde tümöre seçimli davranmasını sağlar (Labhasetwar & Ph, 2005). Birkaç çalışma zehrin ve bileşenlerinin nanopartiküller ile tümör hücreleri üzerindeki etkisinin arttırılabileceğini ve normal hücreler üzerindeki etkisinin azaltılabileceğini göstermektedir (Soman et al., 2009; X. Yu et al., 2019). Bilinen nanomalzemeler arasında mezoporlu silika nanopartiküller (MSN), ayarlanabilir por ve nanopartikül boyutu, yüksek yüzey alanı, fonksiyonelleştirilebilir yüzey kimyası ile ilgi çekici nanoyapılar olmuşlardır (Selvarajan, Obuobi, Lai, & Ee, 2020; Tian, Yu, Ruan, Zhu, & Zhu, 2018). Bu özellikleri ile birden fazla ilaç yüklenmesine olanak vermesi, kanserin direncine karşı geliştirilecek strateji çeşitliliğini arttırmaktadır (Martínez-carmona, Lozano, & Vallet-regí, 2018). Ayrıca, FDA tarafından “*Genel Olarak Güvenlidir (GRAS)*” statüsüne sahiptirler. Yüksek biyoyumlulukları, kandaki stabilitesi, biyomoleküller ile kullanımda onları öne çıkarmaktadır (Castillo & Lozano, 2020).

Yukarıdaki bilgiler ele alındığında, yapılan tez çalışması kapsamında ülkemizde yaygın yayılış gösteren Anadolu arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) zehrinin, FITC konjuge mezoporlu silika nanopartiküllere (MSN) yüklenmesi ve etkilerinin farklı tip kanser hücreleri üzerinde, izlenebilir bir şekilde araştırılması amaçlanmaktadır. Çalışmanın görsel özeti şekil 1.1’de verilmiştir. Çalışmanın kanserin maliyetli, yan etkili sınırlı tedavilerine, kolay erişilebilir, özellikle uzak ve daha az gelişmiş bölgelere tedavi seçenekleri sunulması için katkısı olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında, ülkemizde de önemli bir yere sahip arıcılık sektörünün ve arı ürünlerinin öneminin anlaşılmasına ve detaylı araştırılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca biyomoleküllerin, özellikle peptidlerin terapötik etkinliklerini gösterebilmesi için uygun nano-taşıyıcı sistemler için bir model olarak katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

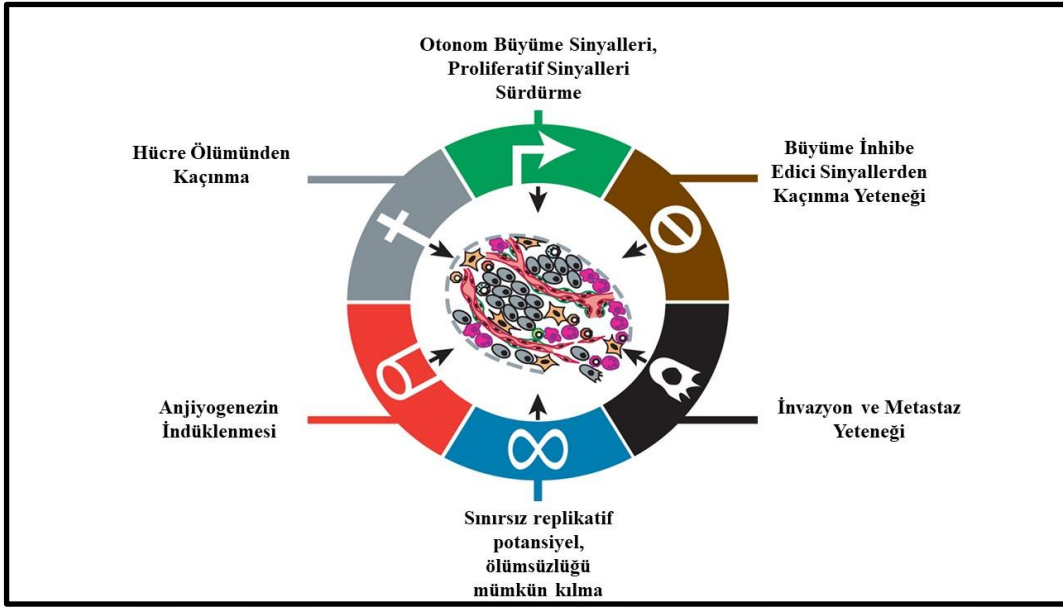


Şekil 1. 1 Arı zehrinin, mezoporlu silika nanopartiküllere yüklenmesi ve kanser hücrelerini ölüme sürüklemesi şematik gösterimi (Biorender programı ile oluşturulmuştur)

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kanser

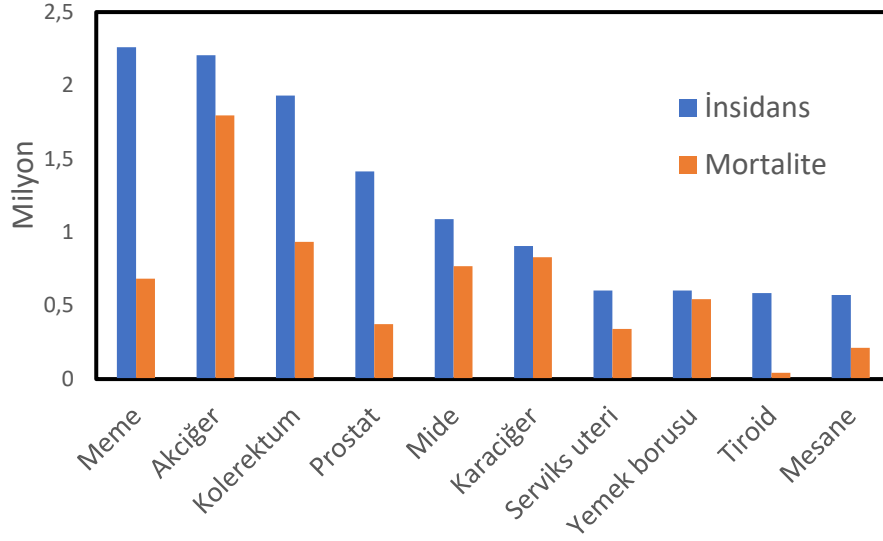
Kanser kontrolsüz hücre büyümesi ile hücrelerin kaynağından veya primer bölgesinden vücudun diğer bölgelerine yayılması, invazyonu ile karakterize edilen bir grup hastalıktır. Yaklaşık % 85 epitel hücrelerden meydana gelir ve karsinomlar olarak adlandırılırlar, mezoderm hücrelerden kaynaklılara sarkomalar, glandüler doku hücrelerinden türevlenenlere adenokarsinomlar denilmektedir (Pecorino, 2012). Tanımlanan kanser türlerinin özellikleri, kansere sebep olana ana faktörleri, tedavi yöntemleri farklıdır ancak Hanahan ve Weinberg genel olarak kanserlerin 6 özelliğini tanımlamışlardır (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 Kanser Belirteçleri (Hanahan & Weinberg, 2011).

Yeni terapötiklerin tasarımları için bu belirteçler potansiyel yollar olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser giderek artan bir hastalık olarak karşımıza çıkması ve halen kardiyovasküler hastalıklardan sonra en ölümcül ikinci hastalık olması yeni terapötiklerin tasarlanmasının önemini göstermektedir (Attarde & Pandit, 2019).

2020 global kanser istatistiklerine baktığımızda, 19,3 milyon kanser vakasının olduğunu ve yaklaşık 10 milyon kanser kaynaklı ölümün olduğunu görmekteyiz. Bunlardan meme kanseri, akciğer kanserini geride bırakarak en çok tanı alan kanser olarak karşımıza çıkmaktadır (Sung et al., 2021). Prostat kanseri de Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre erkeklerde akciğer kanseriyle yaklaşık olarak aynı sayılarda tanı almıştır. Şekil 2.2'de Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından üretilen GLOBOCAN 2020 verileri kullanılarak üretilmiş grafik kanser türlerinin görülme sıklıklarını ve öldürücülüklerini göstermektedir.



Şekil 2. 2 Dünya genelindeki her yaş ve cinsiyete göre toplanan veriler ile elde edilen tahmini vaka ve ölüm sayıları

Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı özelliklere sahip olması ve aynı zamanda zorlu koşullara karşı direnç gösterebilmesi hatta bu koşulları lehine çevirebilmesi sayesinde hayata tutunabilirler. Kanser tiplerine göre değişen özellikleri sebebiyle, bu zeki hücrelerin tedavisinde kansere sebep olduğu bilinen genetik faktörlerin dışında, sigara ve alkol kullanımı (Golemis et al., 2018), kötü beslenme, virüsler, iyonize ışınlar maruziyet, çevresel kirlenimler (Blackadar, 2016) gibi kontrol edilebilecek faktörlerin en aza indirilmesi ve tabi ki yeni tedavi yöntemlerinin araştırılması şarttır.

Günümüzde en sık başvurulan tedavi yöntemleri cerrahi, kemoterapi, radyoterapi daha az sıklıkla kullanılan yöntemler hormon tedavisi, immünoterapi, gen terapisi kök hücre tedavisi gibi biyolojik yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastaya ve hastalığa göre tek başlarına ve tedavi yöntemlerinin kombinasyonları şeklinde kullanılabilirler (Baykara, 2016; Falzone, Salomone, Libra, John, & Lane, 2018). Hastaya, genetik karakterine göre hastalığın seyrinin ve tedaviye yanıtının değişmesi sebebiyle Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI)'nin de bildirdiği gibi biyobelirteçlere ve genetik kimliğe göre kişiye göre tedavi uygulamaları artmaktadır. Ancak bilinen tedavi yöntemlerinin dezavantajları sebebiyle yeni yöntemlere ihtiyaç vardır. Cerrahi müdahale, hastaların halihazırdaki sağlık durumlarının cerrahi müdahaleyi zorlaştırması ve kanserin nüks etme riski olması sebebiyle kısıtlanmaktadır (Brace, 2014). İyonize ışınları kullanarak tümör hücrelerini öldürmeyi hedefleyen radyoterapi, tümör ile birlikte sağlıklı hücrelere de hasar vermektedir, bunun yanında saç kaybı, iştah kaybı gibi hayat kalitesini etkileyen yan etkileri bulunmaktadır (Baykara, 2016). Geleneksel kemoterapi uygulamaları ise, düşük seçicilikleri sebebiyle sistemik toksisiteye sebep olmakta, oluşan ilaç direnci ve kanser hücrelerinde düşük ilaç konsantrasyonları sebebiyle yetersiz kalmaktadır (Vijaya, 2015). Son yıllarda

kullanılan hormon tedavisi, immünoterapi, gen terapisi, kök hücre tedavisi gibi yöntemlerin ise, transplantasyon reddi, yöntemlerin oluşturulması sırasında virüslerin kullanılması sebebiyle oluşan zorluklar, otoimmün hastalıkların oluşabilme riski, biyolojik materyallerin kısa yarı ömürleri ve yüksek maliyetleri sebebiyle yetersiz kalmaktadırlar (Barkat et al., 2019). Doğal kaynakların düşük maliyetleri ve yılan zehri, akrep zehri, örümcek zehri, arı zehri gibi kaynakların kanser hücreleri üzerindeki önemli etkilerinin artan çalışmalarla gösterilmesi, ayrıca nanotipteki gelişmeler nanomalzemelerin üstün özellikleri ve kanser hücrelerine spesifik tedavilerin geliştirilebilmesi, biyolojik materyaller ile kullanımlarının avantajları araştırmacıları bu kaynaklara yönlendirmiştir (Biswas, Gomes, Sengupta, Datta, & Singha, 2012; Castillo & Lozano, 2020; Duffy et al., 2020; Gajski & Garaj-vrhovac, 2013).

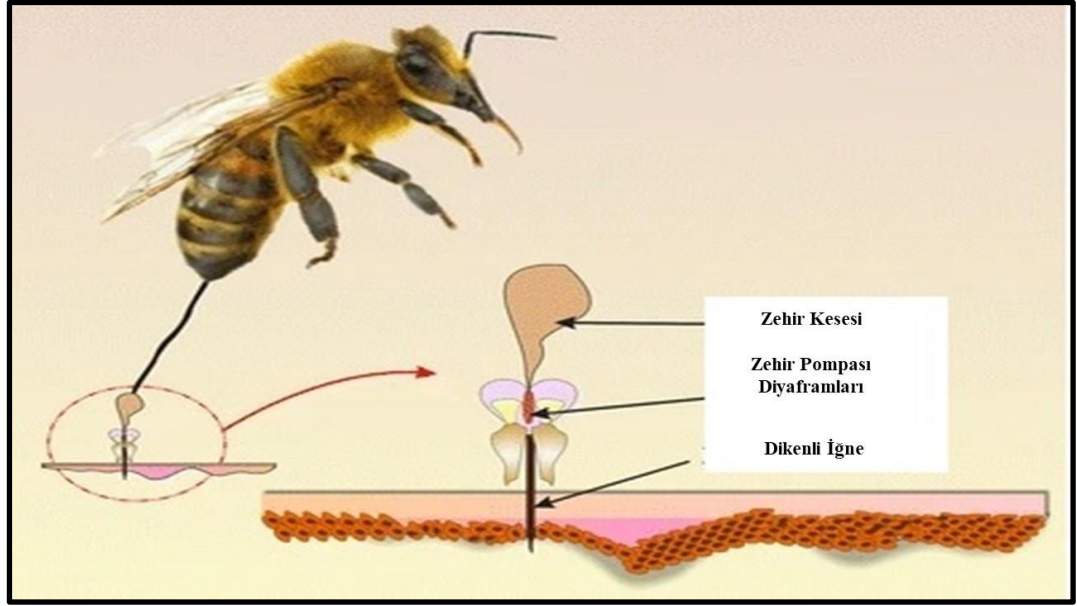
2.2 Arı Zehri

2.2.1 Ülkemizdeki Bal Arıları (*Apis mellifera*)

Hymenoptera (zar kanatlılar) böcek takımında, Apidae familyasında yer alırlar (Elieh, Komi, Shafaghat, & Zwiener, 2018). Ruthnera göre İç Anadolu, Ege, Akdeniz ve Karadenizin büyük bir bölümünde *Apis mellifera anatoliaca*, Gündeydoğu Anadoluda *A.m meda*, Kuzeydoğu Anadoluda *A.m caucasica* ve Trakya’da *A.m carnica* olmak üzere ülkemizde 4 arı türü yer almaktadır (Friedrich, 1988). Ancak Güneydoğu Anadolu’da bir grup örnekte *A.m syriaca*’ ya rastlanmıştır. Ülkemizin bu 5 türe ev sahipliği yaptığı düşünülmektedir. Bal arısı bir kimyager gibi, binlerce yıldır insanların medikal olarak kullandıkları bir dizi ürünün kaynağı olmuştur (Duffy et al., 2020). Yaygın yayılım gösteren *Apis mellifera anatoliaca* sert iklim koşullarına uyum sağlaması, hızlı nektar toplayabilme, daha uzun yaşayabilme gibi özellikleriyle öne çıkmaktadır (Kence, Kence, ve Kandermir, 1998).

2.2.2 Arı Zehri ve Genel Etkileri

Arı zehri (apitoksin), hayvanlar aleminde eşsiz bir silahtır. Özellikle bal arılarının, kolonilerini ve kovanları korumak için tasarlanmış kompleks bir karışımdır (Or, 2012). Bal arısı zehri işçi arıların zehir bezlerinde üretilerek, zehir keselerinde depo edilir (Şekil 2.3). Arı zehrinin, içerdiği aktif bileşenler ile birçok olumlu etkisi olduğu düşünülmektedir. İmmün sistem üzerindeki etkisi sebebiyle geleneksel tıpta yaygın olarak bağışıklıkla ilgili hastalıklarda kullanılmıştır, bunun yanında anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral etkileri, endokrin sistem, merkezi ve çevresel sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve kanser üzerinde de yararlı etkileri bildirilmiştir (ALTINTAS ve BEKTAS, 2019).



Şekil 2. 3 Bal arısı zehir salım sistemi (Elieh et al., 2018)

2.2.3 Arı Zehri Yapısı

Bal arısı zehri renksiz, asidik (pH:4,5 – 5,5), kokusuz bir sıvıdır. % 88'i sudan meydana gelmiştir, içerdiği feromonlardan dolayı aromatik özelliktedir, keskin acı bir tada sahiptir, oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakikada kurur ve ağırlığının büyük bir kısmını kaybeder (ALTINTAS ve BEKTAS, 2019; Çelik ve Aşgun, 2018). Taze ve kurutulmuş zehir biyolojik aktivite olarak benzerdir. Bu kompleks karışımın içerdiği bileşiklerin, özellikle peptidlerin yararları ile birçok çalışma mevcuttur (Or, 2012; Zarrinnahad, Mahmoodzadeh, Parviz, Mehdi, & Ali, 2018). Arı zehri başlıca, biyolojik olarak aktif melittin, apamin, adolapin, mast hücresi degranülasyon peptidi gibi peptidlerden, fosfolipaz A2, hyaluronidaz gibi enzimlerden, bunun yanında histamin, dopamin, nörepinefrin gibi biyojen aminlerden ve peptid olmayan bileşenlerden oluşmaktadır (Or, 2012; Ung, Uh, Ee, & Ohyun, 2018). Bileşenlerin bilinen etkileri Tablo 2.1’de derlenmiştir.

Tablo 2. 1 Arı zehri bileşenleri ve biyolojik etkileri (ALTINTAS ve BEKTAS, 2019; Or, 2012; Rady et al., 2017).

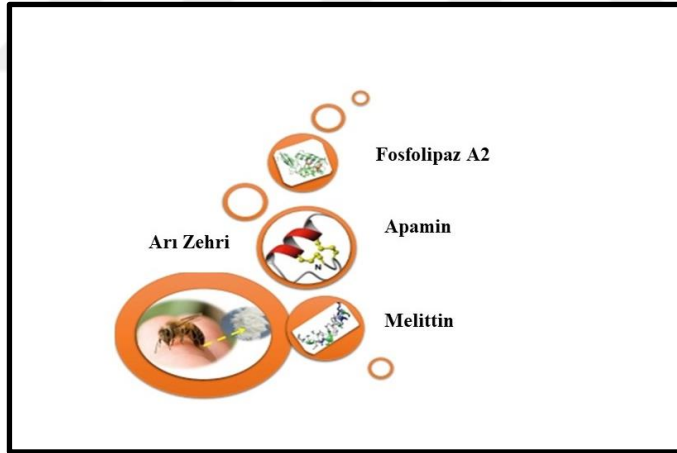
Molekül Tipi	Bileşen	Kuru Zehirdeki % Oran	Biyolojik Etkileri
Proteinler (Enzimler)	Fosfolipaz A2	15-17	Kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki, fosfolipidleri parçalar ve kan hücrelerinin membranlarına etki eder, pıhtılaşmayı ve kan basıncını düşürür, zehrin en güçlü alerjen bileşeni
	Fosfolipaz B	10-12	
	Asit fosfomonoesteraz	1	Toksik lizolesitinin parçalanması ile detoksik etki
	Hyaluronidaz	1	
		1-5	Doku iskelesinin önemli bileşeni hyaluronik asit polimerlerinin

			hidrolizini katalize eder, immün düzenleyici, proteinleri katalize ederek zehrin dokulara nüfuz etmesini sağlar, kan damarları geçirgenliklerini arttırarak kan dolaşımının artmasına neden olur, alerjeniktir.
	Fosfataz	1	
	α -Glukozidaz	0.6	
	Lizofosfolipaz	1	
Küçük protein ve peptidler	Melittin	48-58	Zehrin ana bileşeni, PLA2 aktivatörü, kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki, doza bağlı anti-inflamatuar ve anti-artritik etki, immün sistemin baskılanması ile immün düzenleyici etkileri vardır, membranla etkileşime geçer membranların yüzey gerilimi düşürür, hemolitik atkivitesi vardır, kan dolaşımını arttırır ve kan basıncını düşürür, radyasyondan koruyucu etkileri ve ayrıca antifungal, antibakteriyal, antiviral etkileri vardır
		40-50	
	Apamin	2-3	Ca ²⁺ ile aktifleştirilmiş K ⁺ kanallarının inhibisyonu, kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki, nosiseptif etki, kortizon salımının uyarılması ile anti-inflamatuar etki, çok küçük dozları merkezi sinir sistemini uyarır ancak yüksek dozları nörotoksiktir
	Mast hücresi degranülasyon peptidi	2-3	Anti-inflamatuar ve analjenik etki, mast hücrelerini lizise uğratar, histamin, serotonin, heparin salımını arttırır, merkezi sinir sistemini uyarır
	Adolapin	0.5-1	Fosfolipaz A2, siklooksijenaz, lipoksijenaz inhibisyonu, inflamasyonu düşürürerek ağrı kesici, anti-romatizmal etki, eritrositlerin agregasyonunu engeller ve düşük toksisiteye sahiptir.
	Proteaz İnhibitörleri	0.1-0.8	Tripsin, kemotripsin, plazmin, trombin gibi proteazların inhibisyonu ile inflamasyonu düşürür, düşük toksisiteye sahiptir
	Tertiapin	0.1	Radyasyonu önleyici etkileri vardır ancak fizyolojik etkileri tam olarak bilinmeyen peptidlerdir.
	Kardiyopeptin	<0.7	
	Prokamin A ve B	1-2	
	5 aminoasitten daha küçük peptidler	13-15	
	Sekapin	0.5-2	
	Pamin	1-3	
	Minimin	2-3	
		2-3	
Fosfolipidler			

Fizyolojik olarak aktif aminler		3	Nörotransmitter maddelerdir. Kan dolaşımını arttırır, düz kasları uyarırlar, histamin alerjik etkiye sahiptir
	Histamin;Dopamin; Nöradrenalin	0,5-2;0,13-1 0,1-0,7	
Aminoasitler	γ -aminobütirik asit, α -aminoasitler		
Şekerler	Glukoz,Fruktoz	2-4	
Uçucu Bileşenler	Kompleks eterler	4-8	Arı kolonilerinin haberleşek savunmaya geçmesi ve korunması
Mineraller	P,Ca,Mg	3-4	

2.2.4 Arı Zehrinin Kanserde Etkili Olan Bileşenleri

Kanserin, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yaygın ikinci ölümcül hastalık oluşu (Attarde & Pandit, 2019) mevcut terapi yöntemlerinin yan etkilerinin çok olması sebebiyle doğal kaynaklara yönelim artmıştır (Bhowmik, Saha, Sarkar, & Gomes, 2017; Yusuf, Irby, Katiyar, & Elmets, 2007). Arı zehrinin de son yıllarda tümör tedavisinde kullanımıyla ilgili çalışmalar artmıştır (Tablo 2.2) ve etkili olduğu düşünülen bileşenleri araştırılmıştır (Şekil 2.4) (Duffy et al., 2020; C. Lee, Bae, Joo, & Bae, 2017). Ancak hala moleküler mekanizmaları, geniş ölçekte etkileri bilinmemekte ve daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Arı zehrinin, bu özgün etkilerinin moleküler temelini anlamak, dünya çapında ulaşımı kolay ve ucuz terapötiklerin keşfi için anahtardır.



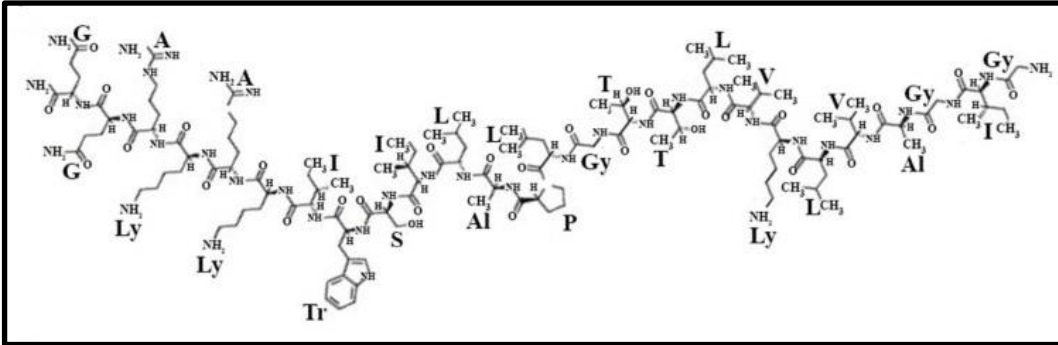
Şekil 2. 4 Arı zehrinin biyolojik olarak aktif ve kanserde etkili olduğu düşünülen bileşenleri (Hesham et al., 2020)

Tablo 2. 2 Arı zehri ve melittinin çalışmada kullanılan kanser ve hücre hatlarına karşı olası etkileri (Jeong et al., 2014; Oršolić, 2009; M. H. Park et al., 2011)

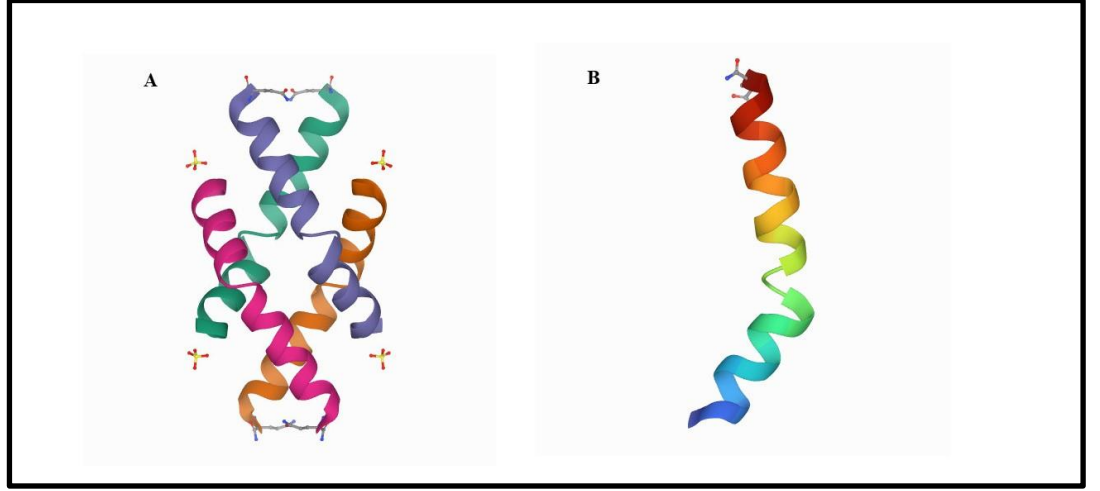
Bileşen	Kanser Türü	Hücre Hattı	Etki Mekanizması
Arı zehri	Prostat Kanseri	PC3	NF-K β inhibisyonu ile kaspaz aktivasyonu, hücre büyümesinin baskılanması
Arı zehri	Serviks Kanseri	HeLa	Kalmodülinin inhibisyonu ile, hücre büyümesi, klonojenite ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu
Melittin	Meme Kanseri	MDA-MB 231	PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının inhibisyonu ile motilite ve invazyonun baskılanması

2.2.5 Melittin

Arı zehrinin büyük çoğunluğunu oluşturan melittin peptidi, kanser terapisindeki potansiyeli sebebiyle önemli ölçüde dikkat çekmiş ve çalışılmıştır (Bas & Ors, 2003). Zehrin, aktif farmakolojik litik peptidi melittin, 26 amino asitten oluşan amfifilik, katyonik bir peptiddir (Şekil 2.5 ve 6) (Rady et al., 2017). Melittinin 26 amino asitlik dizisi 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 şeklindedir (Zhang & Chen, 2017).

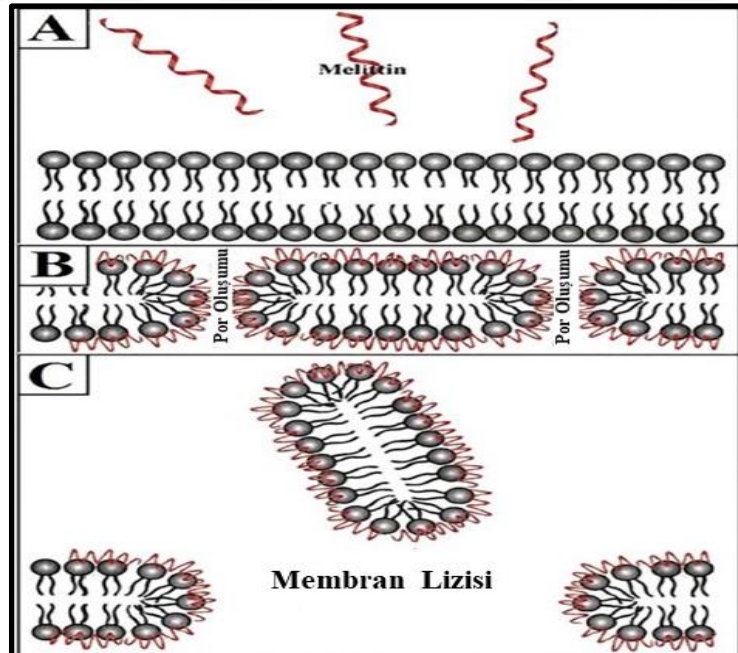


Şekil 2. 5 Melittin kimyasal yapısı (Rady et al., 2017)



Şekil 2. 6 Melittinin 3 boyutlu yapısı A) Tetramer B) Monomer (Görüntüler PDB ID: 2MLT kaynağından alınmıştır.)

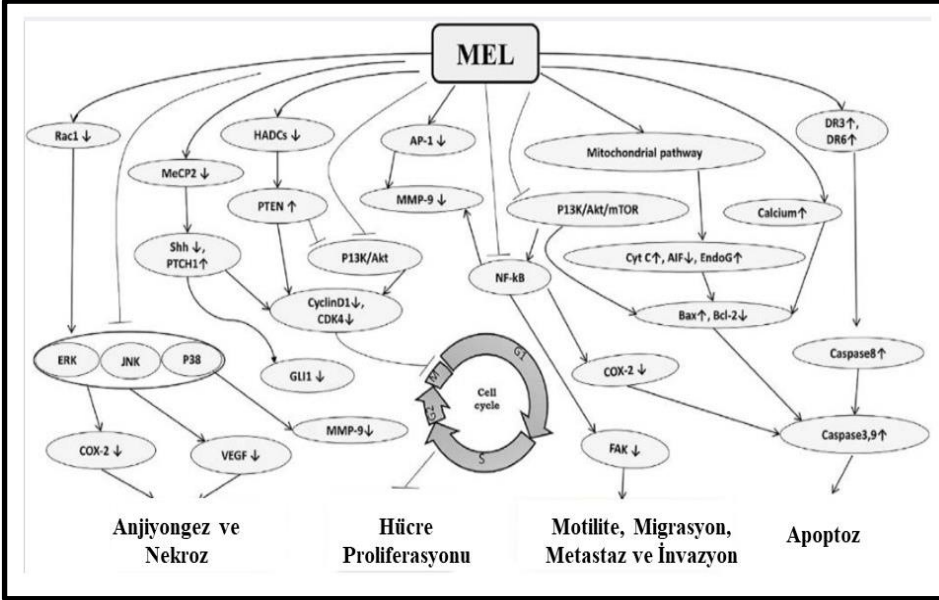
Çeşitli tümör hücrelerinde, hücre döngüsünü durdurabildiği, büyümeyi inhibe edebildiği ve hücreyi apoptoza sürükleyebildiği gösterilmiştir (Shaw et al., 2019). En belirgin özelliği membranda porlar açarak hücreyi lizise sürüklemesidir (şekil 2.7), bu sebeple çeşitli hücrelere etki edebilir, bunun yanında hemolitik aktivitesi ve kullanımını kısıtlayan sebeplerden biri de bu özelliğidir (Rady et al., 2017). Ancak amfifilik karakteri, tümör hücrelerinin yüksek membran potansiyeli sebebiyle seçimli davranmasını sağlar ayrıca ras onkogenini yüksek seviyede eksprese eden hücrelere seçimli davrandığı da bildirilmiştir (Or, 2012).



Şekil 2. 7 Melittinin membranla etkileşimi, porlar oluşturması ve hücreyi lizise sürükleyişi (Rady et al., 2017)

Bir kalmodulin inhibitörü olduğu gösterilmiştir, kalmodulin inhibitörlerinin kanser tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Oršolić, 2009). Bazı çalışmalar,

melittinin M2R melanoma hücrelerinin hücre zarlarındaki melanotropin reseptörünü inhibe ettiğini ileri sürse de (Gerstt & Salomon, 1987), diğer çalışmalar membranda porlar oluşturarak malign hücreleri öldürdüğünü göstermiştir, bunun yanında membrandaki bu değişikliklerin hormon salımı, membrandaki çeşitli proteinlerin agregasyonu ile çeşitli sinyallere sebep olduğu bildirilmiştir (Rady et al., 2017). Kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, Bax gibi apoptotik proteinleri arttırdığı, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Moon et al., 2008; Rady et al., 2017), bunun yanında sitolitik/nekrotik etkisi de çalışılmıştır (Ojciu & Nasil, 1994). Ayrıca, NF- κ B, p38/JNK, VEGF, HIF-1 α ve çeşitli metalloproteinazların inhibisyonu ile metastaz, anjiyogenez, invazyonu engellediği bildirilmiştir (Ding, Zhang, An, & Bo, 2016; Zhang & Chen, 2017). Şekil 2.8’de olası mekanizmaları gösterilmiştir. Ancak, zehir bileşenlerinin kanser üzerindeki sinerjistik etkisi unutulmamalıdır (Jeffrey & Ming-Shi, 1993) ve saflaştırılması için her laboratuvarında bulunamayacak cihazlar, sofistike ve maliyetli yöntemler gereklidir (Şirin, Çakır, Can, Yıldız, ve Kolaylı, 2017).



Şekil 2. 8 Melittinin literatürdeki çeşitli kanser hücrelerine olası etki mekanizmaları derlenerek oluşturmuş şablon (Rady et al., 2017)

2.2.6 Fosfolipaz A2

Fosfolipazlar da hayvan zehirlerinde bulunan ve potansiyel terapötik ajanlar olarak çalışılmıştır. Hidrolaz sınıfı enzimlerdir ve membran fosfolipidlerinin hidrolizinde görev alırlar (Zambelli, Picolo, Fernandes, Fontes, & Cury, 2017). Fosfolipaz A2 (FLA2), fosfolipidleri 1-2 açıl pozisyonundan hidrolize ederek, lizofosfolipiler ve arasidonik asit gibi yağ asitlerini serbest bırakır (G. Lee & Bae, 2016). Lizofosfotidilkolin gibi FLA2 ürünlerinin immün sistemi uyarıcı veya sitotoksik etkileri bildirilmiştir (Andresen, Jensen, Madsen, & Jørgensen, 2005). Aktiviteleri ile membran bütünlüğünü bozarak, aşırı yağ asidi salımı sonucu inflamasyon ile, oluşturduğu tümör lizatları sayesinde immün düzenleyici etkileriyle ve membrandaki çeşitli reseptörlerin blokajı ile anti-tümöral etkisini

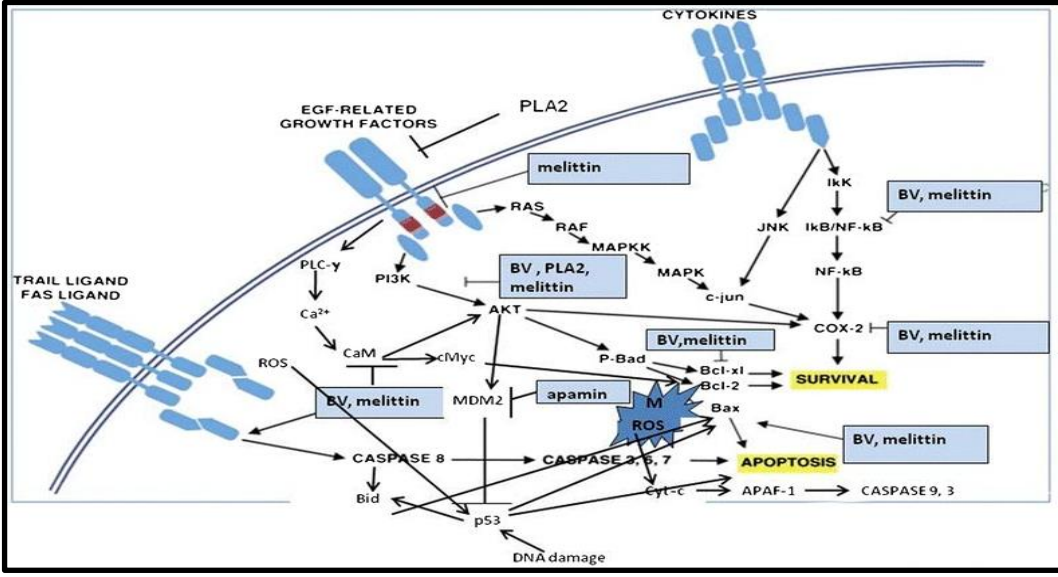
göstermektedir ve bu tümör lizatlarının adjuvan potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Putz, Ramoner, & Gander, 2006). Bunun yanında melittinin bir FLA2 aktivatörü olduğu ve sinerjistik etkilerinin sitotoksik etkilerinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Shier, 1979). PDB'den alınan 3 boyutlu yapısı PyMOL ile renklendirilerek şekil 2.9'da verilmiştir. Ancak zehrin alerjik etkisinden sorumlu bileşenlerinden biri olan FLA2'nin yüksek dozları spesifik olmayan nörotoksik etkilere yol açmaktadır (Ferguson & Duncan, 2009).



Şekil 2. 9 Bal arısı zehrinden elde edilen fosfolipaz A2 3 boyutlu yapısı (PDB ID: 1POC, PyMOL programı ile düzenlenmiştir)

2.2.7 Apamin

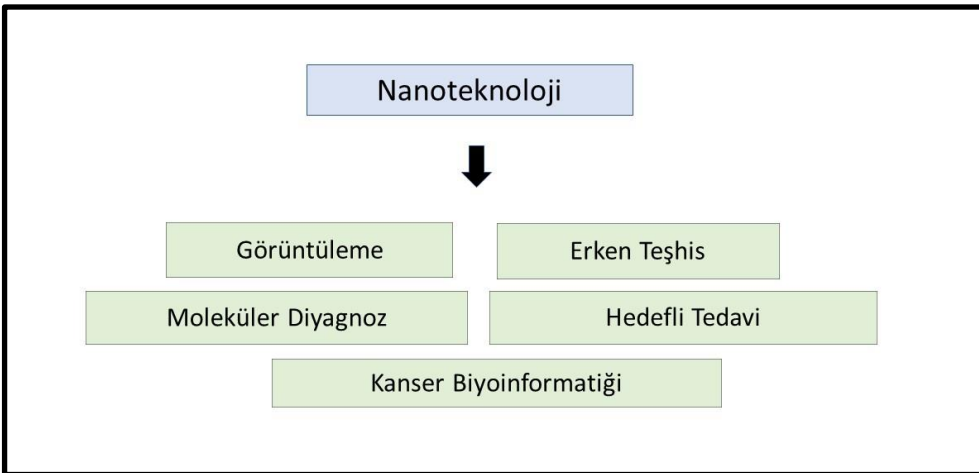
Zehrin en küçük nörotoksini apamin, 18 aminoasit zincirinden oluşan bir peptittir (Wehbe, Frangieh, Rima, Obeid, & Obeid, 2019). C₁NC₂KAPETALC₁ARRC₂QQH aminoasit dizisinden oluşmaktadır (Sistein amino asitlerinin altındaki sayılar disülfid bağlarını göstermektedir) (Moreno & Giralt, 2015). Kan-beyin bariyerini geçebildiğinden ve Ca⁺² bağımlı K⁺ kanallarını bloke edebildiği için sıklıkla nörodejeneratif bozukluklarla ilgili çalışmalarda kullanılmıştır (Gru et al., 2013). Kanseri üzerindeki etkisinin, birçok biyolojik proseste yer alan p53 tümör süpresör proteinin reaktivasyonu ile olduğu düşünülmektedir (şekil 2.10) (Li, Pazgier, Liu, Lu, & Lu, 2009). Kanseri terapisi için p53 aktivasyonu, umut verici stratejilerden birisidir (Wiman, 2010).



Şekil 2. 10 Arı zehri, melittin, fosfolipaz A2 ve apaminin olası etki mekanizmaları (Or, 2012)

2.3 Kanserde Nanoteknoloji

Artan kanser hastaları ve ölümler büyük sağlık problemleri ve ekonomik sorunlara yol açmaktadır. Arı zehri gibi potansiyel biyomolekül odaklı keşifler artsa da, biyomoleküllerin kararsız yapıları (Castillo & Lozano, 2020), kanser hücrelerine ulaşamama ve spesifik olmayan toksisite sebebiyle oluşan yan etkiler kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu etkilerinin üstesinden gelmek için miseller, ilaç konjugatları, nanopartiküller ve nanomalzemeler gibi çok işlevli nanoteknolojik ilaç taşıma sistemleri avantaj sağlayabilir (Barkat et al., 2019; Gajski & Garajvrhovac, 2013; Shaw et al., 2019). Kanserde nanoteknoloji biyoloji, kimya, mühendislik ve tıp alanlarının kesişiminde yer alıyor ve oluşturulacak multidisipliner çalışmaların, kanser teşhis, tedavi ve tespitinde önemli roller alması bekleniyor (şekil 2.11) (Nie, Xing, Kim, & Simons, 2007).



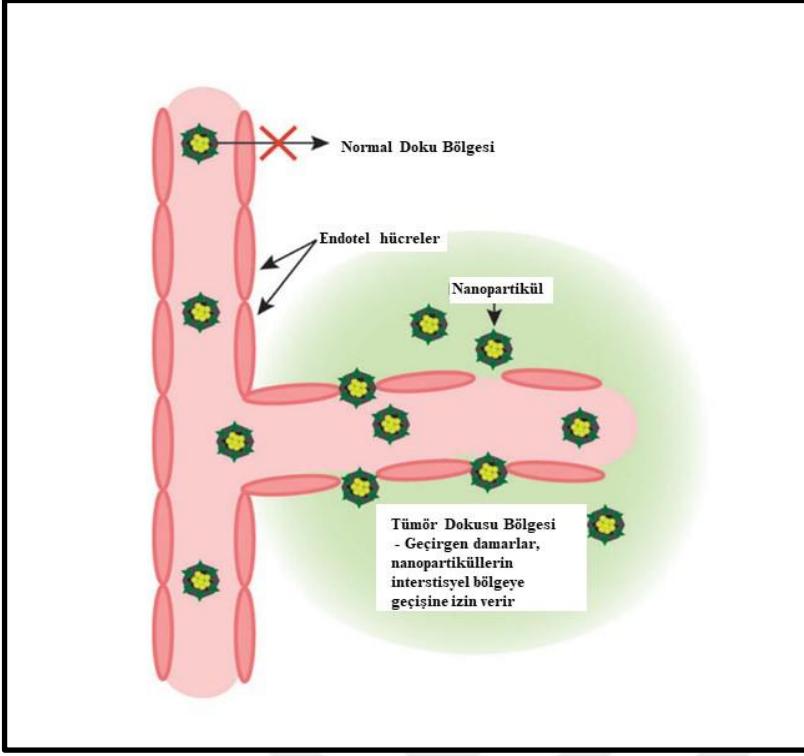
Şekil 2. 11 Özellikle biyomoleküller ile birlikte kullanımıyla birlikte nanoteknolojinin kanserdeki uygulama alanları (Nie et al., 2007)

Son yıllarda, ilaç taşıyıcı sistemler olarak nanopartiküller öne çıkmaktadır. Boyutları 1 – 1000 nm arasında değişen, nanotıpta kanser, ağırlı ve çeşitli bulaşıcı hastalıklarda kullanılan taşıyıcı sistemlerdir (Petros & Desimone, 2010).

Tablo 2. 3 Kanser tedavisi için FDA onaylı nanopartikül ilaçlar (Dang & Guan, 2020)

Ticari Adı	Taşıyıcı Materyal	İlaç	Şirket	Kanser Türü	Onay Yılı
Doxil®	Lipozom – PEG	Doksorubisin	Janssen	Metastatik meme ve yumurtalık kanseri	1995
Eligard®	PLGA	Löprolid Asetat	Tolmar	Prostat Kanseri	2002
Abraxane®	Albümin	Paklitaksel	Celgene	Metastatik Meme Kanseri Pankreas Kanseri	2005 2013
Genexol PM®	mPEG - PLA	Paklitaksel	Samyang Corporation	Metastatik Meme Kanseri	2007
Onivyde®	Lipozom	İrinotekan	Merrimack	Pankreas Kanseri	2015

Nanopartiküller (NP) boyutları sebebi ile hücreye girişte avantaj sağlarlar, bunun yanında tümör damarları, bazal membrandaki anormallikler sebebi ile daha geçirgen bir yapıya sahiptir, bu sayede NP'ler ile birlikte yüksek ilaç konsantrasyonları direkt tümör hücresine verilebilir (Şekil 2.12) (Pu et al., 2019).

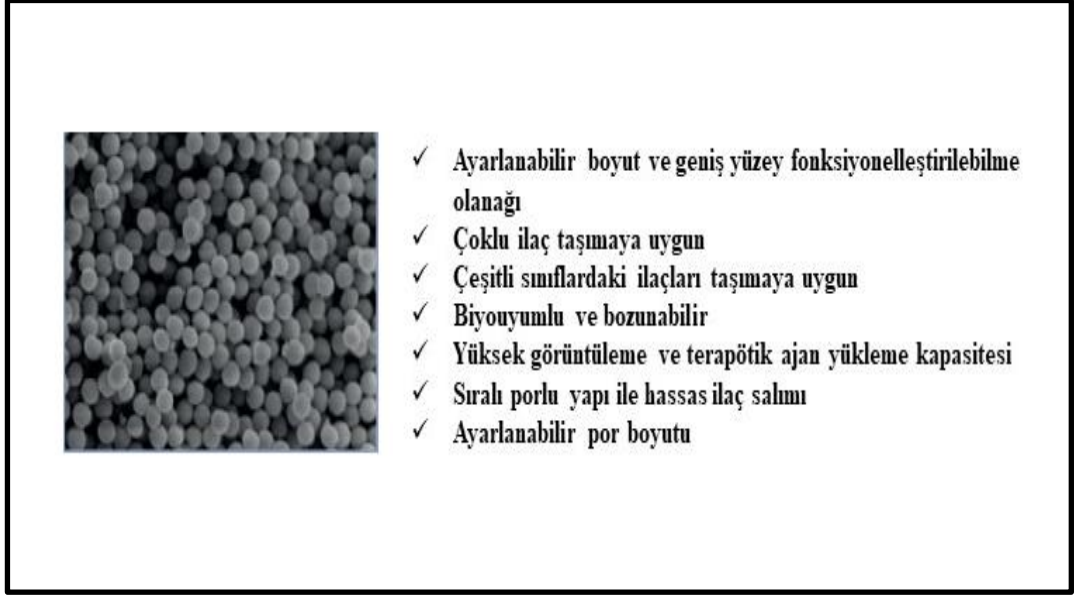


Şekil 2. 12 Tümör dokularındaki artmış geçirgenlik (EPR) etkisi sebebiyle nanopartiküllerin pasif olarak tümörü hedeflemesi (Nie et al., 2007)

Her ne kadar tümör damarlarındaki geçirgen yapı nedeniyle pasif hedefleme başarı gösterse de direkt kötü huylu tümörlerin yüzey reseptörlerinin ve ligandlarının hedeflenmesi daha verimli ve güvenli bir terapi sağlayacaktır. Bu amaçla folik asit, mannoz, transferrin veya VEGF reseptör ligandları gibi ligandlar, ya da antikorlar nanopartiküllere konjuge edilebilir ve hedefli taşıyıcı sistemler geliştirilebilir (Argyio, Weiss, Bra, & Bein, 2014).

2.3.1 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Mezoporlu Silika Nanopartiküller (MSN)

Mezoporlu silika nanopartiküller, ilaçların yüklenmesinde, korunmasında, hedef bölgeye taşınmasında onları ideal nano taşıyıcılar yapan benzersiz özelliklere sahiptirler (Sen & Kettiger, 2018; Vallet-Regí, Colilla, Izquierdo-Barba, & Manzano, 2018). Yüksek yüzey alanları ve por boyutları ile yüksek yükleme kapasitesine, sağlam yapısı, ayarlanabilir yüzey silan kimyası ve morfolojisi ile kontrollü ilaç salımı ve birden fazla ilacı birlikte içerebilme yetenekleri sayesinde kombine tedavilerde kullanılabilmesi kanser tedavisi için diğer nanopartiküller sistemlere göre MSN'leri öne çıkarmaktadır (Şekil 2.13) (Tang, Li, & Chen, 2012).

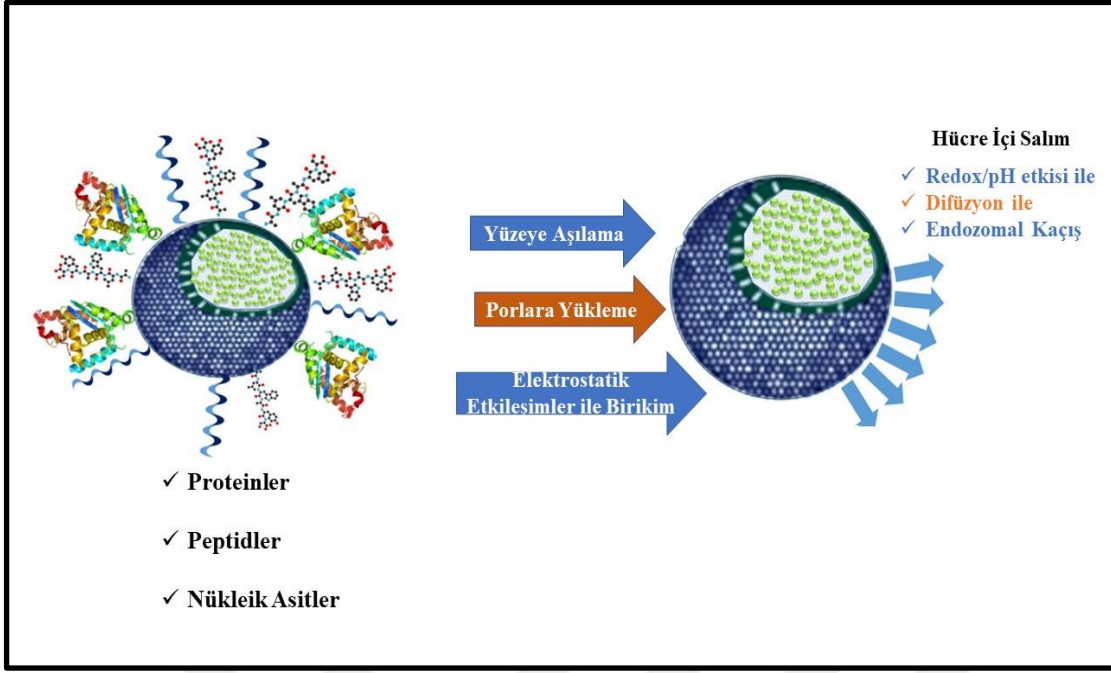


Şekil 2. 13 Mezoporlu silika nanopartiküllerin biyomedikal uygulamardak esnek kullanılabilirliği (Rosenholm, Mamaeva, & Sahlgren, 2012; Zhou, Qian, Wu, Zhang, & Niu, 2018)

Bilinen tüm malzemeler arasında biyouyumlulukları, düşük sitotoksisite ve hemouyumlulukları (Zhao et al., 2011) kimyasal ve biyolojik olarak stabiliteleri mezoporlu silika nanopartikülleri (MSN), biyomoleküller ile birlikte kullanımda öne çıkarmaktadır (Castillo & Lozano, 2020). Çoğu katı nanopartikül bunu sağlamazken, bu gözenekli yapı, kararsız yapıdaki biyomoleküller için konuk-konakçı etkileşimleri ile koruma sağlar. Ek olarak nispeten kolay ve alternatifli sentez koşulları ile ekonomiktirler. (Barkat et al., 2019). Yükleme kapasiteleri ve fonksiyonelleştirilebilir yapıları biyomoleküller ile birlikte birden fazla ilacın yüklenmesine olanak sağlayarak kansere karşı avantaj sağlar (Martínez-carmona et al., 2018).

2.3.2 MSN'ler ile Terapötik Peptidlerin Taşınması

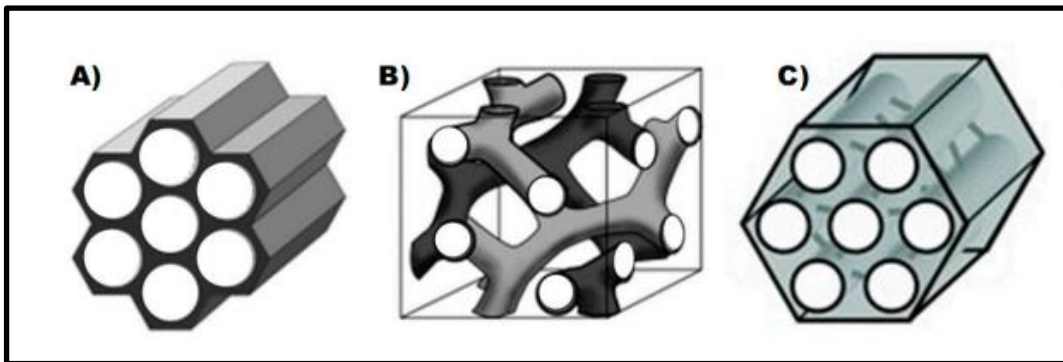
Antikanser peptidlerle kullanıma dair yapılan çalışmalar etkinliklerini ve potansiyellerini göstermektedir (Cruz et al., 2014). Biyomoleküllerin keşfiyle artan bu yeni tedavi stratejilerinde, peptid bazlı tedavilerin kullanımının artmasının ve ilerleme kaydedilebilmesinin, öncelikle arı zehrindeki aktif peptidlere benzer kısa zincirli peptidler ile MSN'lerin kullanıma dair çalışmaların artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Castillo & Lozano, 2020). Bu şekilde peptidler kolayca tatmin edici seviyelerde porlara yüklenebilir ve yüzeylere konjuge edilebilir (Şekil 2.14), ancak daha büyük peptidlerin yüklenmesinde, porlar uygun şekillerde koşullandırılmaz ise yükleme reddi gerçekleşebilir (Balas, Manzano, & Horcajada, 2006). Daha büyük peptidler için daha geniş porlar (Choi, Lim, & Kim, 2020), tiol grupları ile modifikasyon, yüzey yüklerinin hedef peptidlere göre ayarlanması gibi stratejileri araştırılmalıdır.



Şekil 2. 14 Mezoporlu nano silika teknolojisi ile kullanılabilecek ana grup biyomoleküller ve terapötik peptidlerin salım stratejileri (Castillo & Lozano, 2020)

2.3.2 Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin Kimyası

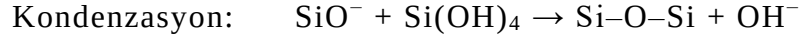
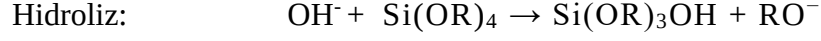
IUPACA göre 2-50 nm sıralı düzenlenmiş por boyutlarına sahip işlevsel malzemeler mezoporlu malzemeler olarak kabul edilirler (Barkat et al., 2019; Trewyn, Slowing, Giri, Chen, & Lin, 2007). Mezoskopik materyalleri sentezleme çalışmaları ilk olarak 1970'lerde başlamıştır. İlk kez 1992'de Mobil Corporation bilim adamları tarafından tek tip gözenek boyutuna ve sıralı mezoporlu yapıya sahip MSN'ler sentezlenmiştir (Kresge, Leonowicz, Roth, Vartuli, & Beck, 1992). MCM-41 olarak adlandırılan bu mezoporlu silika nanopartiküller 2001'de ilk kez ilaç salım çalışmasında kullanılmıştır (Ra, Real, & Pe, 2001). MSN'lerin morfoloji, boyut ve gözenek boyutları silika kaynağı, konsantrasyonlar, pH, sıcaklık, sürfaktanın yapısı ve sentez süresi gibi faktörler ile ayarlanabilir. İlaç salım uygulamalarında ilk keşfediliği ve sentez malzemesi olarak daha çok seçenek sunduğu için MCM-41 tipi MSN'ler tercih edilse de son yıllarda MCM-48, SBA-15, SBA-16'da ilaç salım uygulamalarında araştırılan potansiyele sahip MSN'ler olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.15) (Barkat et al., 2019).



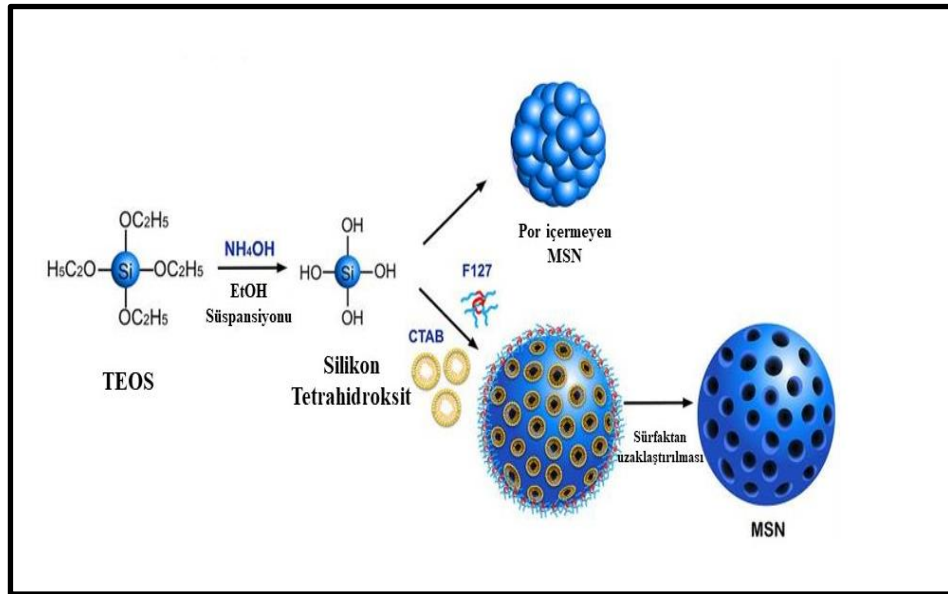
Şekil 2. 15 İlaç salım uygulamaları için sıklıkla kullanılan MSN tipleri A) Altıgen MCM-41 B) Kübik MCM-48 C) Mikroporlu bağlantılara sahip SBA-15 (Mart & Gun, 2018)

2.3.2.1 MSN Sentezi

Biyomedikal uygulamalara uygun nanopartiküller sentezlemek için baz katalizörlü bir sol-jel işlemi kullanılır. Sol jel işlemi organosilan kaynaklarına ihtiyaç duyar. Hidroliz ve kondenzasyon reaksiyonları yoluyla;



Yeni bir fazın (sol) oluşumuna yol açar. Kolloidal parçacıklar daha sonra jel fazına yoğunlaşır (Caruso, Hyeon, Rotello, & Zink, 2012). Silika nanopartikülleri sentezlemek için kullanılan en yaygın yöntemler Stöber'in sentez yöntemi ve mikroemülsiyon yöntemleridir (Selvarajan et al., 2020). Stöber ilk olarak 1968'de bu yöntemi duyurmuştur (Stober, 1968). Bu yöntemde etanol ve amonyum hidroksit (NH_4OH) varlığında polikondenzasyon ve ardından hidroliz reaksiyonlarına giren tetraetilortosilikat (TEOS) kullanılır. O zamandan beri kullanıcının ihtiyacına göre modifiye edilerek kullanılmaktadır (Şekil 2.16). TEOS yerine daha düşük fiyatlı silika kaynakları kullanılabilir (Zulfiqar, Subhani, & Husain, 2018) veya özellikle biyomoleküllerin taşınımı için yüzeyi modifiye edilebilir (Odén, Eriksson, & Rosenholm, 2015). Mezoporları elde etmek için Stöber'in metodu Setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) gibi sürfaktanlarla modifiye edilerek kullanılmaktadır (Wu, Mou, & Lin, 2013).



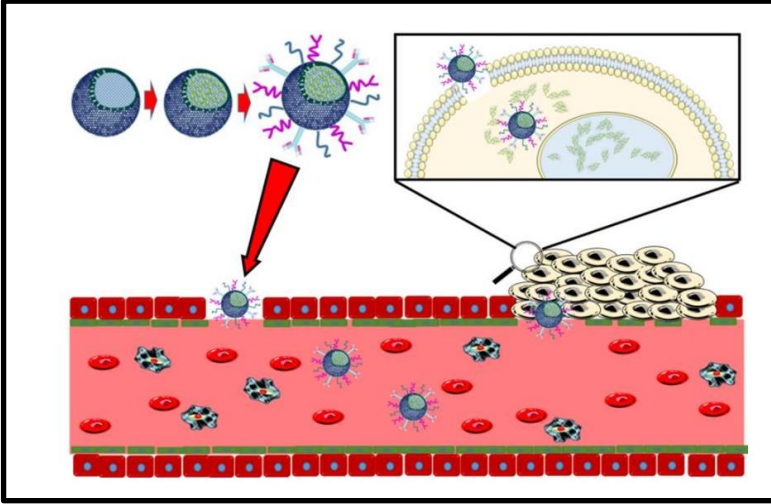
Şekil 2. 16 Stöber methodu ile silika nanopartikül sentezi gösterimi (Selvarajan et al., 2020)

Tipik bir MCM-41 sentezlemek için TEOS, ısıtılmış CTAB içeren bazik (pH:11) solüsyona eklenir ve baz-katalizli sol-jel kondenzasyonu ardından misel yapının etrafında altıgen olarak paketlenmiş nanopartiküller oluşur. Stabilizasyon sağlandıktan sonra, şablon oluşturma ajanı, sürfaktan uzaklaştırılarak MSN'ler elde

edilir, sürfaktan uzaklaştırılırken kalsinasyon veya etanolik ya da asit yıkama sistemleri ile ekstraksiyon yöntemleri kullanılır. (Caruso et al., 2012; Wu et al., 2013).

2.3.2.2 MSN Yüzey Modifikasyonu

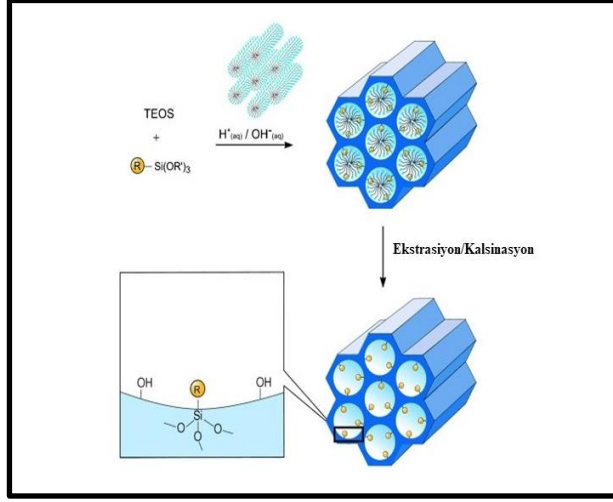
İlaç dağıtımı için etkinin artırılmasında yüzey modifikasyonları gereklidir (Barkat et al., 2019). Taşıyıcının fonksiyonelleştirilebilir olması açısından önem arz etmektedir. MSN'ler tipik olarak yüzeyindeki silanol grupları sayesinde kolay bir şekilde modifiye edilebilirler. MSN'lerde yüzey modifikasyonu koloidal ve kimyasal stabilitesinin geliştirilmesi, hücre hedeflenmesi ve izlenebilmesi (Desai et al., 2014), biyouyumluluğun artırılması (Shen et al., 2014), serum proteinleri ile daha az etkileşim ile kandaki stabilitesi ve yarı ömrün artırılması gibi amaçlarla kullanılabilir (Şekil 2.17). Bunun yanında yüklenecek ilacın veya biyomolekülün stabilitesi, taşınması ve salım kinetiği (C. Park, Oh, Lee, & Kim, 2007) için de önemlidir. Ayrıca modifikasyon yöntemlerine göre MSN morfolojisini de etkilemektedir. Yaygın kullanılan iki yöntem ko-kondenzasyon ve sentez sonrası eklemedir (Argyo et al., 2014).



Şekil 2. 17 MSN'lere yüzey modifikasyonu ile kan uyumluluğu, koloidal stabilite ve hedefli taşıma özelliklerinin sağlanması (Castillo & Lozano, 2020)

2.3.2.3 Ko-kondenzasyon

Farklı fonksiyonel silanol gruplarını MSN'lerin yüzeyindeki silanol gruplarına ko-kondenzasyon yöntemi ile yapı oluşturuşu şablonların varlığında tek kaptaki sentezi mümkündür. Sentez tamamlandıktan sonra şablon çıkarılarak fonksiyonelleştirilmiş silika elde edilir (Şekil 2.18).

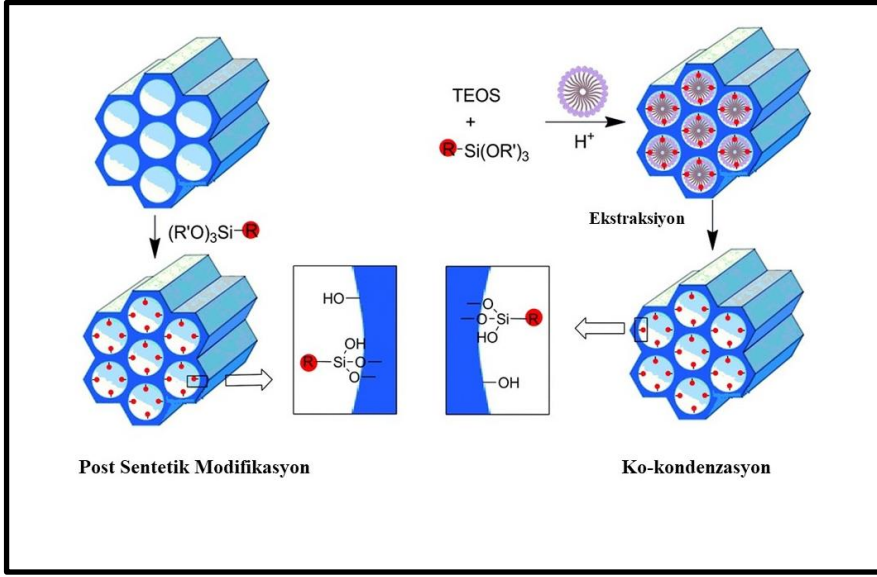


Şekil 2. 18 Ko-kondenzasyon yöntemi ile fonksiyonel grupların mezoporlu silika nanopartiküllere eklenmesi (Hoffmann, Cornelius, Morell, & Fröba, 2006)

Sentez sonrası modifikasyona göre genel olarak daha avantajlı bir yöntemdir (Cheng, Zhao, Zhang, & Liu, 2015). Bu yöntemde fonksiyonel grubu içeren bileşen silika matrisinin doğrudan bir bileşeni olduğundan por kapanma riski düşüktür (Hoffmann et al., 2006). Bu yöntem ile daha düzenli por yapısı ve nanopartiküller elde edilebilir ancak sentez karışımına yüksek miktarda fonksiyonel grup içeren kimyasal eklendiğinde düzensizlik artacaktır. Aynı zamanda bu yöntem ile sentezlenecek nanopartikülün morfolojisi de kontrol edilebilir (Trewyn et al., 2007). Ayrıca çoğu durumda sürfaktan fonksiyonel grup eklendikten sonra uzaklaştırıldığı için, zarar vermemesi adına genellikle kalsinasyon yerine ekstraksiyon yöntemleri kullanılmalıdır.

2.3.2.4 Sentez Sonrası Modifikasyon

Sentez sonrası (post sentez) modifikasyon çoğunlukla nanopartikül yüzeyinde olmak üzere fonksiyonel grupların konjugasyonunu içerir (Selvarajan et al., 2020). Fonksiyonelleştirme sentezden sonra yapıldığı için bu yöntem ile mezoporlu silika nanopartiküllerin yapısı büyük oranda korunur. Şekil 2.19’da ko-kondenzasyon ve sentez sonrası modifikasyon yöntemlerinin karşılaştırmalı görseli verilmiştir. Ancak eklenecek gruplar porları belirli oranlarda kapayabilir, düzensiz gözenek boyutlarına sebep olabilir (Lim & Stein, 1999). Hatta yüksek seviyeleri porları tamamen kapatabilir (Hoffmann et al., 2006). Bu sebeple kullanılacak fonksiyonelleştirici silan grubu tipi ve seviyeleri iyi ayarlanmalıdır. Bunun yanında sürfaktan uzaklaştırılmadan da yalnızca dış yüzeyin fonksiyonelleştirilebileceği de bildirilmiştir. Bu da dış yüzeyin seçiciliği için önemlidir (Trewyn et al., 2007).



Şekil 2. 19 Mezoporlu silika nanopartiküllerin Post sentetik ve ko-kondenzasyon yöntemleri ile fonksiyonelleştirilmesinin şematik gösterimi (Cheng et al., 2015)

Literatürdeki bilgiler ışığında, ülkemizde yetişen Anadolu bal arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) zehrinin, mezoporlu silika nanopartiküllere yüklenerek kanser üzerindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmaktadır. Çalışmada elde edilecek sonuçların, mezoporlu silika nanopartiküllerin zehir peptidlerini taşıma potansiyeline, ülkemiz arıcılık sektörüne ve bilinen yetersiz yöntemlerin aksine daha uygun tedavi seçenekleriyle kanserin tedavisine katkı sağlaması beklenmektedir.

3. MATERYAL METOD

3.1 MATERYAL

3.1.1 Arı Zehri

Hücre kültürü ve silika nanopartikül sentez çalışmalarında kullanılacak arı zehri örneği, Arsum tarafından Ankara bölgesindeki Anadolu arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) içeren kovanlardan toplanmış ve laboratuvarımızdaki çalışmalar için verilmiştir.

3.1.2 Silika Nanopartikül Sentez Çalışmaların Kullanılan Malzemeler

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Sigma, ABD), tetraethylorthosilicate (TEOS) (Merck, ABD), sodyum hidroksit (Sigma, ABD), Etanol (Merck, ABD), HEPES (Sigma, ABD), Dipotasyum Fosfat (Sigma, ABD), Mono Potasyum Fosfat (Sigma, ABD), (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) (Sigma, ABD), Floresan İzotiyosiyanat (FITC) (Sigma, ABD), Amonyum nitrat (Sigma, ABD), Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, ABD). Erlen, santrifüj tüpleri (15, 50 mL), vialler (1,5, 4 mL), pipet uçları (10, 100, 1000 μ L, 5 mL), geri soğutucu, schlenk flask (ISOLAB, Türkiye).

3.1.3 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler

Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco, ABD), Tripsin-EDTA (%0,25) (Gibco, ABD), penisilin/streptomisin (Gibco, ABD), fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, ABD), 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) (Sigma, ABD), Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Gibco, ABD), HEPES (Sigma, ABD), Doxorubicin (Sigma, ABD), Etoposide (Sigma, ABD), Sıvı Azot %99 saflıkta (EgeVet, Türkiye) dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD), 4',6-Diamidino-2-Fenilindol dihidroklorür (DAPI) (Sigma Aldrich, ABD), Invitrogen eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit (Invitrogen, ABD), neubaer lamı (Marienfeld, GmbH, Almanya), Tripan mavisi (Sigma, ABD), Triton X-100 (VWR, ABD), 6 gözlü ve 96 gözlü mikroplyet (Corning, ABD), T-flask (25 cm² , 75 cm²), tek kullanımlık plastik malzeme (15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpü, pipet, petri, kriyotüp vb.) (Kırgen, USA).

3.1.4 Cihazlar

Sınıf 2 laminar akışlı biyogüvenlik kabini (ESCO, Singapur), Sınıf 2 laminar akışlı biyogüvenlik kabini (ThermoFisher Scientific, ABD), CO₂'li İnkübatör (ThermoFisher Scientific, ABD), BD Accuri C5 flow sitometri (BD Biosciences, ABD), Soğutmalı Santrifüj (Eppendorf, Almanya), Soğutmalı Mikro Santrifüj (Mikro 200R) (Hettich, GmbH, Almanya), 96 gözlü spektrofotometre (ThermoFisher Scientific, ABD), - 86 °C dondurucu (ThermoFisher Scientific, ABD), -20 °C derin dondurucu (Uğur, Türkiye), ES-20 Orbital shaker inkübatör (Biosan, Türkiye) +4 °C buzdolabı (Arçelik, Türkiye), inverted mikroskop (Zeiss, ABD), ışık mikroskobu (Olympus, Hamburg, Almanya), DM4000 B LED Floresan Mikroskobu (Leica, Wetzlar, Almanya), Vorteks Karıştırıcı (ThermoFisher Scientific, ABD), Zetasizer (Malvern, UK), Ultrasonik banyo (ISOLAB, Türkiye).

3.2 METOD

3.2.1 Arı Zehri Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Çalışmalarda kullanılacak zehrin protein içeriğinin belirlenmesi için Pierce™ BCA kiti kullanıldı (Hartfelder et al., 2015; Thermo Scientific, 2020). Smith ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemde, proteinlerin Biüret reaksiyonu sonucu Cu⁺²'yi Cu⁺¹' e indirgemesi sonucu bikinkoninik asit (BCA) ile 562 nm'de renk vermesi prensibine dayanmaktadır (Smith et al., 1985). Çalışmada, pH:7.2 fosfat tamponunda çözölen arı zehri, 96 gözlü mikroplyet kit protokolüne göre analiz edildi. Standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı.

3.2.2 Mezoporlu Silika Nanopartiköl Sentezi

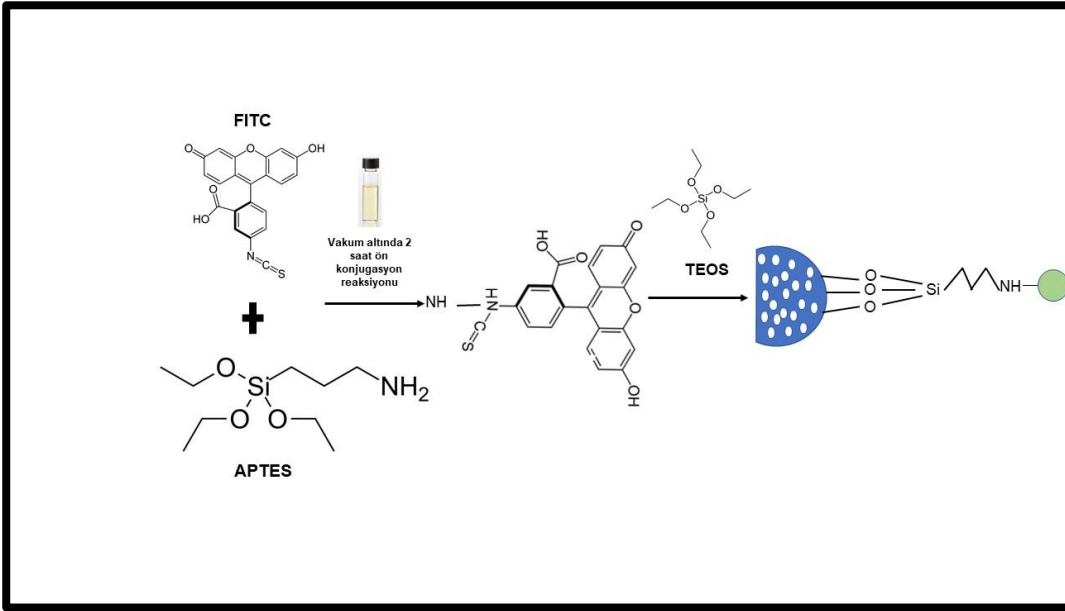
3.2.2.1 Florofor Konjuge Mezoporlu Silika Nanopartiköl Sentezi (MSN)

Yapıyı oluşturmak için sürfaktan olarak cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), etanolik bazık sulu çözeltide çözöldü. Silika kaynağı olarak tetraethylorthosilicate (TEOS) kullanıldı. Sentezde kullanılan kimyasalların mol oranları 1TEOS:0.122CTAB:0.31NaOH:72.3EtOH:946H₂O şeklindeydi (Desai et al., 2014). Nanoparçacıklara floresan özellik kazandırmak için, silika kaynağının %10'u olacak şekilde (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) ve APTES'in

molünün 1/30'u FITC eklendi. APTES, FITC ve 2 mL etanol (EtOH) 2 saat vakum altında ön konjugasyon reaksiyonuna sokulduktan sonra sentez karışımına eklendi. 33 °C'de damla damla TEOS eklendi ve 450 rpm' de 2 saat sonrasında MSN'lerin oluşumu beklenildi, ardından yaklaşık 16 saat MSN oluşumu stabilizasyonu için karıştırma işlemi devam ettirildi (Şekil 3.1). Ertesi gün karışım eşit miktarlarda falkonlara paylaştırıldı ve %2'lik etanolik amonyum nitrat ekstraksiyon solüsyonu ile santrifüj ve ultrasonik banyo ile CTAB'ın uzaklaştırılması sağlandı. Oluşturulmak istenen MSN yapısal şematik gösterimi, şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3. 1 FITC-konjuge Mezoporu Silika Nanopartikül (MSN) Sentezi Düzeneği



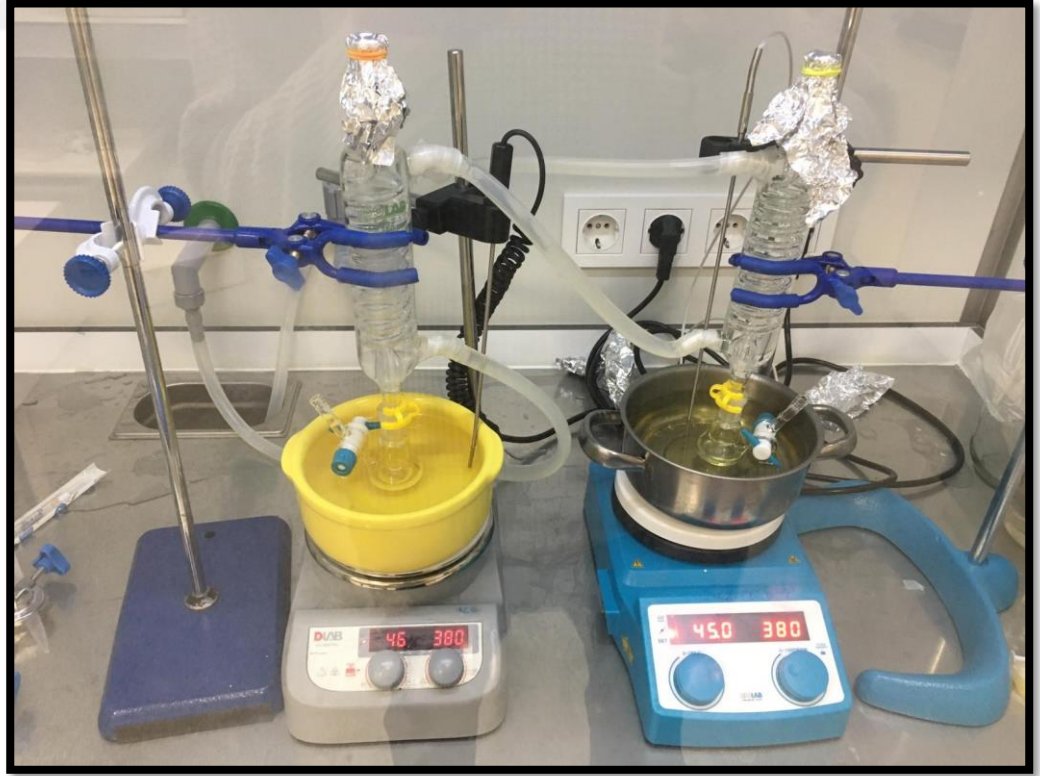
Şekil 3. 2 Oluşturulması planlanan MSN % 10 APTES-FITC şematik gösterimi

3.2.2.2 FITC İçermeyen Mezoporlu Silika Nanopartikül Sentezi (MSN)

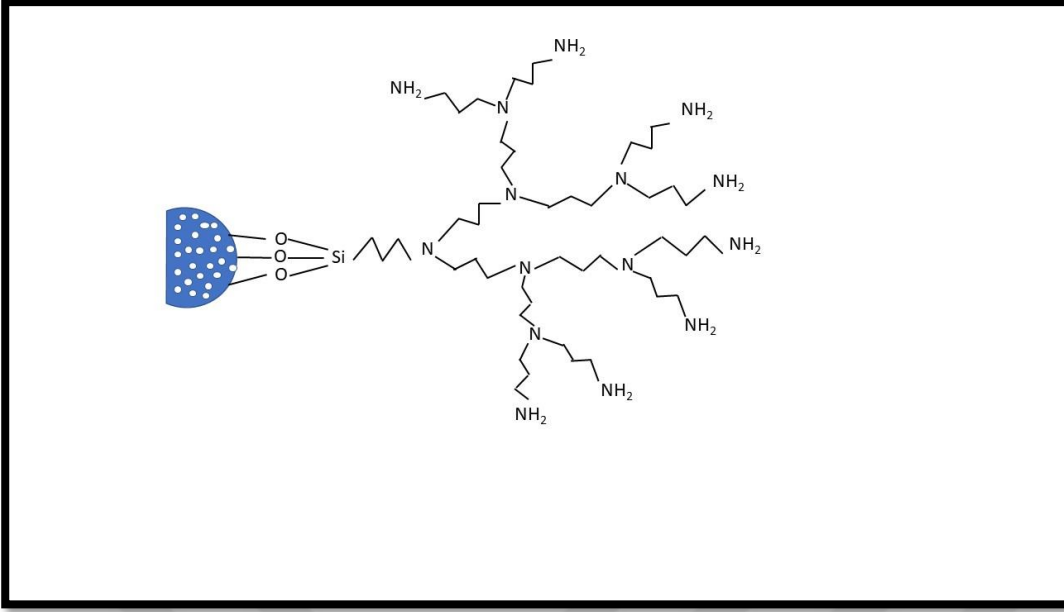
Yapıyı oluşturmak için sürfaktan olarak cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), etanolik bazik sulu çözeltide çözüldü. Silika kaynağı olarak tetraethylorthosilicate (TEOS) kullanıldı. Sentezde kullanılan kimyasalların mol oranları 1TEOS:0.122CTAB:0.31NaOH:72.3EtOH:946H₂O şeklindeydi. CTAB ve NaOH, distile su ile çözüldükten sonra EtOH eklendi. Ardından APTES eklendi ve 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş TEOS damla damla eklenerek, 33 °C'de 450 rpm' de 2 saat sonrasında MSN'lerin oluşumu beklenildi ve 16 saat karışmaya bırakıldı. CTAB'ın uzaklaştırılması için FITC-MSN'ler ile aynı protokol uygulandı.

3.2.3 Florofor Konjuge Mezoporlu Silika Nanopartikül Sentezi (MSN) ve Yüzey Modifikasyonu

Nanoparçacıklar yukarıda tarif edilen yöntemle göre %1 (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) içerecek şekilde ve APTES'in molünün 1/3'ü FITC olacak şekilde sentezlendi. Ertesi gün %2'lik etanolik amonyum nitrat ekstraksiyon solüsyonu ile CTAB uzaklaştırıldıktan sonra MSN'lerin yüzey modifikasyonu gerçekleştirildi. Yüzey modifikasyonunda 50 mg MSN için 50 µL aziridine, 5 µL asetik asit kullanıldı ve gece boyu 45 °C'de geri akış altında çeker ocakta karıştırıldı (Şekil 3.3). Ardından bol miktarda EtOH ile yıkanarak, 24 saat kurutmaya bırakıldı (Desai et al., 2016). Oluşturulmak istenen amin modifiye yüzeyin şematik gösterimi şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3. 3 Mezoporlu Silika Nanopartikül (MSN) Yüzey Modifikasyon Çalışmaları Düzeneği



Şekil 3. 4 Yüzey modifikasyonu sonucu oluşturulması amaçlanan MSN-PPI şematik gösterimi

3.2.4 Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin (MSN) Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.4.1 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Kurutulan MSN'ler, 200 µg/mL olacak şekilde HEPES tamponunda (pH:7,2 25 mM) 20 dakika boyunca ultrasonik banyoda 5 dakikada bir vortekslenerek dağıtıldıktan sonra, uygun kuvvetlerde zeta potansiyeli ve dinamik ışık saçılımı ile MSN'lerin yük ve hidrodinamik çapı araştırıldı.

3.2.4.2 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile Boyut ve Morfoloji Karakterizasyonu

Kurutulan örnekler altın kaplama yapıldıktan sonra, çeşitli voltaj ve büyütmelemlerde görüntüleri alındı. MSN'lerin yüzey morfolojisi analiz edildi ve düzenli bir yapıya sahip olup olmadığı değerlendirildi.

3.2.5 Mezoporlu Silika Nanopartiküllere Arı Zehri Yükleme

%10 APTES içeren MSN (MSN-%10 APTES) ve %1 APTES içeren modifiye edilmiş MSN (MSN-FITC-PPI)'lerin ağırlığının, %5, 10, 20,50 ve 100'üne denk gelecek şekilde fosfat tamponu (pH:7,2 12 mM) içerisinde arı zehri solüsyonları hazırlandı ve fosfat tamponunda ultrasonik banyo yardımı ile 20 dakika boyunca dağıtılan nanopartiküller ile karıştırılarak 1 saat boyunca vialler içerisinde manyetik karıştırıcı (400 rpm) ile oda sıcaklığında yüklemeye bırakıldı. Arı zehri çözündürülürken içerdiği protein ve peptidlerin zarar görmemesi için sonikasyonun 1 dakikayı geçmemesine dikkat edildi (Suh & Cho, 2015). Yükleme çalışmaları steril olmayan koşullarda yapıldı. Absorpsiyon izotermeleri belirlendikten sonra bölüm 3.2.7'de belirttiği şekilde sterilize edilerek hücrelere uygulandı. Ardından 8000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatanttaki yüklenmeyen zehir peptidleri BCA kiti (ThermoFisher Scientific, ABD)

kullanılarak kontrollerle kıyaslanarak yüklenme kapasitesi belirlendi. Denemelerde kit protokolü uygulandı (Thermo Scientific, 2020). Protein standardı olarak BSA kullanıldı.

3.2.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

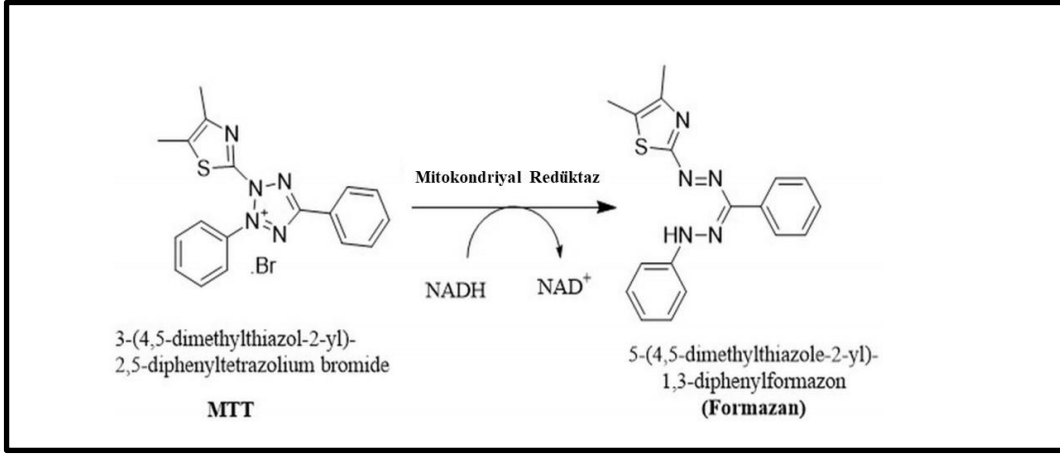
Çalışmada, ham zehir, arı zehri yüklü nanopartiküller ve yüklenmemiş nanopartiküllerin *in vitro* testleri CCD34-Lu (insan sağlıklı akciğer fibroblast hücresi), tümörojenik olmayan HEK-293 (insan embriyonik böbrek hücreleri), MDA-MB 231 (insan meme adenokarsinoma), PC3 (insan prostat adenokarsinoma), HeLa (insan serviks adenokarsinoma) hücreleri üzerinde yapıldı. Hücreler ATCC'den temin edilmiş olup stoklarımızda bulunmaktadır. Stoktan çıkarılan hücreler DMEM / F12 (%10 FBS, %1 L-glutamin, %0,1 penisilin-streptomisin ve 1 mM HEPES) besi ortamı içerisinde 37 °C, CO₂'li inkübatörde inkübe edilerek devamlılığı sağlandı. Hücrelerin mikoplazma kontrolleri DAPI boyama ile yapıldı. Hücrelerin besi ortamları iki günde bir değiştirildi, hücreler kültür kabının yüzeyini kapladıklarında pasajlandı. Testlerde logaritmik fazdaki hücreler kullanıldı.

Pasajlama işlemi için, kültür ortamı aspire edildikten sonra 1 ml tripsin/EDTA ile flask yüzeyi iyice yıkandı. Ardından 1 mL tripsin/EDTA eklenerek yaklaşık 5 dakika 37 °C, CO₂'li inkübatörde inkübe edilerek hücreler flasktan kaldırıldı. Ardından hücreler, 5 mL ortam ile toplanarak gerekli oranda dilüe edildi. 75 cm² 'lik flask için 10-15 mL taze ortam ile kültür devam ettirildi.

Hücre stokları oluşturmak için sağlıklı ve yoğun hücrelere tripsinazasyon işlemi uygulandıktan sonra santrifüj tüplerine alındı. +4 °C, 1000 rpm, 5 dk santrifüjlenerek çöktürülen hücrelerin üzerine %10 DMSO ve %90 FBS içeren karışım eklendi ve 1'er mL olacak şekilde kriyotüplere aktarıldı. Hızlı bir şekilde -86 °C'ye götürülerek 1 gece bekletildikten sonra sıvı azot tanklarımızda bekletildi.

3.2.7 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Arı zehri, mezoporlu silika nanopartiküller (MSN) ve zehir yüklü silika nanopartiküllerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) testi kullanıldı (Mosmann, 1983). Kolorimetrik test canlı hücrelerdeki hücresel süksinat dehidrogenazlarla MTT'nin formazan kristallerine dönüştürülerek renk oluşumu prensibine dayanmaktadır (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5 MTT'nin formazana dönüşüm reaksiyonu (Farooq, Mazhar, Ghouri, Ul-Haq, & Ullah, 2020)

MTT testi sağlıklı insan hücre hatları CCD34-Lu tümörojenik olmayan HEK-293, MDA-MB 231, PC3, HeLa hücreleri üzerinde yapıldı. Hücreler 1×10^4 hücre/göz olacak şekilde 96 gözlü mikropalaklara ekildi ve 24 saat boyunca %5 CO₂ ve %95 nem içeren atmosferde 37 °C'de inkübe edildi. Ardından 1 saat boyunca ultraviyole (UV) ışık altında sterilize edilen MSN'ler filtreden geçirilmiş fosfat tamponunda (pH:7,2 12mM) 20 dk boyunca dağıtıldıktan sonra, 1 saat zehir yükleme işlemi yapıldı. Bu işlemin ardından MSN ve zehir yüklü MSN'ler ependorflara alınarak santrifüjlenip (8000 rpm 10 dk), HEPES (pH:7,2 25mM) tamponuna geçirildi. Ultrasonik banyo ile dağıtılan MSN ve zehir yüklü MSN'ler 5-100 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda hücrelere eklenerek 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreler mikroskop ile incelendikten sonra ortam aspire edildi ve PBS ile yüzeyleri yıkanarak MSN'ler uzaklaştırıldı. Ardından her göze 100 µL ortam ve 10 µL (5 mg/mL) MTT eklenerek 2-4 saat 37 °C'de ışıktan korunarak inkübe edildi. Sonrasında ortam uzaklaştırılarak 150 µL DMSO eklenerek, formazan kristallerin çözülmesi sağlandı ve 570 nm dalgaboyunda UV-vis 96 gözlü mikropalakaya uygun spektrofotometrede absorbansları okutuldu. Kontroller ile kıyaslanarak % canlılık değerleri belirlendi. IC₅₀ hesaplamaları için Graph Pad Prism 5 programı kullanıldı.

3.2.8 Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Hücre İçi Alım Testleri

3.2.8.1 Flow Sitometri ile Hücre İçi Alım Testleri

Bu ve sonraki çalışmalarda, sitotoksikite testleri sonuçlarımız ve literatürdeki bilgiler ile zehrin PC3 ve MDA-MB 231 hücrelerindeki daha yüksek sitotoksik etkisi, bunun yanında prostat ve meme kanserlerinin rastlanma sıklıklarının daha yüksek olması sebebiyle bu hücreler ile devam edilmiştir (Şekil 2.2). PC3 ve MDA-MB 231 hücreleri 6 gözlü plakaya $2,5 \times 10^5$ hücre/mL olacak şekilde 2 mL ekildi. 24 saat, %5 CO₂, 37 °C ve nemli atmosferde inkübe edildi. Ardından 1 saat boyunca ultraviyole (UV) ışık altında sterilize edilen MSN'ler filtreden geçirilmiş fosfat tamponunda (pH:7,2 12mM) 20 dk boyunca ultrasonik

banyo ile dağıtıldıktan sonra, 1 saat MSN ağırlığının %20'sine denk gelen zehir miktarı (300 µg/mL) ile yükleme işlemi yapıldı. Bu işlemin ardından MSN ve zehir yüklü MSN'ler ependorflara alınarak santrifüjlenip (8000 rpm 10 dk), HEPES (pH:7,2 25mM) tamponuna geçirildi. Ultrasonik banyo ile dağıtılan MSN ve zehir yüklü MSN'ler 10-100 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda hücrelere eklenerek 4 ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreler PBS ile iyice yıkandıktan sonra tripsinize edildi ve 2000 rpmde 5 dk çöktürüldü. 1 kez PBS ile yıkandı ve ardından ekstraselüler floresanı gidermek için 20 µg/mL tripan mavisi ile yaklaşık 5 dakika muamele edildi. 500 µL PBS ile süspanse edilip, flow sitometride (Accuri C5, BD) ölçümler alındı. Nanopartiküller FITC içerdiği için yeşil floresan değişimleri, FL1 (525 nm – yeşil) ile analiz edildi. Medyan floresan değerleri (MFI) FlowJo (Versiyon X) ile hesaplandı.

3.2.8.2 Floresan Mikroskopu ile Hücre İçi Alım Testleri

PC-3 ve MDA-MB 231 hücreleri %70 etanol ile sterilize edilmiş lamel içeren 6 gözlü plakalara 2×10^5 hücre/mL olacak şekilde 2 mL ekildi. 24 saat, %5 CO₂, 37 °C ve nemli atmosferde inkübe edildi. Flow sitometri sonuçları sonucu seçilen 50 µg/mL MSN ve zehir yüklü MSN'ler daha önce bahsedilen hazırlama işlemlerine göre hazırlandı ve ortam aspire edildikten sonra gözlere eklendi. 4 saat ve 24 saat nanopartiküller ile %5 CO₂, 37 °C ve nemli atmosferde inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda, hücreler 1 mL PBS ile yıkandı. 1 mL MeOH ile -20 °C'de 30 dakika fiksasyonu sağlandı. 30 dakika sonunda MeOH aspire edildi ve boyanın girebilmesi için 1 mL %0,2 Triton X ile 5 dakika titretilerek muamele edildi. PBS ile yıkandı ve sırasıyla %70'lik etanol ve %100'lük etanolden geçirildi. Dikkatlice bir enjektör ucu yardımıyla kaldırılan lameller, alkol ile iyice temizlenmiş ve 10 µL (0,1 µg/mL) DAPI damlatılmış lamaların üzerine hücreleri içeren yüzeyi kapatılarak +4 °C'de 30-35 dk boyanması sağlandı ve floresan mikroskobu ile incelenerek görüntüleri alındı.

3.2.9 Arı Zehri, Floresan Boya İçermeyen Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Ham zehir, arı zehri yüklü ve yüklenmemiş mezoporlu silika nanopartiküllerin, hücre canlılığı ve ölümüne olan etkilerini belirlemek amacıyla fosfatidil serine afinitesi yüksek, kalsiyum bağımlı, fosfolipid bağlayıcı bir protein olan apoptotik hücre markırı FITC konjuge Aneksin V boyama yöntemi kullanıldı. Öncelikle logaritmik fazdaki PC3 ve MDA-MB 231 hücreleri 6 gözlü plakalara $2,5 \times 10^5$ hücre/mL ekildi ve 24 saat %5 CO₂, 37 °C ve nemli atmosferde inkübe edildi. İnkübasyonu takiben, FITC içermeyen MSN'lere daha önce bahsedilen sterilizasyon ve hazırlama işlemleri uygulandı. Ortam aspire edildikten sonra 100 µg/mL ve 50 µg/mL MSN, zehir yüklü MSN ve MSN içerisindeki eşlenik peptid miktarı 4,41 µg/mL arı zehri hücrelere eklendi. 24 saat inkübe edildi (%5 CO₂, 37 °C, %95 nem). Daha sonra kit protokolüne göre, ilk olarak süpernatantlar uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkanarak, tripsinize edildi. Ardından süspanse hale gelen hücreler toplanarak 3 kez 500 µL PBS ile 2000 rpm, 5 dk, 4 °C'de

yıkandı. Bu işlemleri takiben 100 µL Binding Buffer (1x) eklendi, süspanse hücrelere 1 µL FITC konjuge Aneksin V eklendi ve 15 dk karanlıkta inkübe edildi. Ardından 2 kez PBS ile yıkandı ve 200 µL PBS eklenerek flow sitometride (Accuri C5, BD) FL1 (525 nm - yeşil) ile analiz edildi.

3.2.10 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkilerinin Belirlenmesi

Bir hücrenin sağlıklı kalabilmesi, mitokondrisinin ATP üretebilmesi için mitokondriyal membran potansiyelini koruması gerekmektedir. Apoptoz, sırasında mitokondriyal geçirgenlik artarak, elektrokimyasal gradyan kaybı ile mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) azalır (Sivandzade Farzane, Bhalerao Aditya, 2019). MMP'deki değişimleri gözlemlemek için mitokondriye girebilen lipofilik, katyanik tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür (JC-1) boyası kullanıldı. Logaritmik fazdaki PC3 ve MDA-MB 231 hücreleri 96 gözlü pleytlere 10^5 hücre/mL ekildi ve gece boyu %5 CO₂, 37 °C ve nemli atmosferde inkübe edildi. Daha önceki bölümlerde anlatıldığı şekilde nanopartiküllere ve zehire sterilizasyon ve hazırlama işlemleri uygulandıktan sonra, JC-1 kit sağlayıcısının önerdiği şekilde boyanmadan önce, zehir yüklü nanopartikül, yüklenmemiş nanopartikül ve arı zehri, hücrelere uygulandı (Abcam, 2021) ve 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda hücreler bir kez PBS ile yıkandıktan sonra, 10 µM JC-1 ile yaklaşık 25 dakika 37 °C'de inkübe edildi (Liao et al., 2018). 1 kez PBS ile yıkandı, ardından PBS eklenerek floresan spektrokopisinde 475 nm ile uyarılan hücrelerin, 590 nm' de kırmızı emisyonları ve 530 nm'de yeşil emisyonları alındı. Ayrıca floresan mikroskobu ile hücrelerin yeşil ve kırmızı ışımaları görüntülendi. Görüntüler 20x büyütme ile alınmıştır ve ölçek çubukları 100 µm, ImageJ programı ile eklenmiştir.

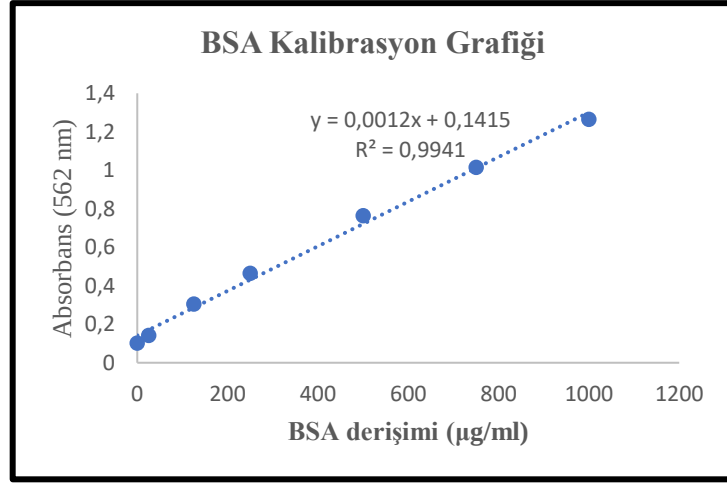
3.2.11 İstatiksel Analiz

Veriler 3 tekrarlı yapılan deneylerden elde edildi. İstatiksel analizler, Graph Pad Prism v5 ve Office Excel ile yapıldı. Kontrollere kıyasla farkın anlamlılığı, One Way ANOVA ve Dunnet Çoklu Karşılaştırma Testi ile yapıldı. Verilerin birbiri arasındaki anlamlılık Student t testi ile karşılaştırdı. Tüm testlerde, *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001 farklılıklar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Arı Zehri Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Arı zehrinin protein içeriğinin belirlenmesi için +4 °C'de kuru şekilde saklanan zehir pH:7.2, 12 mM fosfat tamponunda çözüldükten sonra, Pierce™ BCA kiti ile analiz edildi. Oluşturulan BSA kalibrasyonu ile (Şekil 4.1), zehrin yaklaşık %60'ının proteinden oluştuğu gözlemlendi (Tablo 4.1).



Şekil 4. 1 Pierce™ BCA Protein Assay Kit içerisindeki BSA standartları ile hazırlanıp oluşturulan BSA Standart Grafiği

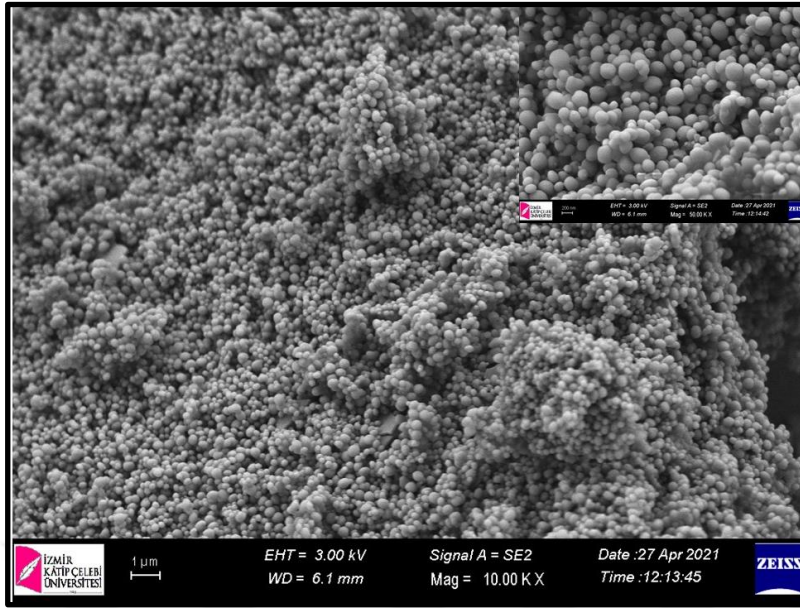
Tablo 4. 1 Arı zehrinin Pierce™ BCA kiti ile belirlen protein miktarı

Arı Zehri (µg/mL)	Total Protein Miktarı (µg/mL)	Arı Zehrindeki % Protein Miktarı
600	354,6 ± 6,7	~ 60

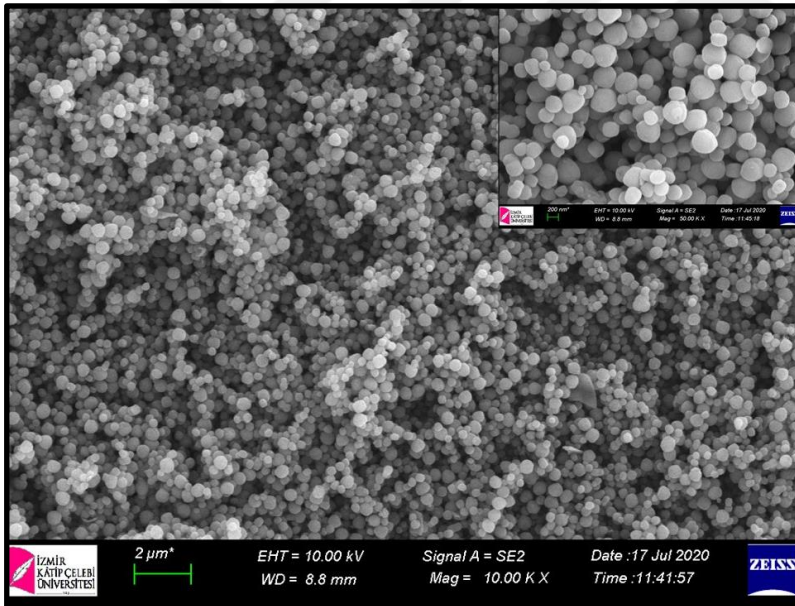
4.2 Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin (MSN) Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Ko-kondenzasyon yöntemi ile MSN %10 APTES sentezi sonucu ve post-sentetik yüzey modifikasyonu ile oluşan MSN-FITC-PPI'ların şematik gösterimleri Şekil 3.2 ve Şekil 3.4'teki olduğu, pH:7.2 25 mM HEPES tamponu içerisinde yapılan zeta potansiyel analizleri sonucu elde edilen pozitif yükleri ile gösterilmiştir (Tablo 4.2). DLS ile ortalama hidrodinamik çapları belirlenmiştir (Tablo 4.2) ve Şekil 4.2'de SEM görüntüleri ile monodispers, düzenli silika nanopartiküllerin elde edildiği görülmektedir.

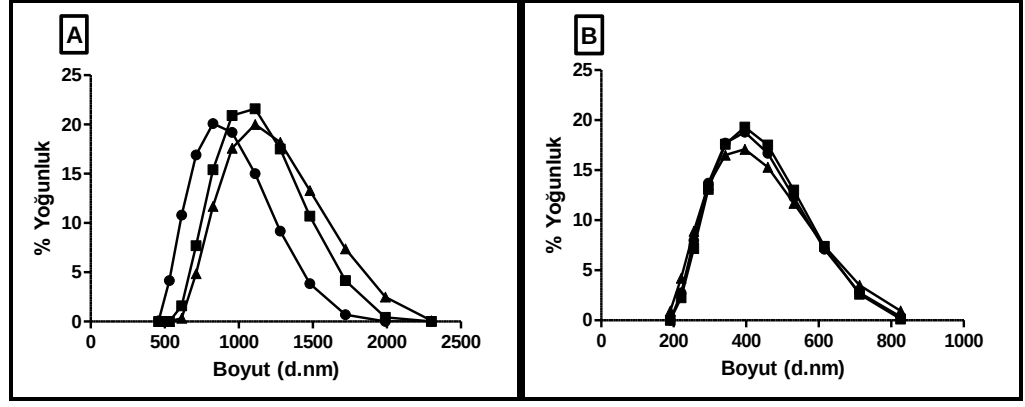
MSN %10 APTES – FITC



MSN – FITC - PPI



Şekil 4. 2 Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri



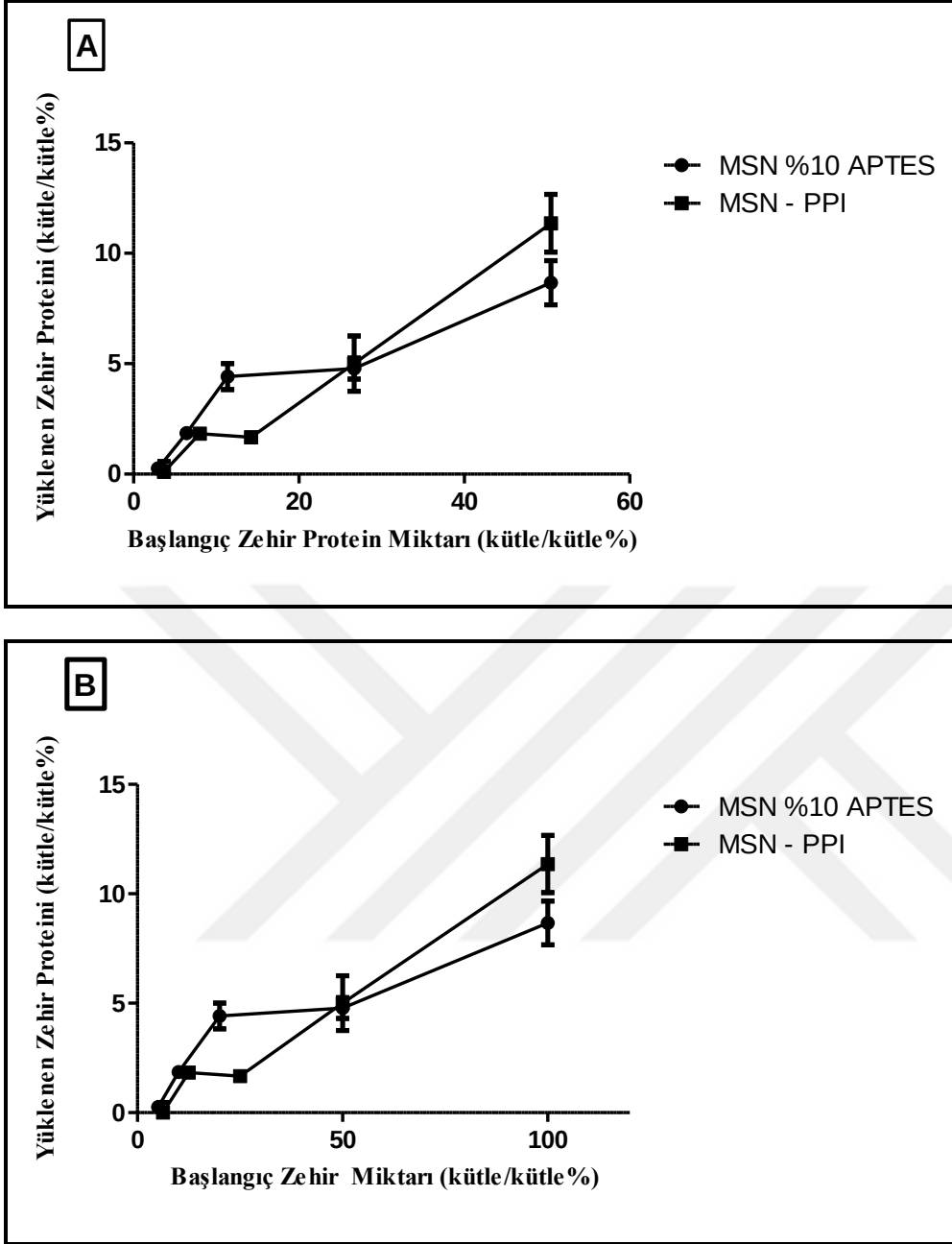
Şekil 4. 3 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile MSN'lerin ortalama hidrodinamik çaplarının belirlenmesi A) MSN %10 APTES - FITC B) MSN %1 APTES

Tablo 4. 2 MSN'lerin HEPES tamponu içerisindeki hidrodinamik çap (nm) ve zeta potansiyel (mV) sonuçları

Örnekler	PDI	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)
MSN %10 APTES - FITC	0,273	1151 ± 206,3	15,1 ± 5,43
MSN-FITC - PPI	0,251	1394,5± 227,6	8,28 ± 0,42
MSN %1 APTES	0,086	376,5±7,16	-6,44 ± 0,381

4.3 Mezoporlu Silika Nanopartiküllere Arı Zehri Yüklenmesi

Çalışmalarda kullanılacak optimum yüklenmeyi araştırmak için MSN'lerin ağırlığının %1-100'üne denk gelen zehir miktarları ile yüklemeler yapıldı. Zehrin etkisinin içerdiği peptidlerden kaynaklandığı düşünüldüğü için Pierce™ BCA Protein Assay kit ile süpernatanttaki protein miktarları, BSA kalibrasyonu ile ölçülerek yüklenme verimleri hesaplandı (şekil 4.1), elde edilen grafikler şekil 4.6'da verilmiştir. MSN %10 APTES için %20 lik başlangıç zehri ile optimum yüklenme verimi elde edilirken benzer oranlardaki yüklenme verimi MSN-FITC-PPI ile MSN'in ağırlığının %50'sine denk gelen başlangıç zehrinde bulunmuştur. Sonraki çalışmalar için zehir yüklenirken bu oranlar kullanılmıştır. Bu grafiklerden hesaplanan % verim değerleri MSN %10 APTES için yaklaşık %39 ve MSN-PPI için yaklaşık %19 olarak bulunmuştur (Tablo 4.2).



Şekil 4. 4 Adsorpsiyon izotermi A) Başlangıç total zehir proteinine karşılık nanopartiküle yüklenen protein grafiği B) Başlangıç zehir miktarına karşılık yüklenen zehir proteinin grafiği

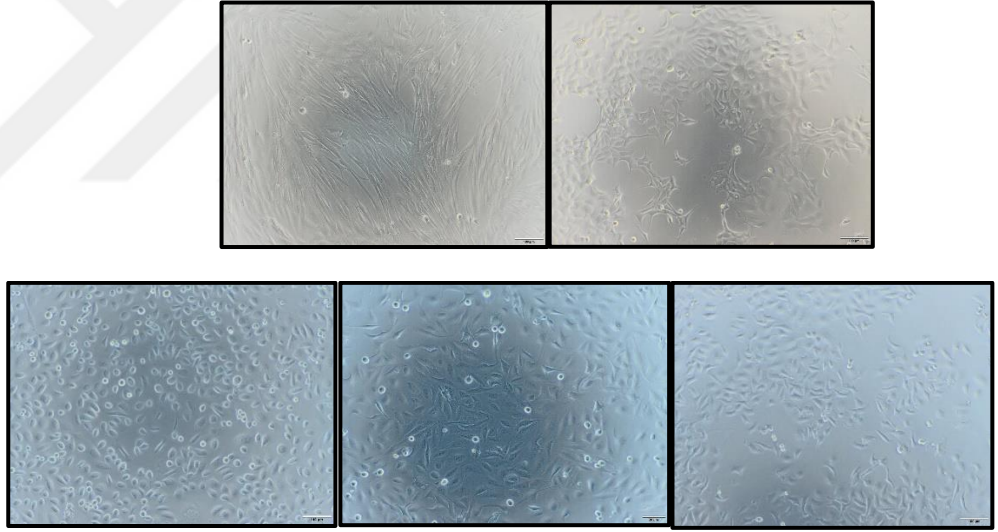
Elde edilen grafiklerin sonucundan hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak zehir yükleme parametreleri Tabo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4. 3 Yükleme çalışmalarında kullanılacak zehir miktarları ve verimleri

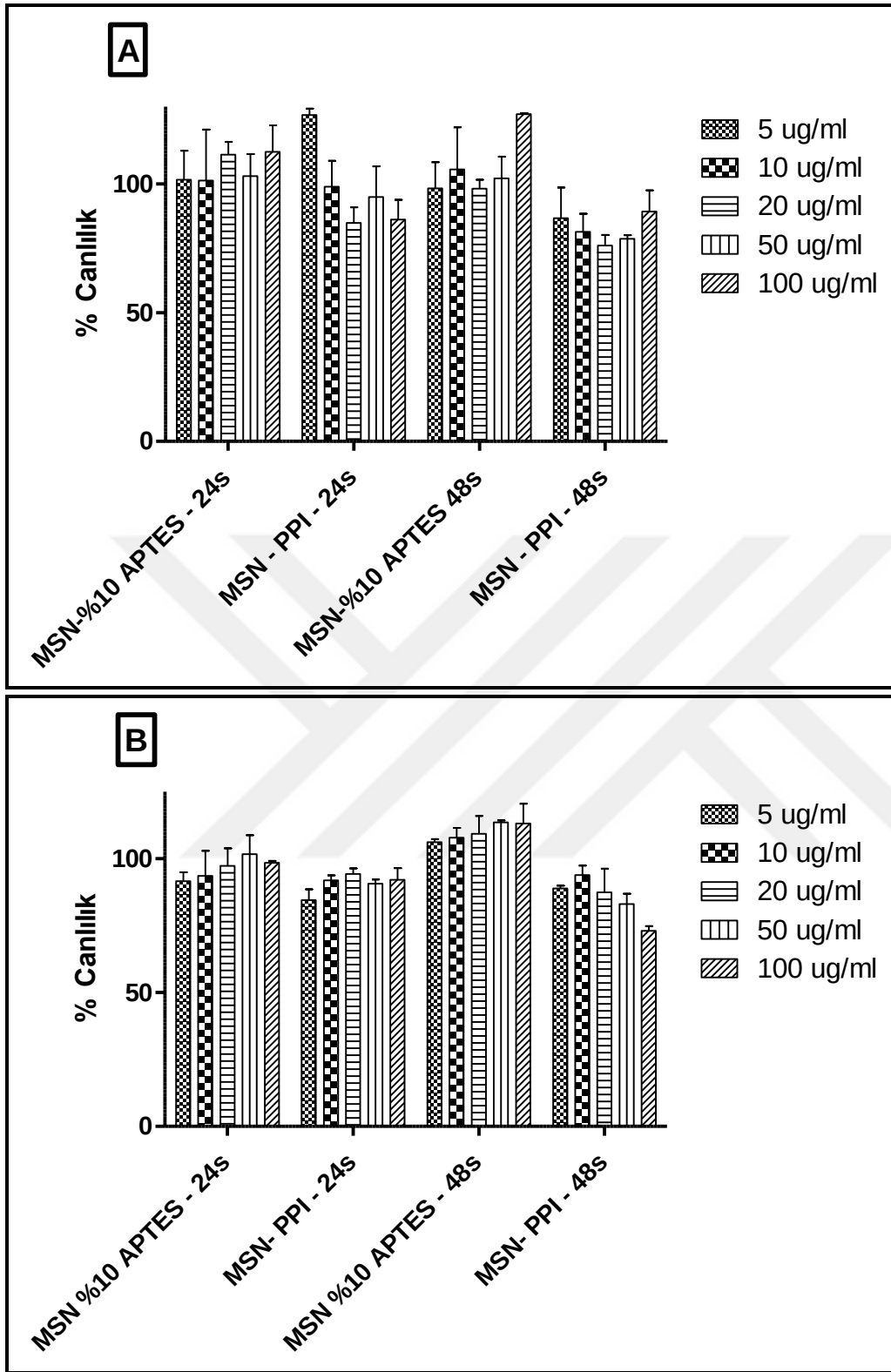
	Başlangıç Zehir Proteini (w/w%)	Başlangıç Zehir Miktarı (w/w%)	Yüklenen Zehir Proteini (w/w%)	Başlangıç Zehir Proteinine Kıyasla % Verim
MSN %10 APTES	11,37±0,3	20	4,42±0,6	~38,9
MSN-PPI	26,6 ±0,3	50	5 ±1,25	~18,8

4.3 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

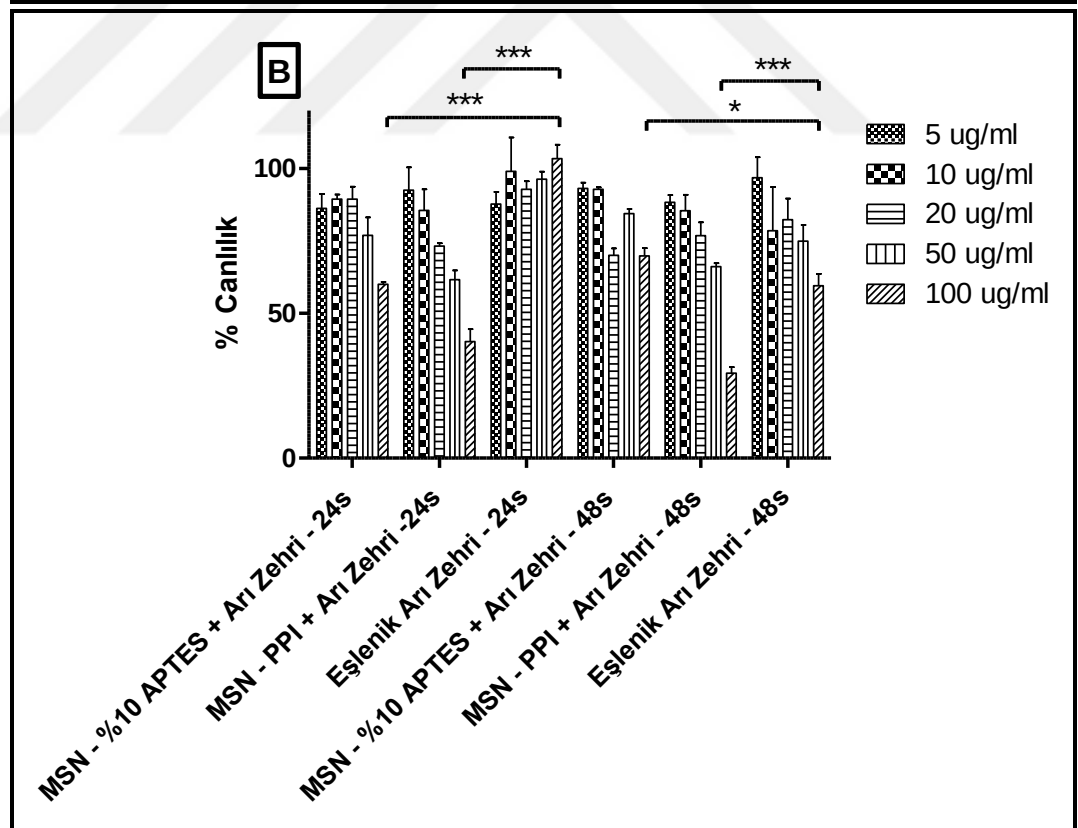
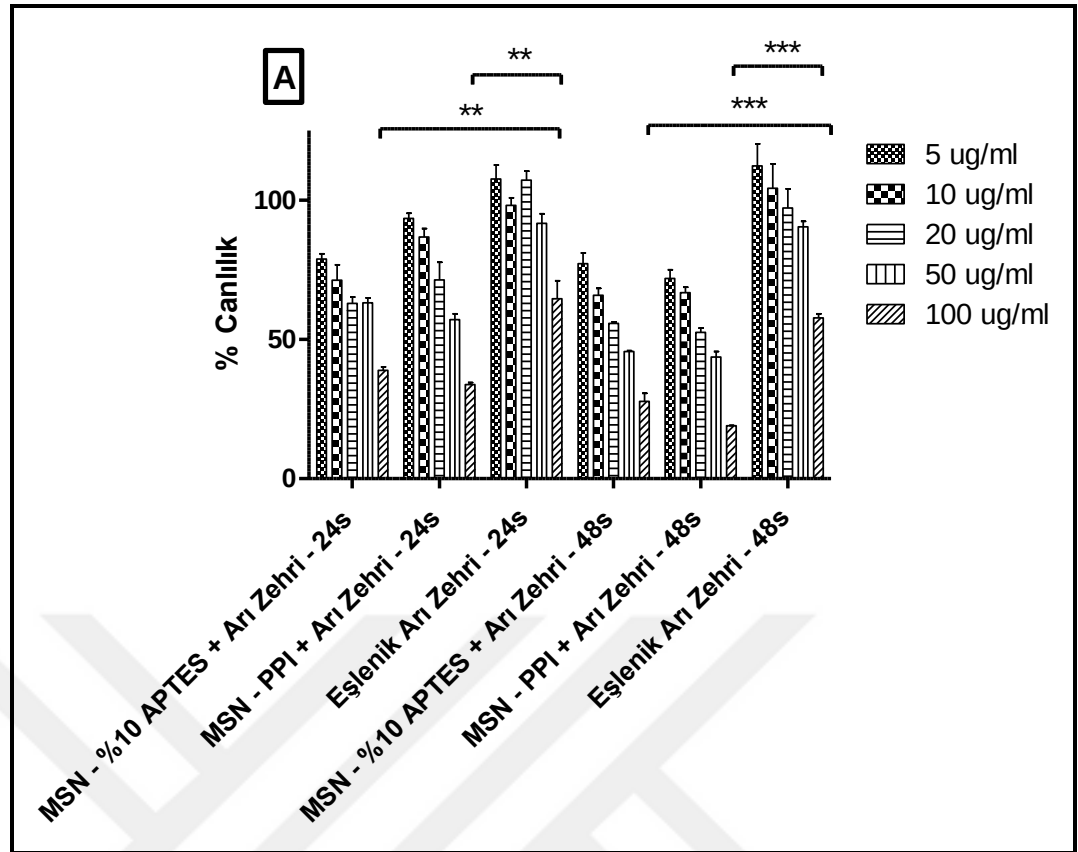
Çalışmada kullanılan nanopartiküllerin tümörojenik olmayan hücre hattı HEK-293 ve sağlık akciğer hücreleri CCD34Lu üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlendi ve % canlılık grafikleri oluşturuldu. Çalışmada kullanılan hücrelerin görüntüleri şekil 4.5'te verilmiştir. Kullanılan mezoporlu silika nanopartiküllerin 24 ve 48 saatlik uygulamalarında sağlıklı hücreler üzerinde önemli sitotoksik etkileri gözlenmedi (Şekil 4.6).

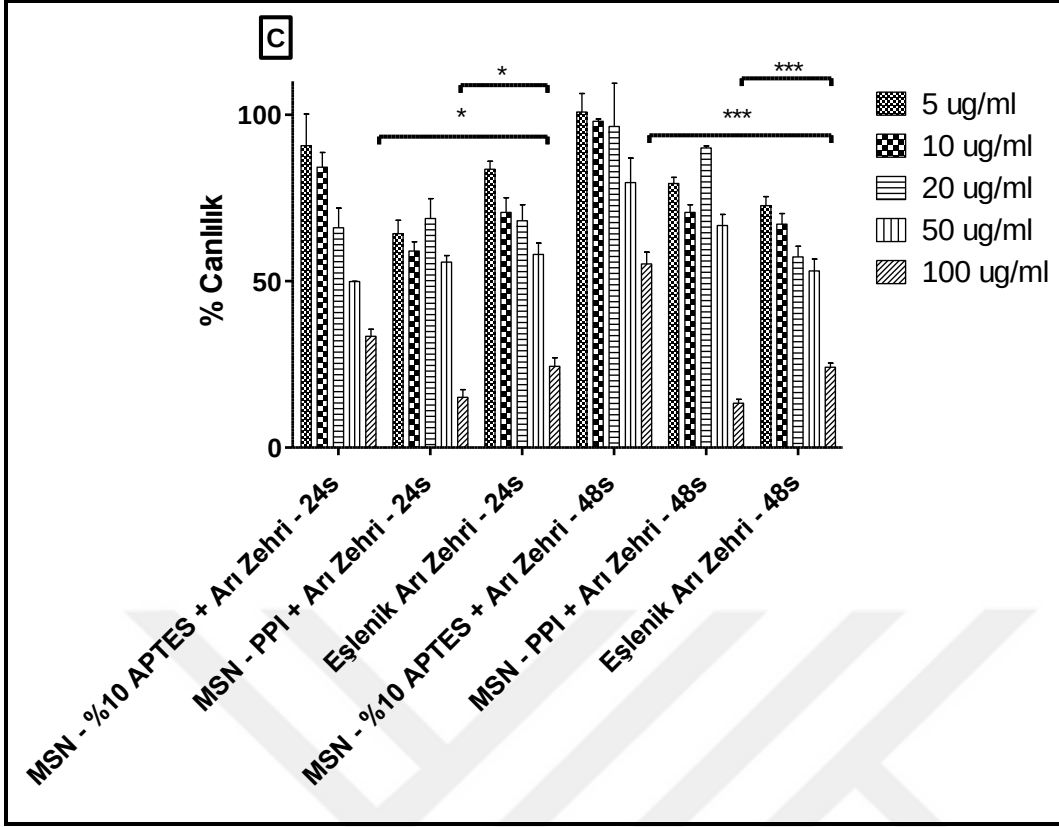


Şekil 4. 5 Testlerde kullanılan hücrelerin inverted mikroskop ile alınmış görüntüleri, yukarıda soldan sağa sağlıklı hücreler CCD34Lu, HEK293 ve aşağıda kanser hücreleri PC3, MDA-MD 231, HeLa (10x büyütme, Ölçek çubuğu: 100 µm)



Şekil 4. 6 MSN %10 APTES ve MSN-PPI nanopartiküllerin sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri % canlılık grafiği A) HEK293 (insan embriyonik böbrek hücreleri) ve B) CCD34Lu (sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri)





Şekil 4. 7 Arı zehri yüklü nanopartiküller ve yüklenen eşlenik zehir miktarlarının 24 ve 48 saatlik % canlılık grafikleri A) MDA-MB 231 meme kanseri hücreleri, B) HeLa serviks kanseri hücreleri, C) PC3 prostat kanseri hücreleri (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

Sağlıklı hücrelerde denenen konsantrasyonlarda önemli etki göstermeyen MSN'lerin zehir yüklü halleri ve içerisindeki eşlenik zehirlerin karşılaştırmalı etkileri değerlendirildi. MDA-MB 231, HeLa ve PC3 kanser hücre hatlarına karşı yapılan testlerde MDA-MB 231 hücrelerinde zehrin nanopartiküllerle birlikteki etkisi daha yüksekti (Şekil 4.6A). HeLa hücrelerinde eşlenik zehir miktarlarında herhangi sitotoksik etki gözlenmezken MSN %10 APTES ile 24 saatte yüksek konsantrasyonlarda önemli düşüş gözlemlendi. Zehir yüklü MSN-PPI ise 24 ve 48 saatte de yüksek sitotoksik etkiye sahipti (Şekil 4.6B). PC3'de 24 saatte MSN %10 APTES + zehir ve MSN-PPI + zehir, eşlenik zehir konsantrasyonları ile benzer etki gösterdi. 48. Saatte MSN-PPI+zehir ve eşlenik zehir konsantrasyonları benzer etkiye sahipken, MSN%10 APTES + zehir daha az sitotoksik etki gösterdi (Şekil 4.6C). Bu grafikler ile elde edilen IC₅₀ değerleri Tablo 4.4 ve Tablo 4.5' te verilmiştir.

Tablo 4. 4 Arı zehrinin nanopartiküllerin içerisindeki eşlenik zehir miktarları ile kanser hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri (µg/mL)

	MDA-MB 231	PC3	HeLa	HEK-293	CCD34Lu
Arı Zehri - 24 saat	> 4.41	1.95 ± 0.27	-	-	-
Arı Zehri - 48 saat	> 4.41	1.40 ± 0.22	> 4.41	37.50± 0.13	8.20±1.53

* Tümörojenik olmayan HEK-293 ve sağlıklı CCD34Lu hücrelerindeki etkisi, eşlenik zehir miktarlarından farklı olarak 50, 5 ve 0,5 µg/mL konsantrasyonlarında ve 48 saat muamele edilerek denenmiştir.

Tablo 4. 5 Arı zehri yüklü nanopartiküllerin kanser hücrelerine uygulanması sonucu nanopartiküllerin içerisindeki %50 canlılığı inhibe eden zehir konsantrasyonları (sonuçlar µg/mL olarak verilmiştir)

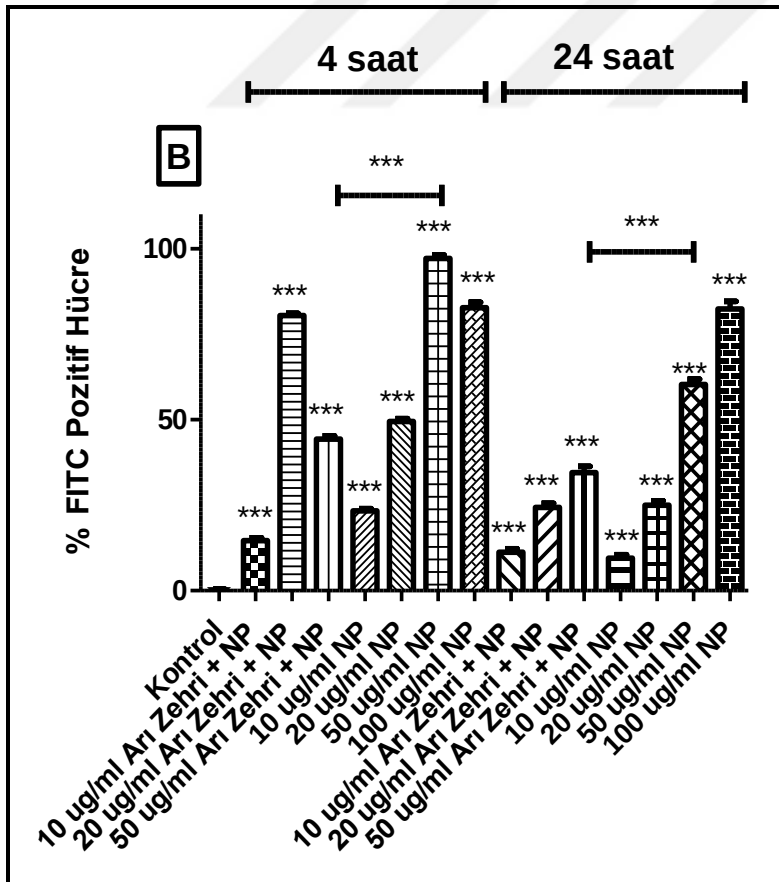
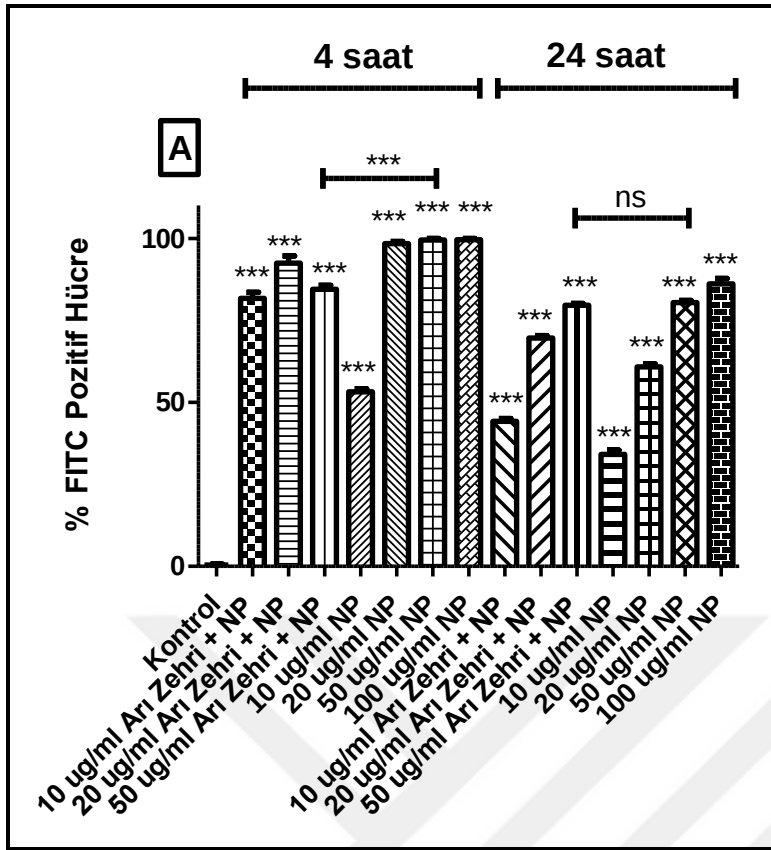
	MDA-MB-231	PC3	HeLa
Arı Zehri - 24s - MSN - APTES	2.95 ± 0.11	2.04 ± 0.28	-
Arı Zehri - 48s - MSN - APTES	1.32 ± 0.12	-	-
Arı Zehri - 24s - MSN-PPI	1.41 ± 0.22	1.22 ± 0.27	3.17 ± 0.22
Arı Zehri - 48s - MSN-PPI	1.03 ± 0.03	2.19 ± 0.22	2.76 ± 0.17

* IC₅₀ değerleri, %0 sitotoksositeye sahip kabul edilen kontrol grubuna kıyaslanarak belirlenen % canlılık değerlerine karşı, uygulanan dozların logaritması ile doğrusal olmayan regresyon ve doza bağımlı inhibisyon analizleri ile Graphpad Prism v5’de hesaplanmıştır. Tablo 4.5’te MSN içerisindeki eşlenik zehir miktarları, MSN’lerin IC₅₀ değerleri hesaplandıktan sonra % yüklenme verimleri ile hesaplanmıştır.

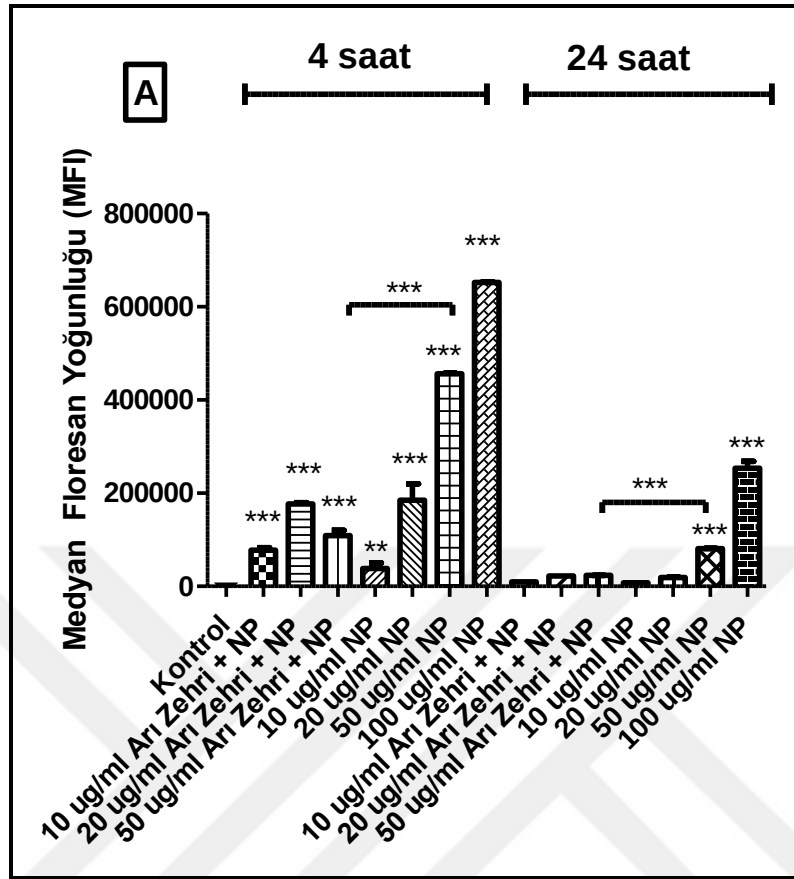
4.4 Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Hücre İçi Alım Testleri

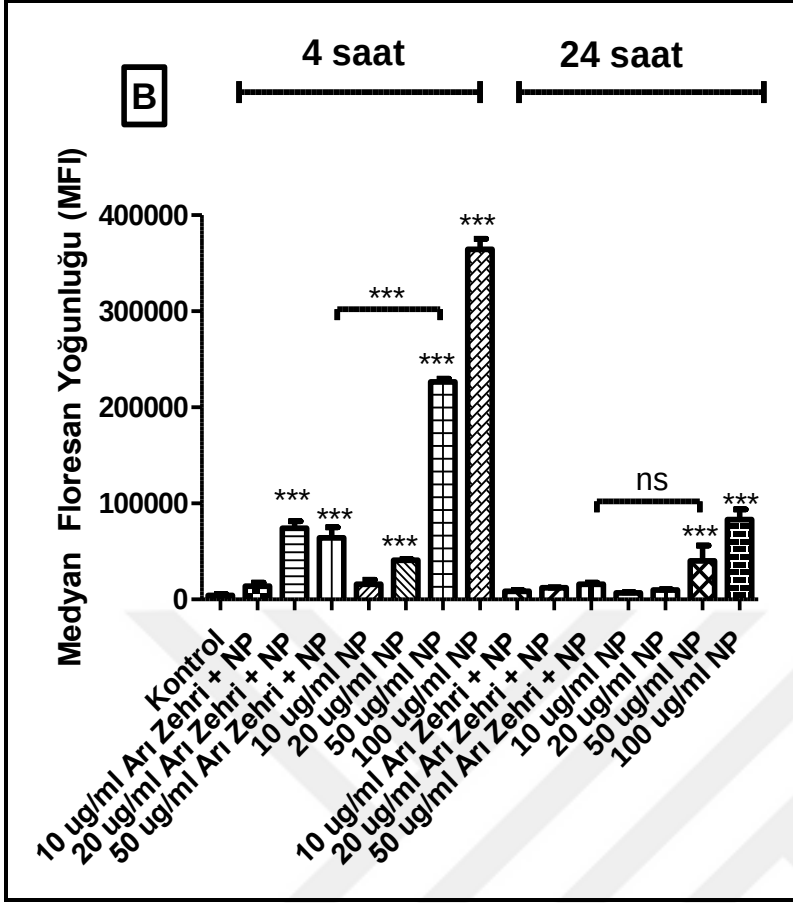
4.4.1 Flow Sitometri ile Hücre İçi Alım Testleri

Sitotoksosite testlerinin ardından tasarlanan nanopartiküllerin FITC ile izlenebiliyor olması sayesinde flow sitometri ile hücre içine alınıp alınmadıkları incelendi. MSN-PPI’ ın aynı özelliklere sahip FITC içermeyen hallerinin sentezi deneme girişimleri başarısız olduğu için sonraki denemelerde yalnızca MSN %10 APTES kullanıldı. Ve daha yüksek etki görülmesi sebebiyle PC3 ve MDA-MB 231 hücre hatları kullanıldı. Flow sitometri sonuçlarına göre 4 saat ve 24 saat uygulama sonrasında zehir yüklü ve zehir yüklü olmayan nanopartiküllerin yüksek düzeylerde hücre içine alındığı görülmüştür. Ek1.1’ de flow sitometri sonuçları ve sonuçlar sonucunda elde edilen % FITC pozitif hücrelerin sütun grafikleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Ardından, geniş histogramlardaki sapmaları engelleyebilmek adına (Shin, Kwak, Lee, & Lee, 2020), FlowJo ile piklerin medyan değerleri hesaplanmış ve şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.8 MSN %10 APTES – FITC 4 saat ve 24 saat muamele sonrası % hücre içine alım grafikleri
A) MDA-MB 231 B) PC3 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)



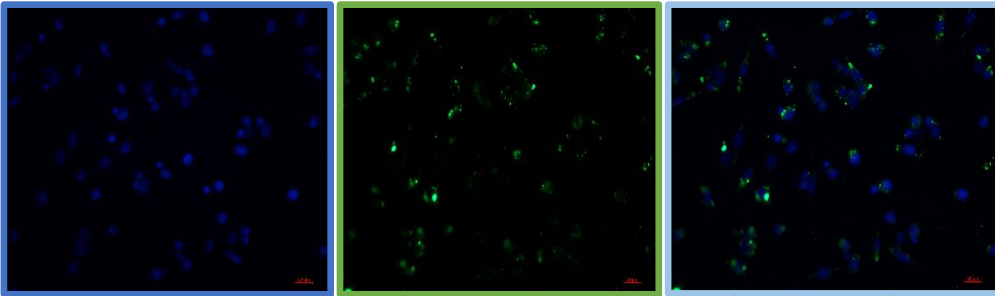


Şekil 4. 9 MSN %10 APTES – FITC 4 saat ve 24 saat muamele sonrası medyan floresan yoğunluğu (MFI) değerleri ile hücre içine alım grafikleri A) MDA-MB 231 B) PC3 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

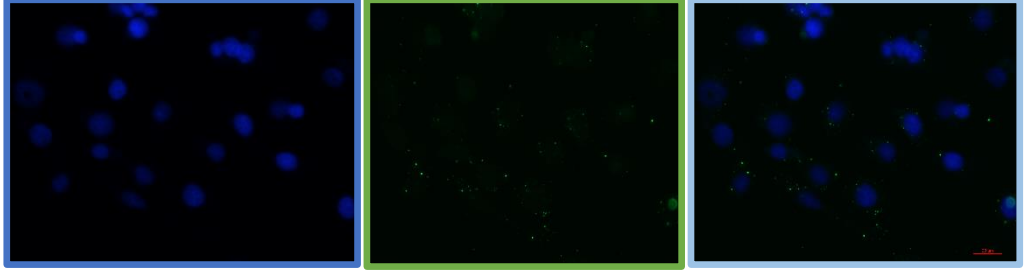
4.4.2 Floresan Mikroskobu ile Hücre İçi Alım Testleri

Flow sitometri ile hücre içi alım testlerinin ardından, seçilen 50 µg/mL nanopartikül konsantrasyonu ile MSN %10 APTES'in ve zehir yüklenmiş halinin hücre içine alındığı, floresan mikroskobu görüntüleri ile doğrulanmıştır. Görüntülerde, 4 saat ve 24 saat uygulama sonuçlarına göre yeşil floresan etiketli nanopartiküllerin, DAPI ile boyanmış çekirdeklerin etrafında olduğu Ek1.2 ve Şekil 4.9 'da görülmektedir.

50 µg/mL – Zehir Yüklü MSN %10 APTES, MDA-MB 231



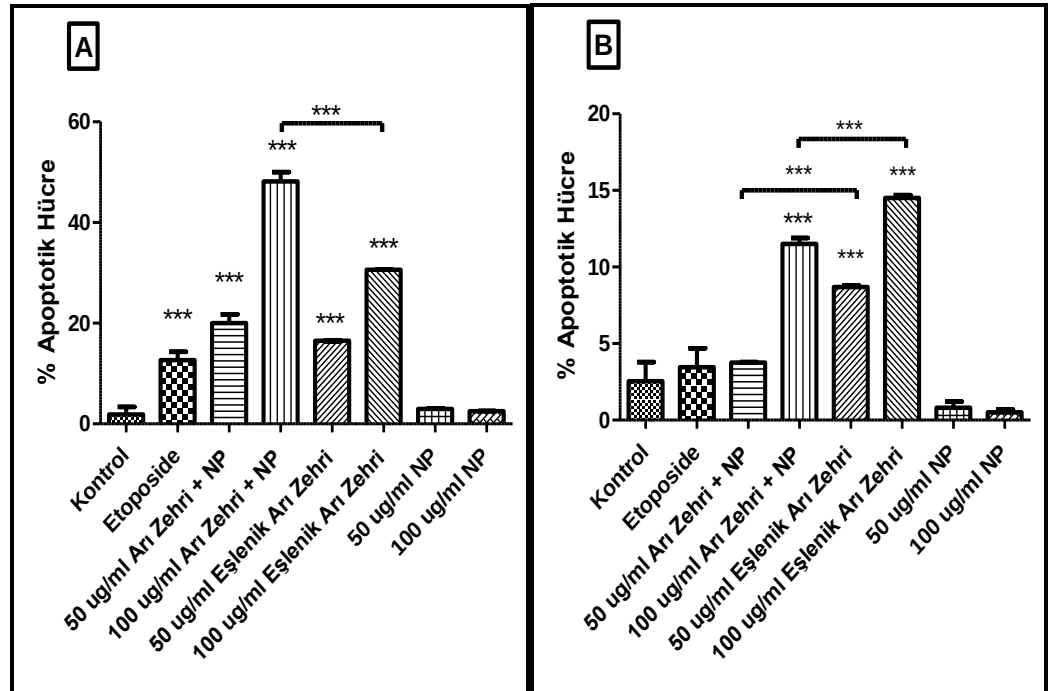
50 µg/mL – Zehir Yüklü MSN %10 APTES, PC3



Şekil 4. 10 Zehir Yüklü MSN %10 APTES – FITC 4 saat muamele sonrası MDA-MB 231 ve PC3 hücreleri (Ölçek Çubuğu : 20µm)

4.5 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Tasarlanan taşıyıcı sistem ile arı zehrinin hücre canlılığı ve ölümüne olan etkilerini belirlemek amacıyla fosfatidil serine afinitesi yüksek, kalsiyum bağımlı, fosfolipid bağlayıcı bir protein olan apoptotik hücre markırı FITC konjuge Aneksin V boyama yöntemi kullanıldı. Burada Aneksin V ‘ın FITC içermesi sebebiyle herhangi bir girişimi engellemek için etkileri araştırılan nanopartiküllerin FITC içermeyen halleri kullanıldı. 24 saat muamele sonrası 50 µg/ml ve 100 µg/ml MSN %10 APTES ve zehir yüklü hallerinin, pozitif kontrol etoposid ve eşlenik zehir miktarlarının sonuçları Şekil 9’da verilmiştir. PC3 hücrelerinde nanopartiküller ile zehrin birlikte etkisinin artan FL1 (525 nm – yeşil) analizleri sonucu apoptotik etkisinde artış olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.10A ve Ek 2.1B). MDA-MB 231 hücrelerinde ise kontrole kıyasla artan FL1 (525 nm – yeşil) floresan yoğunluğu zehrin apoptotik etkisinin olabileceğini gösterirken, nanopartikül+zehir ile birlikte etkinin artmadığı görülmüştür (Şekil 4.10B ve Ek 2.1A).



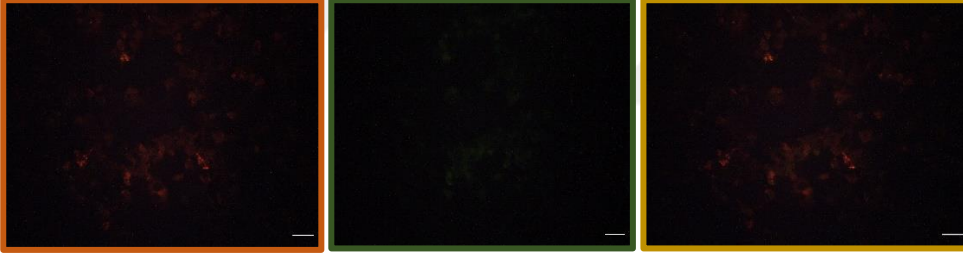
Şekil 4. 11 Flow sitometri ile Aneksin V boyama yöntemi kullanılarak elde edilen analiz sonuçları. A) PC3 % apoptoz grafiği B) MDA-MB 231 % apoptoz grafiği (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

4.6 Arı Zehri, Mezoporlu Silika Nanopartiküller ve Zehir Yüklü Silika Nanopartiküllerin Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkilerinin Belirlenmesi

Mitokondriyal membran potansiyelindeki azalış hücrenin sağlıklı olduğunu gösterir ve uygulanan maddelerin apoptotik etkileri hakkında fikir verebilir. Şekil 4.11 ve Ek 2.1 'de FITC içermeyen 50 µg/ml ve 100 µg/ml MSN %10 APTES nanopartiküllerinin zehir yüklü hallerinin, zehir yüklenmemiş hallerinin ve eşlenik zehrin 24 saat muamele sonrasındaki etkileri floresan mikroskopi ile alınan görüntüler ve floresan spektrokopisi ile incelenmiştir. PC3 hücrelerinde nanopartikül ile zehrin birlikteliği membran potansiyelini zehrin tek başına etkisine kıyasla daha fazla düşürmüştür ve flow sitometri sonuçlarını desteklemektedir (Şekil 4.11C). Ancak MDA-MB 231 hücrelerinde zehir ve zehir yüklü nanopartiküllerin anlamlı etkileri gözlenmemiştir (Şekil 4.11D).

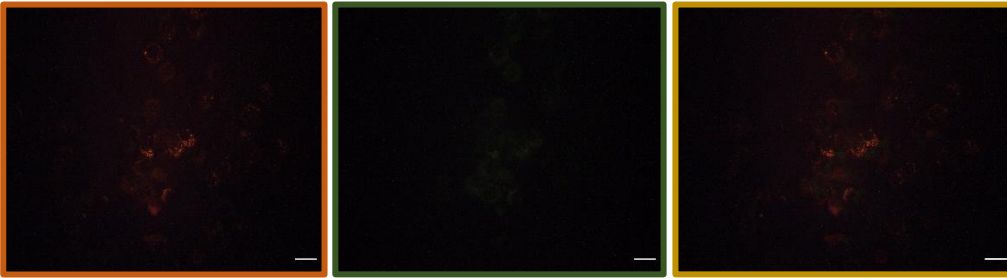
A

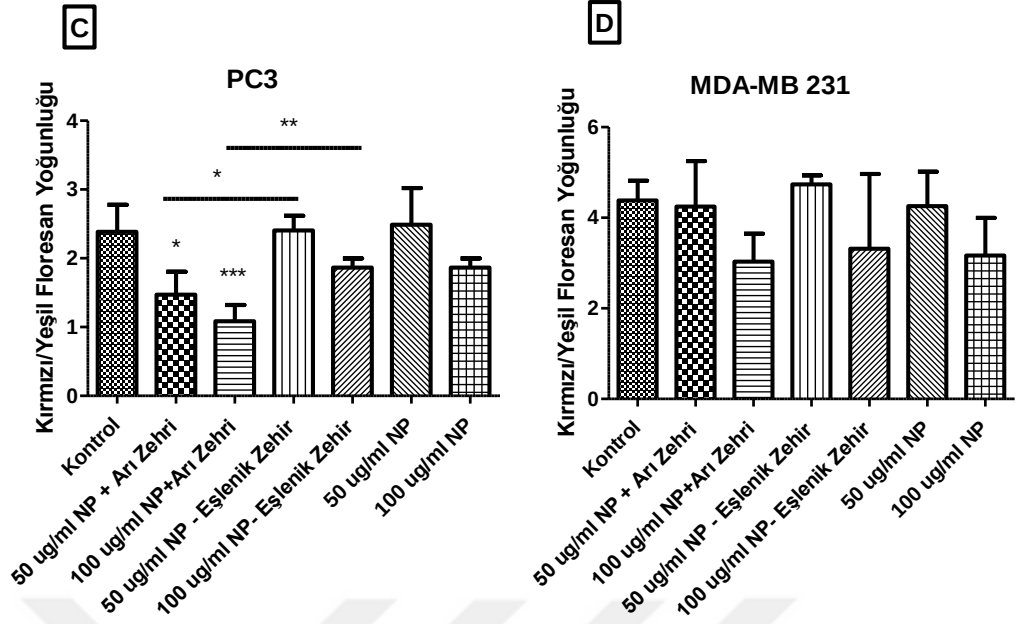
MDA-MB 231 100 µg/mL Zehir Yüklü MSN %10 APTES



B

PC3 50 µg/mL Zehir Yüklü MSN %10 APTES





Şekil 4. 12 Arı zehri, arı zehri yüklü MSN ve yüklenmemiş MSN'lerin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi, soldan sağa kırmızı, yeşil ve çakıştırılmış halleri. A) MDA-MB 231 floresan mikroskopu görüntüleri, B) PC3 floresan mikroskopu görüntüleri C) PC3 kırmızı ve yeşil floresan oranları grafiği D) MDA-MB 231 kırmızı ve yeşil floresan oranları grafiği (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (Ölçek çubuğu : 100 μm)

5. TARTIŞMA

Tez projesi kapsamında, arı zehrinin içerdiği aktif bileşenleri ile bilinen anti-kanser etkisi sebebiyle, ülkemizde yaygın yayılım gösteren Anadolu arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) zehrinin, mezoporlu silika nanopartikül (MSN)'lere yüklenerek etkinliğinin artırılması amaçlanmıştır. Ankara bölgesinden toplanan zehrin farmakolojik etkisinden sorumlu olduğu düşünülen protein içeriği BCA yöntemi ile yaklaşık olarak %60 bulunmuştur. Şirin ve ark., (2017) yaptığı çalışmada, Ankara, Artvin, Zonguldak bölgelerinden temin edilen arı zehrinin Bradford (Bradford, 1976) yöntemi ile total protein içeriği %66 olarak bulunmuştur, literatür bilgileri ile oluşturulan Tablo 2.1'deki total protein ve peptid miktarıyla da sonuçlarımız benzerdir. Oluşan küçük farklılıklar yöntemden, arı türlerinden ve zehirlerin toplanma mevsimine göre içeriğinin değişmesinden kaynaklanıyor olabilir. Tümör bölgesindeki artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi sayesinde pasif hedefleme şansı, pozitif yüklü MSN'ler ile artırılabilir (Tarn et al., 2013). Bunun yanında negatif yüklü hücre membranı ile pozitif yüklü MSN arasındaki elektrostatik çekim sebebiyle hücre içi alım da artacaktır (Argyio et al., 2014). Bunlara ek olarak, MSN'ler genel olarak hücre içine endozomlarla alınmaktadır (Vivero-escoto et al., 2010). Endozomlardaki tuzak, lizozomlardan salınan sindirim enzimleri ile MSN'lere ve taşıdıkları terapötiklere zarar verebilir, endozomlardan kaçış için de "proton sünger etkisi" olarak adlandırılan lizozomlarda artan asidite sonucu yüzeydeki katyonik lipid, peptid veya sentetik malzemelerin protonları salması sonucu endozomlara iyon akışı ve aşırı su girişi ile osmotik basıncın artması ve membranın yırtılması ile

sonuçlanır, bu şekilde taşıdıkları terapötikleri sitoplazmaya salabilirler (Argyio et al., 2014; Behr, 1997; Gruenberg & Maxfield, 1995). MSN'lerin yüzey yükü, MSN'lere yüklenecek terapötikler için de önemlidir, ancak protein ve peptidler genel olarak nötrale yakın izoelektrik noktalarına sahip olduğu için bu etkinin o kadar önemli olmadığı ve kısa zincirlere sahip peptidlerin yüksek düzeylerde yüklenebilirlikleri bildirilmiştir, aynı zamanda yüzeydeki amino grupları peptidlerin karboksil grupları ile amid bağı oluşturmaya müsaittir. (Castillo & Lozano, 2020). Bu sebeplerle, zehir peptidlerinin taşıyacak MSN'lerin sentez çalışmaları pozitif yüzey yükü fonksiyonelleştirilmesi üzerine çalışıldı ve zeta potansiyel analizleri sonuçlarında pozitif yüklere sahip MSN'ler elde edilmiştir. SEM analizleri ile küresel ve homojen morfolojiye sahip oldukları gösterilmiştir.

Sentezlenen MSN'lerin biyouyumluluklarının belirlenmesi amacıyla tümörojenik olmayan HEK-293 ve sağlıklı CCD34Lu hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile incelendi. MSN %10 APTES'te 24 saat ve 48 saat muamele sonucu herhangi sitotoksik etkileri gözlenmezken, MSN-FITC-PPI'de 48. saatte azda olsa canlılıkta düşüşler gözlemlendi. Silika nanopartiküllerin genel olarak toksik olmadığı kabul edilir, ancak nanopartiküllerin boyut, reaktif yüzey grupları spesifik özelliklerine göre toksik etkilerinin oluşabileceği bildirilmiştir (Selvarajan et al., 2020). 200 µg/mL'ye kadar toksik olmadığı (Castillo & Lozano, 2020) ve vücuttan silisik asit ve organik silika türleri şeklinde atıldığı bildirilmiştir (He, Zhang, Gao, Li, & Shi, 2011). Daha büyük MSN'lerin hücre içine alınamayıp membran ile daha çok etkileşime geçmesi (Zhao et al., 2011), sentezlenen MSN-FITC-PPI'lerin nispeten daha büyük boyutları 48. saatteki canlılığa etkilerinin sebebi olabilir. Ardından, zehrin sentezlediğimiz nanopartiküllere yükleme çalışmaları yapıldı. Zehrin büyük bir kısmı protein ve peptid yapıdan oluştuğu için zehrin yüklenme verimleri hesaplanırken BCA protein test kiti kullanıldı. Birçok nanopartiküler sistem ile arı zehri ve melittinin stabilite ve etkilerinin arttırıldığı gösterilse de MSN'ler ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. (Jallouk et al., 2015; Mohamed, Amir, Nassar, & Zohdi, 2017; Soman et al., 2009; Suh & Cho, 2015; X. Yu et al., 2019; X. Yu, Dai, & Zhang, 2020). Bununla birlikte kontrol edilebilir morfolojiler, fonksiyonelleştirilebilir yüzey kimyaları, düşük maliyetleri MSN'leri kanser uygulamaları için biçilmiş kaftan yapmaktadır (Barkat et al., 2019). Schlossbauer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada melittin SBA-15 mezoporlu silika nanopartiküllere asetal bağlayıcılar kullanılarak yüklenmiştir (Schlossbauer, Dohmen, Schaffert, Wagner, & Bein, 2011). Yeni bir çalışmada da boyut ve yük özellikleri kullanılarak melittin geniş porlu negatif MSN'lere yüklendikten sonra yüzeyi β-siklodekstrin ile kaplanıp ikinci bir peptidi barındıran pozitif yüklü MSN'in β-siklodekstrin boşluklarına girmesi sıcaklıkla ikili salım gerçekleştiren bir antimikrobiyal bir platform geliştirilmiştir (Q. Yu, Deng, Lin, Zhang, & Zink, 2020). Bu çalışmalara ek olarak yılan zehri ve çeşitli peptid yapılı biyomoleküllerin de MSN'lere verimli bir şekilde yüklenebileceğini, enkapsüle edilebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Castillo & Lozano, 2020; Çelen et al., 2018; Choi et al., 2020; Sayed, Al-sadoon, & Badr, 2012). Bildiğimiz kadarıyla arı zehri

ve MSN'ler ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda MSN %10 APTES ve MSN-FITC-PPI'ye literatüre göre nispeten düşük verimlerle, iki tip nanopartiküle benzer yüklenme oranları elde edilmiştir. Bu, zehrin büyük çoğunluğunu oluşturan melittinin ne kadar nötre yakın da olsa katyonik karakteri (Rady et al., 2017) kaynaklı itme güçleri sebebiyle olabilir. Antimikrobiyal pozitif yüklü bir peptid ile yapılan bir çalışma bunu doğrulamaktadır, ancak pozitif yüklü nanopartiküllerle birlikte verim daha az olsa da membran ile etkileşimlerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (Braun et al., 2016). Ayrıca diğer bir pozitif antimikrobiyal peptid çalışmasındaki negatif yüklü MSN'lere dahi yüklenme verimleri bizim çalışmamızdaki MSN %10 APTES ile benzerdir (Kwon et al., 2017), bu da melittinin yapısı kaynaklı yüklenme ve zehrin içerisindeki diğer protein ve peptidlerin de MSN'e yüklendiğini desteklemektedir.

Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen kanserlerden biridir. Meme kanseri ise 2020 istatistiklerine göre görülme sıklığı olarak akciğer kanserinin önüne geçmiştir. Serviks görülme sıklığı daha düşük olmakla birlikte öldürücülüğü yüksek sayılabilecek bir kanser türüdür, tedavileri için büyük çabalar sarf edilmelidir. (Sung et al., 2021). Arı zehrinin, PC3 prostat kanseri hücrelerinde NF- κ B/kaspaz sinyal aracılı apoptoz indüksiyonu ile olabileceği (M. H. Park et al., 2011), MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde EGF ile indüklenen invazyonun inhibisyonu, membran üzerindeki etkisi ve kaspaz aracılı apoptoz ile olabileceği (Duffy et al., 2020; Jeong et al., 2014; Ung et al., 2018), HeLa serviks kanseri hücrelerinde kalmodulinin inhibisyonu ile apoptoz, nekroz ve lizis ile olabileceği (Oršolić, 2009) bildirilmiştir. Bunlara ek olarak kanserli olmayan hücrelerdeki sitotoksik etkisinin daha düşük olduğu ve kansere seçimli davrandığı bildirilmiştir (Duffy et al., 2020; Tu, Wu, Hsieh, Chen, & Hsu, 2008). Çalışmamızda da zehrin HEK293 ve CCD34Lu hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi kanser hücrelerine kıyasla düşük bulunmuştur. MSN'lere zehir yüklendikten sonra, MSN'lerin ve tek başına zehrin sitotoksik etkileri PC3, MDA-MB 231 ve HeLa hücreleri üzerinde MTT testi ile incelenmiştir. Zehrin tek başına 24 ve 48. Saatteki sitotoksik etkileri, en yüksek PC3 hücrelerinde görülürken, en düşük HeLa hücrelerinde görülmüştür. Oršolić' in yaptığı çalışmada, HeLa'nın arı zehrine karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Oršolić, 2009). Bu farklılıkların ikilenme süreleriyle alakalı olabileceği ve kanser hücrelerinin alttipleri ve heterojen yapısı sebebiyle membran topografyasındaki farklılıklardan kaynaklı olabileceği görüşleri vardır (Killion & Dunn, 1986; Or, 2012). MDA-MB 231 hücrelerinde sentezlenen her iki MSN zehir kombinasyonu ile de canlılıkta önemli düşüşler gözlenirken, PC3'de MSN-FITC-PPI ile zehrin tek başına olan etkileri korunmuş, MSN-APTES ile 24. saatte etkiler korunurken 48. saatte tek başına zehre göre canlılıkta artışlar gözlenmiştir. PC3'nin 48. saatte etkinliğinin düşük olmasının sebebi, zehrin MSN-APTES'ten hızlı salınması ve zehrin kompleks yapısı sebebiyle hücre dışından etki edemeyecek peptidlerin yüklenmiş olabileceği ile açıklanabilir. HeLa hücrelerinde zehrin düşük sitotoksik etkisi MSN-APTES ile aşılamazken, diğer hücelere kıyasla daha yüksek canlılıklar olmakla beraber MSN-FITC-PPI ile aşılmıştır (Şekil 4.8, Tablo 4.3 ve 4.4). Bu da

MSN-FITC-PPI'nin nispeten daha büyük boyutları sebebiyle membran ile etkileşerek sağlıklı hücredekine benzer şekilde, zehrin etkisinin yanında kendi etkisi kaynaklı olabilir (Zhao et al., 2011). Bu sonuçların ardından, MSN-APTES hücre içi alım ve apoptotik etkileri PC3 ve MDA-MB 231 hücrelerinde incelenmiştir. MSN-FITC-PPI ile daha sonrasında, FITC içermeyen hallerinin kullanılması gerekliliği ve FITC içermeyen hallerinin sentez optimizasyonları sağlanamadığı için sonraki çalışmalarda tek MSN ile devam edilmiştir. MSN-APTES-FITC flow sitometri analizleri sonucunda PC3 ve MDA-MB 231 hücrelerinde yüksek düzeylerde hücre içi alımın olduğu bulunmuştur (Şekil 4.10). Pozitif yüklü MSN ve negatif yüklü membranın çekimi dolayısı ile pozitif yüklü MSN'lerin daha yüksek hücre içi alım çalışmaları bulunmaktadır (Karaman et al., 2012; Vivero-escoto et al., 2010). Zehir, MSN kombinasyonu ile oluşan bir miktar azalış, zehrin MSN'in yüzey yüklerini kapatmasından kaynaklanıyor olabilir. Ardından, MSN ve MSN zehir kombinasyonları ile muamele edilen PC3 ve MDA-MB 231 hücrelerinde, floresan mikroskobu ile DAPI ile boyanmış hücre çekirdeklerinin etrafından FITC işaretli MSN'lerin hücre içine alındığı doğrulanmıştır. MSN'lerin hücre içine alındığı gösterildikten sonra, zehrin ve MSN zehir kombinasyonlarının terapötiklerin kanser önleyici etkilerinde önemli rolü olan programlanmış hücre ölümü mekanizması olan apoptotik etkileri incelenmiştir (Jo et al., 2012). Bu amaçla, PC3 ve MDA-MB 231 hücreleri arı zehri ve zehir MSN kombinasyonları ile 24 saat muamele edildikten sonra fosfotidilserine (FS) afinitesi yüksek FITC işaretli Aneksin V proteini kullanılmıştır. FS, sağlıklı hücrelerde hücre membranının iç tarafında bulunurken, apoptoz geçiren hücrelerin yüzeyinde açığa çıkar, böylece immün hücreler apoptotik hücreyi belirleyip elimine edebilir (Aubry et al., 1999). Sonuçlara baktığımızda, zehir ve zehir MSN kombinasyonları ile 24 saat muamele edilen MDA-MB 231 hücrelerinde, zehir ve kombinasyonun artan konsantrasyonlarının pozitif kontrole kıyasla apoptotik etkileri arttırdığı görülmüştür. Ancak zehir tek başına, zehir MSN kombinasyonundan daha yüksek apoptotik göstermiştir (Şekil 4.12). Zehrin membran üzerindeki etkisi ve MSN ile hücre içine salınan zehrin bu etkisini gösterememesi, hücre içi yolları tetikleyecek yeterli konsantrasyonlara ulaşamaması kaynaklı olabilir (Duffy et al., 2020; Or, 2012). Bu sebeplerle farklı ölüm mekanizmaları da incelenmelidir. Buna karşılık, PC3 hücrelerinde zehir ve zehir MSN kombinasyonları çok daha yüksek apoptotik etkiler göstermiştir ve zehir MSN kombinasyonun en yüksek miktarı, içerisindeki eşlenik zehir miktarına kıyasla yaklaşık 1,5 kat daha yüksek etki göstermiştir. Zehrin kompleks kimyası ve hücre farklılıkları, ölüm mekanizmalarının moleküler düzeyde incelenmesi gerekliliğini göstermektedir. Mitokondrinin hücre metabolizmasını ve apoptozu düzenlemedeki rolleri, kanser tedavisinde önemli bir belirteç ve hedef olarak ortaya çıkmıştır (Naz et al., 2019). Arı zehrinin mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) üzerindeki etkileri daha önceki çalışmalarda gözlemlenmiştir. Zehrin, MMP'yi düşürerek, membran geçirgenliği arttırması ve aşırı sitokrom c salımı sonu kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Ip, Liao, et al., 2008; Ip, Wei, et al., 2008; Or, 2012) Bu sebeple, flow sitometri ile yapılan testlerin ardından, 24 saat muamele

sonrasındaki mitokondriyal membran potansiyeline (MMP) etkileri araştırılmıştır. Alınan floresans görüntüleri ve floresans spektrokopisi sonuçları, zehir ve zehir MSN kombinasyonlarının, MDA-MB 231 hücrelerinde MMP düşüşünün artan konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görülsede anlamlı seviyelere ulaşamamıştır. Öldürücü etkilerinin daha çok zehrin sitolik/nekrotik etkisi kaynaklı olabileceğine işaret etmektedir. Ancak nekrotik etkisinin kullanımını sınırlandırmayacağı, programlı nekroz çalışmalarının yapılması gerekliliği apoptozdan kaçan kanserler için avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir (Daniluk et al., 2020). PC3 hücrelerinde ise flow sitometri sonuçlarıyla paralel şekilde, MMP'nin önemli seviyelerde düştüğü ve zehir MSN kombinasyonlarıyla eşlenik zehre kıyasla yaklaşık 2 kat daha fazla azalış gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Yukarıdaki sonuçlar ele alındığında, arı zehrinin dünyanın her yerinde ulaşılabilir, düşük maliyetli bir ürün olarak kanser tedavisi için potansiyeli gözükmemektedir. Ayrıca arı türlerine göre farklanabilen etki, çalışmamızda kullanılan *Apis mellifera anatoliaca* zehrinin potansiyelini ve ülkemizdeki diğer türlerin incelenmesi gerekliliğini de göstermektedir. Ayrıca, içerdiği porlar sebebiyle ve fonksiyonelleştirilebilir kimyası ile biyomoleküllerin taşınmasında son yıllarda sıklıkla kullanılan mezoporlu silika nanaopartiküllerin zehrin ve peptidlerinin etkilerini arttırabileceği gösterilmiştir ve ileri çalışmalar ile yan etkilerini azaltabilme, hedefli tedavilerde kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Sonuçlarımızda özellikle, PC3 prostat kanseri hücreleri üzerindeki artmış apoptotik etki, daha ileriye taşınarak zehrin moleküler mekanizmalarının anlaşılması gerekliliğini ve ardından daha fonksiyonel MSN'ler ile birlikte sadece prostat değil çeşitli kanser türleri için yeni terapötiklerin geliştirilebileceğini göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Yapılan çalışma sürecinde, mezoporlu silika nanopartiküllerin sentezi (MSN) ve karakterizasyonu, arı zehrinin kanser üzerindeki potansiyel etkileri sebebiyle ülkemizde çokça rastlanan *Apis mellifera anatoliaca* arı türünden toplanan arı zehrinin MSN'lere yükleme çalışmaları ve MSN arı zehri kombinasyonlarının zehrin antikanser etkinliğini arttırıp arttırmadığı araştırılmıştır. Elde edilen bulgular ışığında;

Zeta potansiyel analizleri ile pH:7,2'de membranla ile etkileşme potansiyeli yüksek pozitif yüklü MSN'lerin sentezlendiği ve dinamik ışık saçılımı boyut analizleri ile nanotıpta kullanılmaya uygun nanopartiküllerin sentezlendiği gösterilmiştir. Sentez tekrarlanabilirliği sağlanamadığı için post sentetik modifikasyon ile yüzeyi fonksiyonelleştirilen MSN-FITC-PPI'ler sitotoksitesite testlerinin ardından kullanılmamıştır. Onun yerine sitotoksitesite testlerinin ardından ko-kondenzasyon yöntemi ile elde edilen MSN-APTES-FITC ve zehir kombinasyonlarının hücre içine alım ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

Yapılan MTT testlerine göre, MSN'lere yüklenen eşlenik zehir miktarlarıyla sitotoksik etkinlik sıralaması PC3, MDA-MB 231, HeLa olarak gözlenmiştir. HEK-293 ve CCD34Lu hücrelerinde, kanser hücrelerine kıyasla daha düşük sitotoksik etki gözlenmiştir. MSN zehir kombinasyonlarında her iki nanopartikül sistemiyle, MDA-MB 231 hücrelerinde artmış sitotoksik etki gözlenirken, PC3 hücrelerinde MSN-FITC-PPI ile zehrin etkileri korunurken, MSN-APTES ile 24.saatte etkiler korunurken, 48.saatte zehre kıyasla canlılık daha yüksek gözlenmiştir. HeLa hücrelerinde de her iki MSN zehir kombinasyonları ile sitotoksik etki artarken, %50 canlılık inhibisyonunun altına MSN-FITC-PPI ile ulaşılabilmiştir.

Nanopartiküllerin hücre içine zehir peptidlerini taşıyabilirliği, MSN'lerin FITC içermesi sebebiyle flow sitometri ve floresan mikroskopi ile değerlendirilmiştir. MSN-APTES-FITC, PC3 ve MDA-MB 231 hücrelerine yüksek düzeylerde alınmıştır. Zehir MSN kombinasyonu da hücre içine alımda azalışlar görölse de, yüksek düzeylerde alınarak peptidleri taşıdığı düşünülmektedir.

Apoptotik etkilerinin araştırılması için fosfotidilserine afinitesi yüksek FITC konjuge Aneksin V proteini kullanılmıştır. Herhangi bir girişimin olmaması için, MSN %10 APTES'in FITC içermeyen halleri çalışmalarda kullanılmıştır. 24 saat muamele sonrasında nanopartikül içerisindeki eşlenik zehir konsantrasyonu ve MSN zehir kombinasyonlarının artan konsantrasyonlarının, MDA-MB 231 ve PC3 hücrelerinde apoptotik etkileri arttırdığı görülmüştür. Ancak MDA-MB 231 hücrelerinde, sadece arı zehri, nanopartikül zehir kombinasyonuna kıyasla daha yüksek apoptotik etki göstermiştir. Buna karşılık PC3'de nanopartikül zehir kombinasyonu ile yalnızca zehre kıyasla yaklaşık 1,5 kat artış gözlenmiştir.

Ardından yapılan mitokondriyal membran potansiyeli testleri ile, zehrin ve zehir MSN kombinasyonunun, mitokondri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 24 saat muamele sonrasında, MDA-MB 231 hücrelerinde mitokondri depolarizasyonu anlamlı düzeylerde gözlenemezken, PC3 hücrelerinde, arı zehri ve zehir MSN kombinasyonlarında önemli seviyelerde gözlenmiştir. Zehir MSN kombinasyonu ile membran potansiyelindeki daha fazla düşüş, flow sitometri analizlerini doğrulamaktadır.

7. ÖNERİLER

- Arı zehrinin kanser üzerindeki moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması, bunun yanında zehrin içeriğinin aydınlatılması ve bileşenlerinin etki mekanizmalarının incelenmesi yeni uygun maliyetli terapötiklerin geliştirilmesini sağlayacaktır. Ayrıca, farklı arı türlerinin ve farklı genotiplerin zehirlerinin etkilerinin incelenmesi, daha geniş çapta kanser türlerinde incelenmesi bu mekanizmaları anlamak ve terapötikler geliştirmek için fayda sağlayacaktır.
- Zehrin spesifik olmayan sitotoksik etkilerinin giderilmesinde mezoporlu silika nanopartiküllerin kullanımı umut vadetmektedir doğrulanabilmesi

için *in vitro* alışmaların geliştirilmesine ek olarak *in vivo* alışmalar gereklidir.

- Daha fonksiyonel mezoporlu silika nanopartiküller (MSN) kullanılarak, hedefe kanser türüne spesifik MSN'ler geliştirilerek etkinliğin artırılmasının yanı sıra, MSN'lerin özel yüzey kimyası sayesinde kanserin geliştirebileceği ilaç direncine karşılık, zehirle veya zehir bileşenlerinin yanında bir başka ilacın yüklenebilmesi, kanserin geliştirebileceği dirençleri aşmada etkili olabilir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abcam. (2021). JC-1 - Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (ab113850).
- Ağan, A. F., & Kekeçoğlu, M. (2020). Melittin ve Kanser Tedavisi: Nanoteknolojik Bakış Açısı. *Uludag Arıcılık Dergisi*, 20(December), 221–231. <https://doi.org/10.31467/uluaricilik.784365>
- ALTINTAS, L., & BEKTAS, N. (2019). APİTERAPİ: 1. ARI ZEHRİ. *Uludag Arıcılık Dergisi*, 19(1), 82–95. <https://doi.org/10.31467-uluaricilik.568311-720151>
- Andresen, T. L., Jensen, S. S., Madsen, R., & Jørgensen, K. (2005). Synthesis and Biological Activity of Anticancer Ether Lipids That Are Specifically Released by Phospholipase A 2 in Tumor Tissue. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 7305–7314. <https://doi.org/10.1021/jm049006f> CCC
- Argyo, C., Weiss, V., Bra, C., & Bein, T. (2014). Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles as a Universal Platform for Drug Delivery. *Chemistry of Materials*, 26, 435–451. <https://doi.org/10.1021/cm402592t>
- Attarde, S. S., & Pandit, S. V. (2019). Anticancer potential of nanogold conjugated toxin GNP-NN-32 from Naja naja venom. *Journal of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases*, (August 2019), 1–12.
- Aubry, J., Blaecke, A., Lecoanet-henchoz, S., Jeannin, P., Herbault, N., Caron, G., & Bonnefoy, J. (1999). Annexin V Used for Measuring Apoptosis in the Early Events of Cellular Cytotoxicity. *Cytometry*, 37, 197–204.
- Badawi, J. K. (2021). Bee Venom Components as Therapeutic Tools against Prostate Cancer. *Toxins*, 13(337), 2–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxins13050337>
- Bai, L. (2018). Melittin induces NSCLC apoptosis via inhibition of miR-183. *OncoTargets and Therapy*, (36), 4511–4523.
- Balas, F., Manzano, M., & Horcajada, P. (2006). Confinement and Controlled Release of Bisphosphonates on Ordered Mesoporous Silica-Based Materials. *JACS Communications*, 128, 8116–8117. <https://doi.org/10.1021/ja062286z> CCC: \$33.50 ©
- Barkat, A., Beg, S., Panda, S. K., Alharbi, K. S., Rahman, M., & Ahmed, F. J. (2019). Seminars in Cancer Biology Functionalized mesoporous silica nanoparticles in anticancer therapeutics. *Seminars in Cancer Biology*, (August), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.022>
- Bas, I., & Ors, N. (2003). Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom, 41, 861–870. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00045-X)
- Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(5), 154–165. <https://doi.org/10.5505/bsbd.2016.93823>
- Behr, J. (1997). The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *CHIMIA*, 2(1), 34–36.

- Bhowmik, T., Saha, P. P., Sarkar, A., & Gomes, A. (2017). Chemico-Biological Interactions Evaluation of cytotoxicity of a purified venom protein from *Naja kaouthia* (NKCT1) using gold nanoparticles for targeted delivery to cancer cell. *Chemico-Biological Interactions*, 261, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.007>
- Biswas, A., Gomes, A., Sengupta, J., Datta, P., & Singha, S. (2012). Nanoparticle-conjugated animal venom-toxins and their possible - therapeutic potential. *Journal of Venom Research*, 3, 15–21.
- Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1), 54–86. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.54>
- Brace, C. (2014). Thermal Tumor Ablation in Clinical Use. *NIH Public Access*, 2(5), 28–38. <https://doi.org/10.1109/MPUL.2011.942603>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braun, K., Pochert, A., Lindén, M., Davoudi, M., Schmidtchen, A., Nordström, R., & Malmsten, M. (2016). Membrane interactions of mesoporous silica nanoparticles as carriers of antimicrobial peptides. *Journal of Colloid And Interface Science*, 475, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.05.002>
- Caruso, F., Hyeon, T., Rotello, V., & Zink, J. I. (2012). Nanomedicine themed issue Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 41(7), 2590–2605. <https://doi.org/10.1039/c1cs15246g>
- Castillo, R. R., & Lozano, D. (2020). Mesoporous Silica Nanoparticles as Carriers for Therapeutic Biomolecules. *Pharmaceutics Review*.
- Çelen, Ç., Keçeciler, C., Karış, M., Göçmen, B., Yeşil-Çeliktaş, Ö., & Nalbantsoy, A. (2018). Cytotoxicity of Silica Nanoparticles with Transcaucasian Nose-Horned Viper, *Vipera ammodytes transcaucasiana*, Venom on U87MG and SHSY5Y Neuronal Cancer Cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 350–357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12010-018-2742-2>
- Çelik, K., & Aşgun, H. F. (2018). Arılarla gelen sağlık “apiterapi.” Çanakkale: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi. <https://doi.org/http://apitherapy-project.eu/pdf/20160920/apitherapy-handbook-tr.pdf>
- Cheng, T., Zhao, Q., Zhang, D., & Liu, G. (2015). Transition-metal-functionalized ordered mesoporous silicas: an overview of sustainable chiral catalysts for enantioselective. *Green Chemistry*, 17, 2100–2122. <https://doi.org/10.1039/c4gc02204a>
- Choi, E., Lim, D., & Kim, S. (2020). Hydrolytic surface erosion of mesoporous silica nanoparticles for efficient intracellular delivery of cytochrome c. *Journal of Colloid And Interface Science*, 560, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.10.100>
- Cruz, M. M., Delgado, Y., Figueroa, C. M., Orellano, E. A., Morales, M.,

- Monteagudo, A., & Griebenow, K. (2014). Delivery of Chemically Glycosylated Cytochrome c Immobilized in Mesoporous Silica Nanoparticles Induces Apoptosis in HeLa Cancer Cells. *Molecular Pharmaceutics*, 11, 102–111. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/mp400400j> |
- Dang, Y., & Guan, J. (2020). Smart Materials in Medicine Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*, 1(April), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2020.04.001>
- Daniluk, K., Kutwin, M., Grodzik, M., Wierzbicki, M., Strojny, B., Szczepaniak, J., & Sosnowska, M. (2020). Use of Selected Carbon Nanoparticles as Melittin Carriers for MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *Materials*, 13, 1–20. <https://doi.org/doi:10.3390/ma13010090>
- Desai, D., Karaman, D. Ş., Prabhakar, N., Tadayon, S., Duchanoy, A., & Diana, M. (2014). Design considerations for mesoporous silica nanoparticulate systems in facilitating biomedical applications. *Mesoporous Biomater.*, 1, 16–43. <https://doi.org/10.2478/mesbi-2014-0001>
- Desai, D., Prabhakar, N., Mamaeva, V., Karaman, D. Ş., Lähdeniemi, I. A., Sahlgren, C., ... Toivola, D. M. (2016). Targeted modulation of cell differentiation in distinct regions of the gastrointestinal tract via oral administration of differently PEG-PEI functionalized mesoporous silica nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 299–313. <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/IJN.S94013>
- Ding, L., Zhang, Q., An, J., & Bo, Z. (2016). Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(6), 1113–1130. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3160-1>
- Duffy, C., Sorolla, A., Wang, E., Golden, E., Woodward, E., Davern, K., & Ho, D. (2020). Honeybee venom and melittin suppress growth factor receptor activation in HER2-enriched and triple-negative breast cancer. *Nature Precision Oncology*, 4(24), 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41698-020-00129-0>
- Elieh, D., Komi, A., Shafaghat, F., & Zwiener, R. D. (2018). Immunology of Bee Venom. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 54(January 2017), 386–396. <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8597-4>
- Falzone, L., Salomone, S., Libra, M., John, D., & Lane, R. (2018). Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Frontiers in Pharmacology*, 9(November), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300>
- Farooq, S., Mazhar, A., Ghouri, A., Ul-Haq, I., & Ullah, N. (2020). One-Pot Multicomponent Synthesis and Bioevaluation of Tetrahydroquinoline Derivatives as. *Molecules*, 25(June), 1–28. <https://doi.org/10.3390/molecules25112710>
- Ferguson, E. L., & Duncan, R. (2009). Dextrin - Phospholipase A 2 : Synthesis and Evaluation as a Bioresponsive Anticancer Conjugate. *Biomacromolecules*, 10,

1358–1364. <https://doi.org/10.1021/bm8013022>

- Friedrich, R. (1988). *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-72649-1>
- Gajski, G., & Garaj-vrhovac, V. (2013). Melittin : A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.009>
- Gerstt, J. E., & Salomon, Y. (1987). Inhibition by Melittin and Fluphenazine of Melanotropin Receptor Function and Adenylate Cyclase in M2R Melanoma Cell Membranes*. *The Endocrine Society*, 121(5), 1766–1772. <https://doi.org/https://doi.org/10.1210/endo-121-5-1766>
- Ginsburg, O., Bray, F., Coleman, M. P., Vanderpuye, V., Eniu, A., Kotha, S. R., ... Hutchinson, F. (2017). Health , equity , and women ' s cancers 1 The global burden of women ' s cancers : a grand challenge in. *The Lancet*, 389(10071), 847–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31392-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31392-7)
- Golemis, E. A., Scheet, P., Beck, T. N., Scolnick, E. M., Hunter, D. J., & Hawk, E. (2018). Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States. *Genes & Development*, 32, 868–902. <https://doi.org/10.1101/gad.314849.118>.
- Gru, A., Alvarez-fischer, D., Noelker, C., Vulinovic, F., Chevarin, C., Klein, C., ... Michel, P. P. (2013). Bee Venom and Its Component Apamin as Neuroprotective Agents in a Parkinson Disease Mouse Model, 8(4), 2–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061700>
- Gruenberg, J., & Maxfield, F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 7, 552–563. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80013-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80013-1)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hartfelder, K., Bitondi, M. M. G., Brent, C. S., Guidugli-lazzarini, K. R., Simões, L. P., Stabentheiner, A., ... Wang, Y. (2015). Standard methods for physiology and biochemistry research in Apis mellifera Standard methods for physiology and biochemistry research in Apis mellifera Métodos estándar para la investigación de la fisiología y bioquímica de Apis mellifera. *Journal of Apicultural Research*, (July), 0–48. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.06>
- He, Q., Zhang, Z., Gao, F., Li, Y., & Shi, J. (2011). In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles : Effects of Particle Size and PEGylation. *Small*, 7(2), 271–280. <https://doi.org/10.1002/smll.201001459>
- Hesham, E.-S., Abd, E.-W. A., Nermeen, Y., Ghulam, M. S., Lei, C., Moustafa, M., ... Shaden, K. (2020). Antimicrobial Properties of Apis mellifera ' s Bee Venom. *Toxins*, 12(541), 2–17. <https://doi.org/doi:10.3390/toxins12070451>
- Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., & Fröba, M. (2006). Silica-Based Mesoporous Organic – Inorganic Hybrid Materials Angewandte. *Angewandte*

Chemie, 45, 3216–3251. <https://doi.org/10.1002/anie.200503075>

- Ip, S., Liao, S., Lin, S., Lin, J., Yang, J., Lin, M., ... Chung, J. (2008). The Role of Mitochondria in Bee Venom-induced Apoptosis in Human Breast Cancer MCF7 Cells. *In Vivo*, 22, 237–246. <https://doi.org/0258-851X/2008>
- Ip, S., Wei, H., Lin, J., Kuo, H., Liu, K., Hsu, S., ... Chiu, T. (2008). Bee Venom Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Cervical Epidermoid Carcinoma Ca Ski Cells. *Anticancer Research*, 28, 833–842. <https://doi.org/0250-7005/2008>
- Jallouk, A. P., Palekar, R. U., Marsh, J. N., Pan, H., Pham, C. T. N., Schlesinger, P. H., & Wickline, S. A. (2015). Delivery of a Protease-Activated Cytolytic Peptide Prodrug by Perfluorocarbon Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 26, 1640–1650. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00246>
- Jeffrey, F. E., & Ming-Shi, J. (1993). Possible Mechanism of Action Of Cobra Snake Venom Cardiotoxins And Bee Venom Melittin. *Toxicon*, 31(6), 669–695. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90375-S](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90375-S)
- Jeong, Y., Choi, Y., Shin, J., Cho, H., Kang, J., Park, K., ... Chang, Y. (2014). Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K / Akt / mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 68, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.022>
- Jo, M., Hee, M., Saranya, P., Jun, B., Sueb, H., Bae, S., ... Tae, J. (2012). Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2 / STAT3 pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.009>
- Ju, D., Woong, J., Hee, Y., Sueb, H., Kil, C., & Tae, J. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology and Therapeutics*, 115, 246–270. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.004>
- Karaman, D. Sen, Desai, D., Senthilkumar, R., Johansson, E. M., Rått, N., Odén, M., ... Rosenholm, J. M. (2012). Shape engineering vs organic modification of inorganic nanoparticles as a tool for enhancing cellular internalization. *Nanoscale Research Letters*, 7(358), 1–14.
- Kence, M., Kence, A., & Kandermir, İ. (1998). *TÜRKİYE'DE BAL ARISI (Apis mellifera L.) İRKLARININ KARAKTERİZASYONU VE KORUNMASI*. Ankara: TÜBİTAK.
- Killion, J. J., & Dunn, J. D. (1986). Differential Cytolysis of Murine Spleen, Bone-marrow and Leukemia Cells by Melittin Reveals Differences in Membrane Topography. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 139(1), 222–227. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(86\)80102-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(86)80102-4)
- Kresge, C. T., Leonowicz, M. J., Roth, W. J., Vartuli, J. J., & Beck, J. S. (1992).

Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, 359, 710–712.

- Kwon, E. J., Skalak, M., Bertucci, A., Braun, G., Ricci, F., Ruoslahti, E., ... Bhatia, S. N. (2017). Porous Silicon Nanoparticle Delivery of Tandem Peptide Anti-Infectives for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *Advanced Materials*, 29, 1–9. <https://doi.org/10.1002/adma.201701527>
- Labhasetwar, V., & Ph, D. (2005). Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4(4), 363–374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/153303460500400405>
- Lee, C., Bae, S. 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.
- Lee, G., & Bae, H. (2016). Bee Venom Phospholipase A 2 : Yesterday ' s Enemy Becomes Today ' s Friend. *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins8020048>
- Li, C., Pazgier, M., Liu, M., Lu, W., & Lu, W. (2009). Apamin as a Template for Structure-Based Rational Design of Potent Peptide Activators of p53**. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 8712–8715. <https://doi.org/10.1002/anie.200904550>
- Liao, C., Danqiao, X., Liu, X., Yi, J., Li, X., & Guo, B. (2018). Iridium (III) complex-loaded liposomes as a drug delivery system for lung cancer through mitochondrial dysfunction. *International Journal of Nano*, 13, 4417–4431. <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/IJN.S170035>
- Lim, M. H., & Stein, A. (1999). Comparative Studies of Grafting and Direct Syntheses of Inorganic - Organic Hybrid Mesoporous Materials. *Chem. Mater*, 11(20), 3285–3295. <https://doi.org/10.1021/cm990369r>
- Mart, M., & Gun, Y. K. (2018). Mesoporous Silica Materials as Drug Delivery : “ The Nightmare ” of Bacterial Infection. *Pharmaceutics*, 10(279), 1–29. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040279>
- Martínez-carmona, M., Lozano, D., & Vallet-regí, M. (2018). Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment. *Acta Biomaterialia*, 65, 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.007>
- Mohamed, A., Amir, E. L., Nassar, M. I., & Zohdi, H. F. (2017). BEE VENOM LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES AS TREATMENT FOR AMOEBIASIS IN MICE. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 47(2), 443–458.
- Moon, D., Park, S., Hyun, Y., Deuk, N., Lee, C., & Kim, G. (2008). Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human. *Toxicon*, 51(February), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.015>

- Moreno, M., & Giralt, E. (2015). Three Valuable Peptides from Bee and Wasp Venoms for Therapeutic and Biotechnological Use: Melittin, Apamin and Mastoparan. *Toxins*, 7, 1126–1150. <https://doi.org/10.3390/toxins7041126>
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Naz, S., Wang, M., Han, Y., Hu, B., Teng, L., Zhou, J., ... Chen, J. (2019). Enzyme-responsive mesoporous silica nanoparticles for tumor cells and mitochondria multistage-targeted drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 2533–2542. <https://doi.org/http://doi.org/10.2147/IJN.S202210>
- Nie, S., Xing, Y., Kim, G. J., & Simons, J. W. (2007). Nanotechnology Applications in Cancer. *The Annual Review of Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152025>
- Odén, M., Eriksson, E., & Rosenholm, J. M. (2015). Targeted delivery of a novel anticancer compound anisomelic acid using chitosan-coated porous silica nanorods for enhancing the apoptotic effect. *Biomaterials Science*, 3, 103–111. <https://doi.org/10.1039/c4bm00278d>
- Ojciu, D. M., & Nasil, P. B. (1994). Cytolysis mediated by . ionophores agents : role of intracellular in apopos. *The FASEB Journal*, 8, 237–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.8.2.8119494>
- Or, N. (2012). Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*, 173–194. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9339-3>
- Oršolić, N. (2009). POTENTIATION OF BLEOMYCIN LETHALITY IN HeLa AND V79 CELLS BY BEE VENOM. *Arh Hig Rada Toksikol*, 60(20), 317–326. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1936>
- Park, C., Oh, K., Lee, S. C., & Kim, C. (2007). Controlled Release of Guest Molecules from Mesoporous Silica Particles Based on a pH-Responsive Polypseudorotaxane Motif **. *Angewandte Chemie*, 1455–1457. <https://doi.org/10.1002/anie.200603404>
- Park, M. H., Choi, M. S., Kwak, D. H., Oh, K., Yoon, D. Y., Han, S. B., ... Hong, J. T. (2011). Anti-Cancer Effect of BeeVenom in Prostate Cancer CellsThrough Activation of Caspase Pathway Via Inactivation of NF- k B. *The Prostate*, 812. <https://doi.org/10.1002/pros.21296>
- PECORINO, L. (2012). *Molecular Biology Of Cancer* (Third Edit). United Kingdom: OXFORD UNIVERSITY PRESS.
- Petros, R. A., & Desimone, J. M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Publishing Group*, 9(July), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>
- Pu, X., Jia Li, P. Q., Li, M., Wang, H., Zong, L., Yuan, Q., & Duan, S. (2019). Mesoporous Silica Nanoparticles as a Prospective and Promising Approach for Drug Delivery and Biomedical Applications. *Current Cancer Drug Targets*, 19(4). <https://doi.org/10.2174/1568009619666181206114904>

- Putz, T., Ramoner, Æ. R., & Gander, Æ. H. (2006). Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2. *Cancer Immunol Immunother*, 55, 1374–1383. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0143-9>
- Ra, A., Real, R. P., & Pe, J. (2001). A New Property of MCM-41 : Drug Delivery System. *Chem. Mater*, 13(11), 308–311. <https://doi.org/10.1021/cm0011559>
- Rady, I., Siddiqui, I. A., Rady, M., & Mukhtar, H. (2017). Melittin , a major peptide component of bee venom , and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, 402, 16–31. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.010>
- Rosenholm, J. M., Mamaeva, V., & Sahlgren, C. (2012). Nanoparticles in targeted cancer therapy : mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage R eview. *Nanomedicine*, 7(1), 111–120. <https://doi.org/10.2217/NNM.11.166>
- Sayed, D., Al-sadoon, M. K., & Badr, G. (2012). Myeloma Cells to Snake (*Walterinnesia aegyptia*) Venom-Induced Apoptosis and Growth Arrest. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/386286>
- Schlossbauer, A., Dohmen, C., Schaffert, D., Wagner, E., & Bein, T. (2011). pH-Responsive Release of Acetal-Linked Melittin from SBA-15 Mesoporous Silica **. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 6828–6830. <https://doi.org/10.1002/anie.201005120>
- Selvarajan, V., Obuobi, S., Lai, P., & Ee, R. (2020). Silica Nanoparticles — A Versatile Tool for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Chemistry*, 8(602), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00602>
- Sen, D., & Kettiger, H. (2018). Silica-based nanoparticles as drug delivery systems: Chances and challenges. In *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines* (pp. 1–40). Turku, Finland: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813661-4.00001-8>
- Sengul, F., & Vatansev, H. (2021). Overview of Apitherapy Products : Anti-Cancer Effects of Bee Venom Used In Apitherapy. *International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research*, 2(1), 36–48.
- Shaw, P., Kumar, N., Hammerschmid, D., Privat-maldonado, A., Dewilde, S., & Bogaerts, A. (2019). Cancers Synergistic Effects of Melittin and Plasma Treatment : A Promising Approach for Cancer Therapy. *Cancers*, 11(1109), 1–19. <https://doi.org/doi:10.3390/cancers11081109>
- Shen, D., Yang, J., Li, X., Zhou, L., Zhang, R., Li, W., ... Zhao, D. (2014). Biphasic Stratification Approach to Three-Dimensional Dendritic Biodegradable Mesoporous Silica Nanospheres. *Nano Letters*, 14, 923–932. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/nl404316v>
- Shier, W. T. (1979). Activation of high levels of endogenous phospholipase A2 in cultured cells Biochemistry : Tieexposed. *PNAS*, 76(1), 195–199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.195>

- Shin, H., Kwak, M., Lee, T. G., & Lee, J. Y. (2020). Quantifying the level of nanoparticle uptake in mammalian cells using flow cytometry†. *Nanoscale*, 12, 15743–15751. <https://doi.org/10.1039/d0nr01627f>
- Şirin, Y., Çakır, E. H., Can, Z., Yıldız, O., & Kolaylı, S. (2017). Bal Arısı Zehrinin Karakterizasyonunda SDS-PAGE Elektrophorez Kullanılabilirliğinin Araştırılması. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 16(November 2016), 49–56.
- Sisakht, M., Mashkani, B., Bazi, A., Ostadi, H., Zare, M., Zahedi, F., ... Soukhtanloo, M. (2017). Bee venom induces apoptosis and suppresses matrix metalloproteinase-2 expression in human glioblastoma cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(3), 324–328. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.11.006>
- Sivandzade Farzane, Bhalerao Aditya, C. L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe Farzane. *Bio-Protocol*, 9(01), 1–13. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3128>
- Smith, P. ., Krohn, R. ., Hermanson, G. ., Mallia, A. K., Frovenzano, M. D., Fujimoto, E. K., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid '. *Analytical Chemistry*, 150, 76–85. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Soman, N. R., Wickline, S. A., Schlesinger, P. H., Soman, N. R., Baldwin, S. L., Hu, G., ... Schlesinger, P. H. (2009). Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2830–2842. <https://doi.org/10.1172/JCI38842.2830>
- Stober, W. E. R. N. E. R. (1968). Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range 1. *Journal of Colloid And Interface Science*, 26, 62–69. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- Suh, G., & Cho, C. (2015). Preformulation Studies of Bee Venom for the Preparation of Bee Venom-Loaded PLGA Particles. *Molecules*, 20, 15072–15083. <https://doi.org/10.3390/molecules200815072>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 0(0), 1–41. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tang, F., Li, L., & Chen, D. (2012). Mesoporous Silica Nanoparticles : Synthesis , Biocompatibility and Drug Delivery. *Advanced Materials*, 24, 1504–1534. <https://doi.org/10.1002/adma.201104763>
- Tarn, D., Ashley, C. E., Xue, M. I. N., Carnes, E. C., Zink, J. I., & Brinker, C. J. (2013). Mesoporous Silica Nanoparticle Nanocarriers: Biofunctionality and Biocompatibility. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 792–801. <https://doi.org/10.1021/ar3000986>
- Thermo Scientific. (2020). Pierce TM BCA Protein Assay Kit, User Guide.

Thermoscientific.

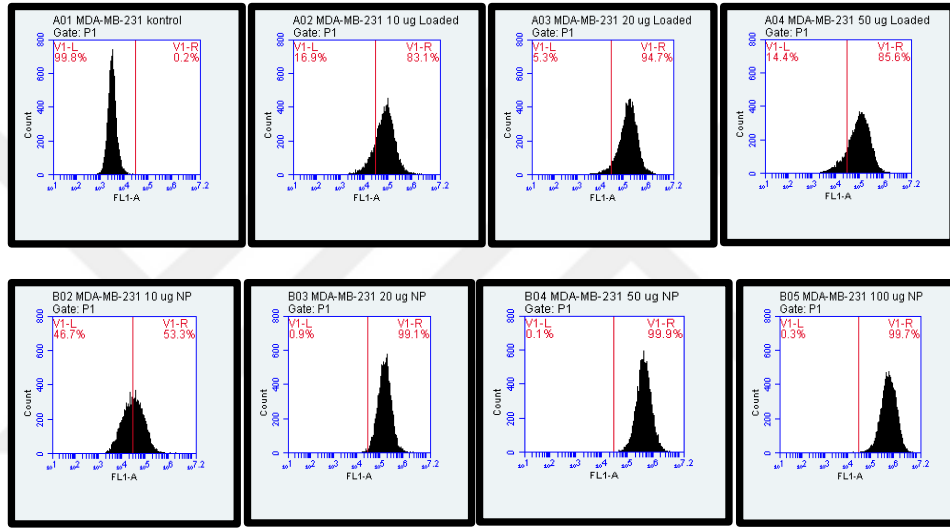
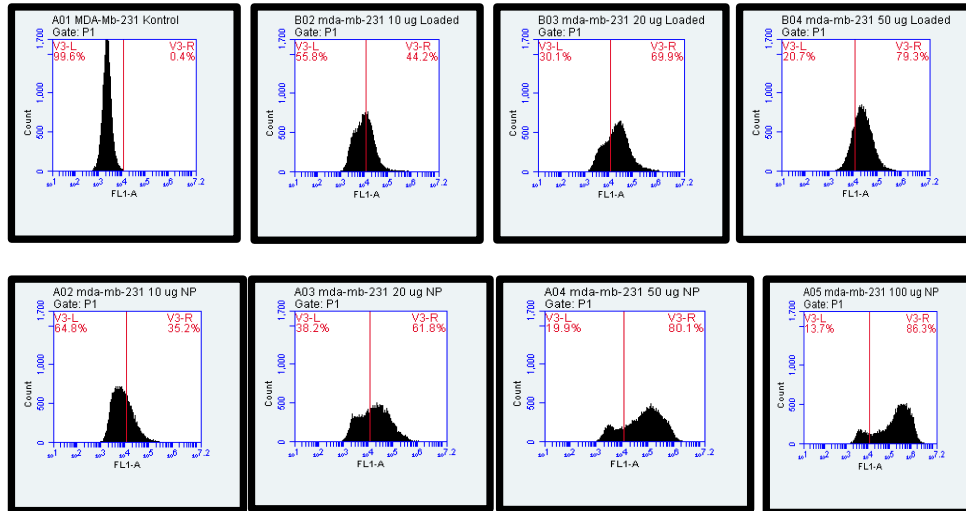
- Tian, Z., Yu, X., Ruan, Z., Zhu, M., & Zhu, Y. (2018). Microporous and Mesoporous Materials Magnetic mesoporous silica nanoparticles coated with thermo-responsive copolymer for potential chemo- and magnetic hyperthermia therapy. *Microporous and Mesoporous Materials*, 256, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.07.053>
- Trewyn, B. G., Slowing, I. I., Giri, S., Chen, H., & Lin, V. S. (2007). Synthesis and Functionalization of a Mesoporous Silica Nanoparticle Based on the Sol – Gel Process and Applications in Controlled Release. *Accounts of Chemical Research*, 40(9), 846–853. <https://doi.org/10.1021/ar600032u>
- Tu, W., Wu, C., Hsieh, H., Chen, C., & Hsu, S. (2008). Toxicon Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon*, 52, 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.06.007>
- Ung, G. Y. B. O. K. J., Uh, J. E. U. N. H., Ee, H. Y. O. U. N. G. L., & Ohyun, D. (2018). Anti-cancer effect of bee venom on human MDA-MB-231 breast cancer cells using Raman spectroscopy. *Biomedical Optics Express*, 9(11), 5703–5718. <https://doi.org/10.1364/BOE.9.005703>
- Vallet-Regí, M., Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., & Manzano, M. M. (2018). Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery : *Molecules*, 23(47), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules23010047>
- Vijaya, V. (2015). Review article An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*, 5(4), 1–6. <https://doi.org/10.7603/s40>
- Vivero-escoto, J. L., Vivero-escoto, J. L., Slowing, I. I., Trewyn, B. G., Lin, V. S., Memoriam, I., & Victor, P. (2010). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery. *Small*, 6(18), 1952–1967. <https://doi.org/10.1002/smll.200901789>
- Wang, X., Li, H., Lu, X., Wen, C., Huo, Z., Shi, M., & Tang, X. (2018). Melittin-induced long non-coding RNA NONHSAT105177 inhibits proliferation and migration of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death and Disease*, 9(940), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0965-3>
- Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., Obeid, D. El, & Obeid, E. (2019). Bee Venom : Overview of Main Compounds and Bioactivities for Therapeutic Interests. *Molecules*, 24, 1–13. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules24162997>
- Wiman, K. G. (2010). Pharmacological reactivation of mutant p53 : from protein structure to the cancer patient. *Oncogene*, 4245–4252. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.188>
- Wu, S.-H., Mou, C., & Lin, H.-P. (2013). Synthesis of mesoporous silica nanoparticles†. *Chem Soc Rev*, 42(9), 3649–4258. <https://doi.org/10.1039/c3cs35405a>
- Xu, C., Lei, C., & Yu, C. (2019). Mesoporous Silica Nanoparticles for Protein Protection and Delivery. *Frontiers in Chemistry*, 7(May), 1–12.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00290>

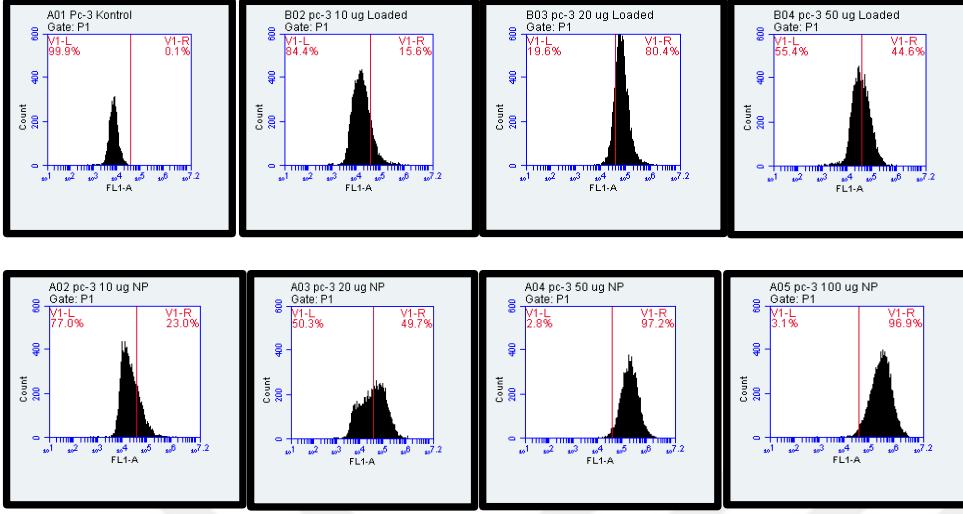
- Yu, Q., Deng, T., Lin, F., Zhang, B., & Zink, I. (2020). Supramolecular Assemblies of Heterogeneous Mesoporous Silica Nanoparticles to Co-deliver Antimicrobial Peptides and Antibiotics for Synergistic Eradication of Pathogenic Biofilm. *ACS Nano*, 14, 5936–5937. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c01336>
- Yu, X., Chen, L., Liu, J., Dai, B., Xu, G., Shen, G., ... Zhang, Z. (2019). Immune modulation of liver sinusoidal endothelial cells by melittin nanoparticles suppresses liver metastasis. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08538-x>
- Yu, X., Dai, Y., & Zhang, Z. (2020). Melittin-lipid nanoparticles target to lymph nodes and elicit a systemic anti-tumor immune response. *Nature Communications*, 11, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14906-9>
- Yusuf, N., Irby, C., Katiyar, S. K., & Elmets, C. A. (2007). Photoprotective effects of green tea polyphenols, 48–56.
- Zambelli, V. O., Picolo, G., Fernandes, C. A. H., Fontes, M. R. M., & Cury, Y. (2017). Pain and Analgesia. *Toxins*, 9(406), 2–27. <https://doi.org/10.3390/toxins9120406>
- Zarrinnahad, H., Mahmoodzadeh, A., Parviz, M., Mehdi, H., & Ali, M. (2018). Apoptotic Effect of Melittin Purified from Iranian Honey Bee Venom on Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24(4), 563–570. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9641-1>
- Zhang, S. U. F., & Chen, Z. H. E. (2017). Melittin exerts an antitumor effect on non - small cell lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 16, 3581–3586. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6970>
- Zhao, Y., Sun, X., Zhang, G., Trewyn, B. G., Slowing, I. I., & Lin, V. S. (2011). Interaction of Mesoporous Silica Nanoparticles with Human Red Blood Cell Membranes: Size and Surface Effects. *ACS NANO*, 5(2), 1366–1375. <https://doi.org/10.1021/nn103077k>
- Zhou, Y., Quan, G., Wu, Q., Zhang, X., & Niu, B. (2018). Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.007>
- Zulfiqar, U., Subhani, T., & Husain, S. W. (2018). Synthesis and characterization of silica nanoparticles from clay Synthesis and characterization of silica nanoparticles from clay. *Integrative Medicine Research*, 4(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.jascer.2015.12.001>

EKLER**Ek 1 Hücre İçine Alım Testleri**

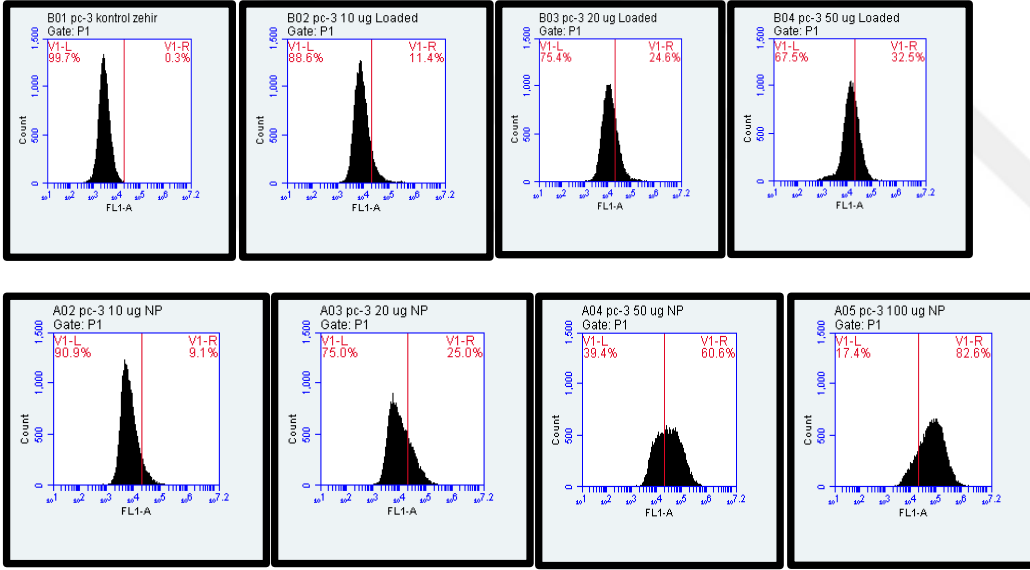
Ek1.1 Flow sitometri hücre içine alım testleri A) Kontrole kıyasla MDA-MB 231 hücrelerinde sırasıyla 10,20,50 $\mu\text{g/mL}$ arı zehri yüklü nanopartiküllerin ve 10, 20,50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ arı zehri yüklenmemiş nanopartiküllerin 4 saat muamele sonrasındaki FITC (FL1-A) sinyalleri B) MDA-MB 231 hücrelerinin 24 saat muamele sonrasındaki sonuçları C) PC3 hücrelerinin 4 saat muamele sonrasındaki sonuçları D) PC3 hücrelerinin 24 saat muamele sonrasındaki sonuçları

A**B**

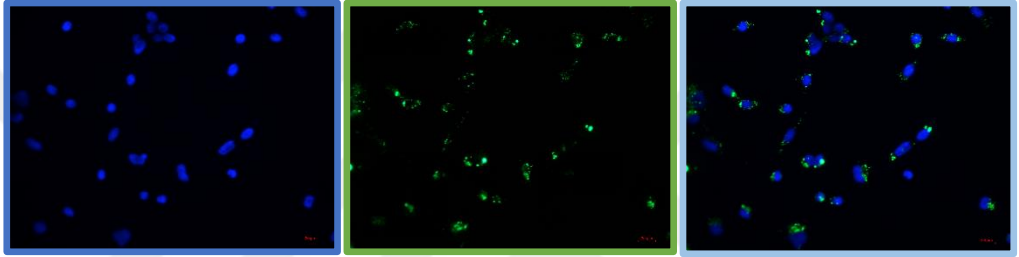
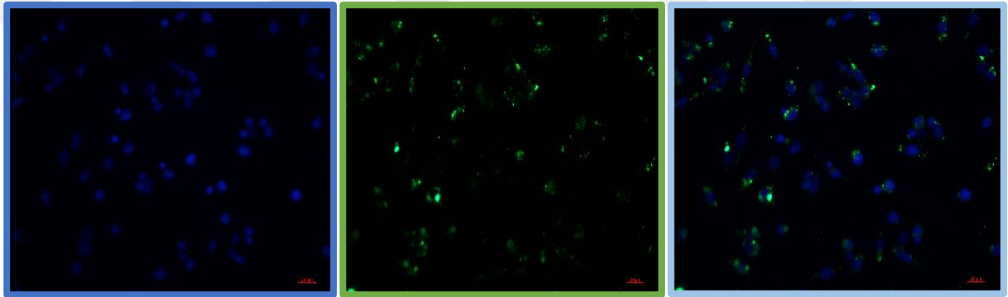
C

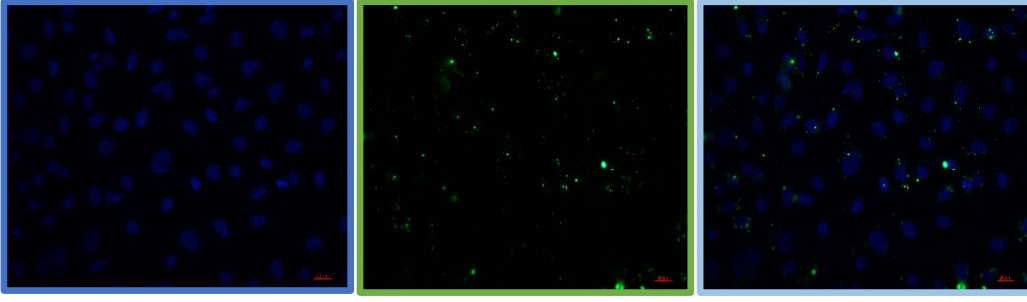


D

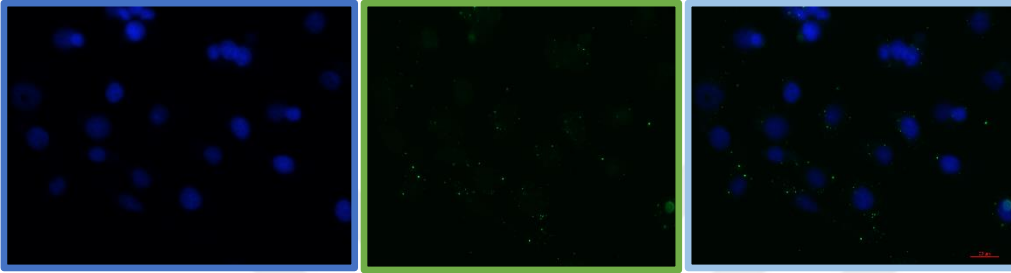


Ek1. 2 MSN %10 APTES - FITC Hücre içine alım testi görüntüleri soldan sağa DAPI, FITC ve karşılaştırılmış halleri. A) 4 saat muamele sonrası MDA-MB 231 ve PC3 hücreleri B) 24 saat muamele sonrası MDA-MB 231 ve PC3 hücreleri (Ölçek çubuğu : 20µm) görülmektedir.

A**Kontrol – MDA-MB 231****50 µg/mL – MSN %10 APTES, MDA-MB 231****50 µg/mL – Zehir Yüklü MSN %10 APTES, MDA-MB 231****Kontrol – PC3****50 µg/mL – MSN %10 APTES, PC3**



50 µg/mL – Zehir Yüklü MSN %10 APTES, PC3

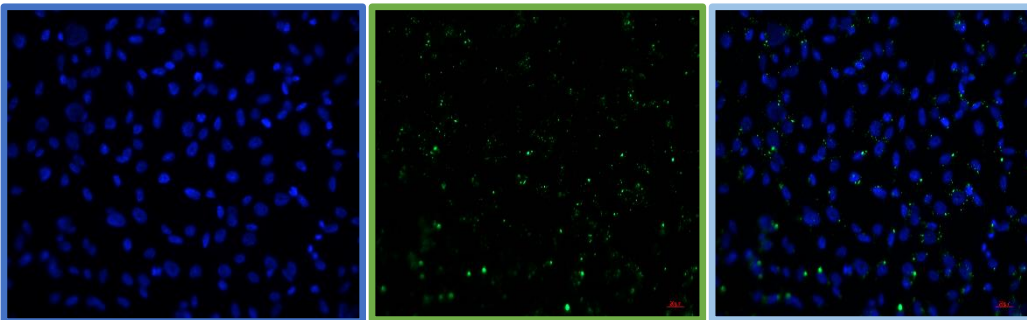


B

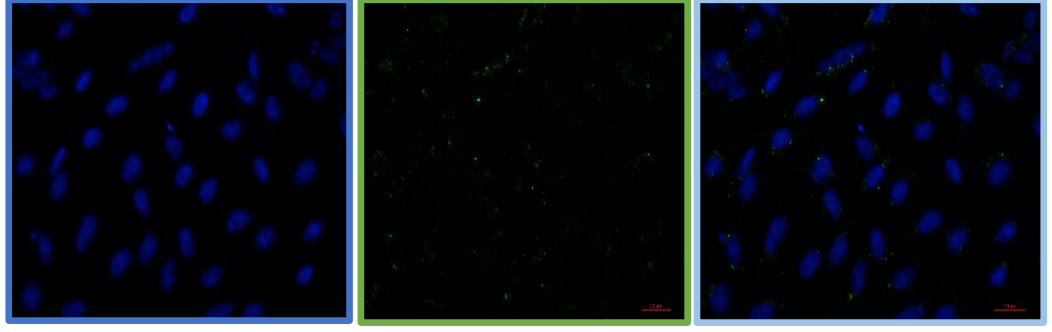
Kontrol – MDA-MB 231



50 µg/mL – MSN %10 APTES, MDA-MB 231



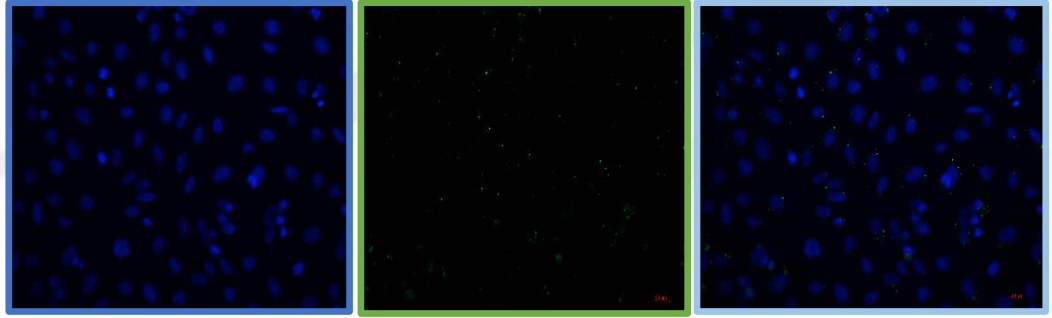
50 µg/mL – Zehir Yüklü MSN %10 APTES, MDA-MB 231



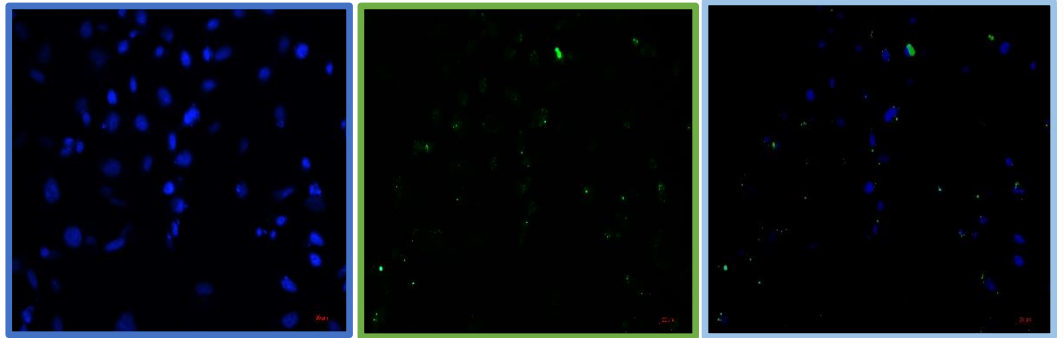
Kontrol – PC3



50 $\mu\text{g/mL}$ – MSN %10 APTES, PC3

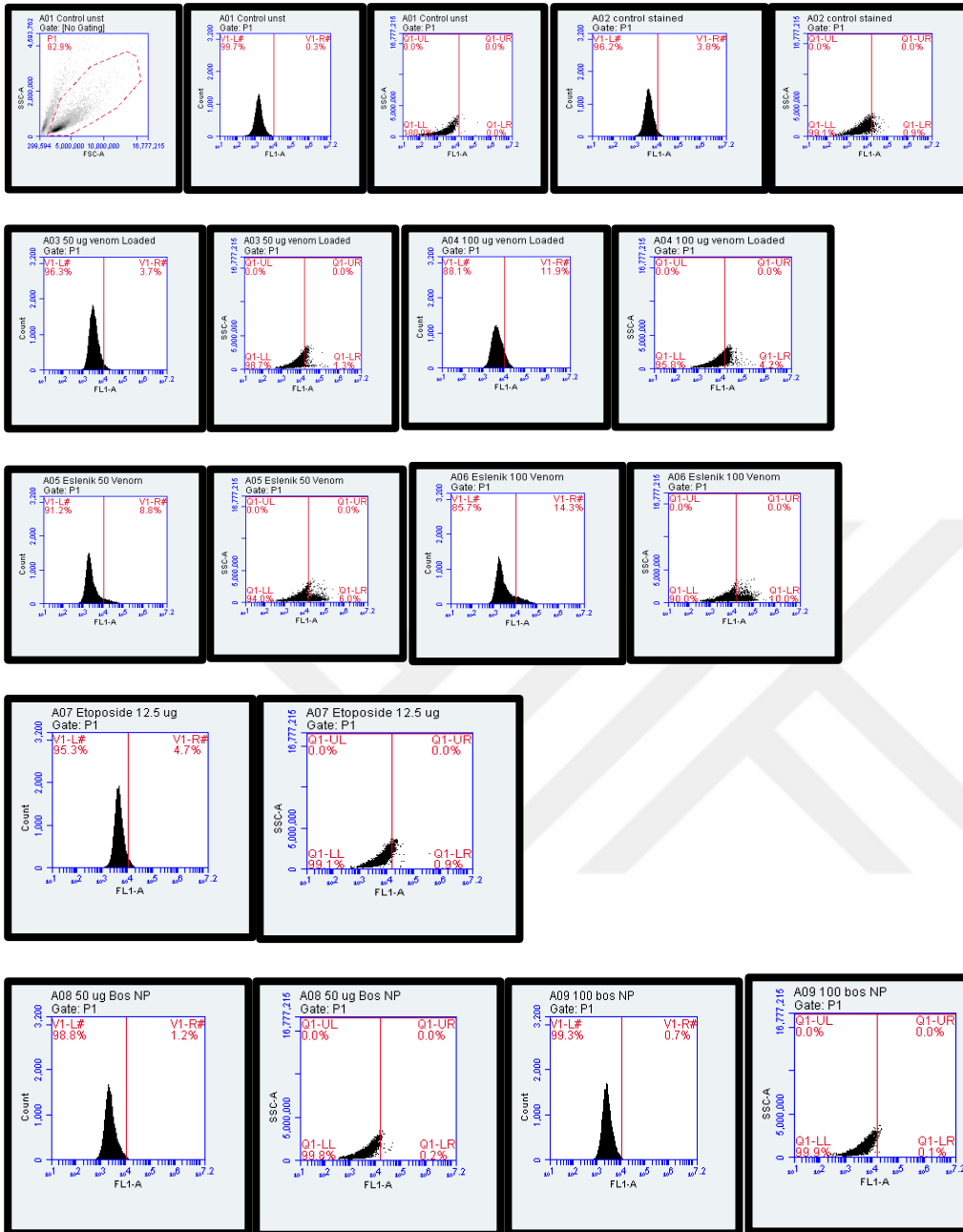
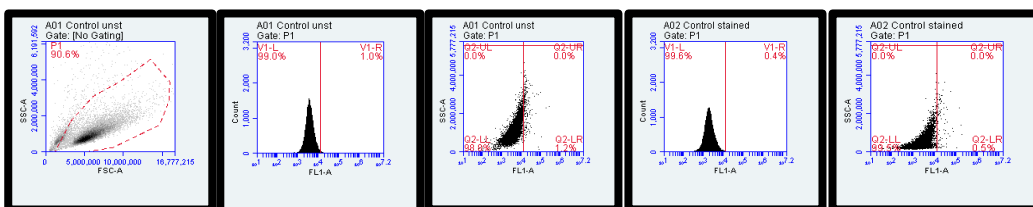


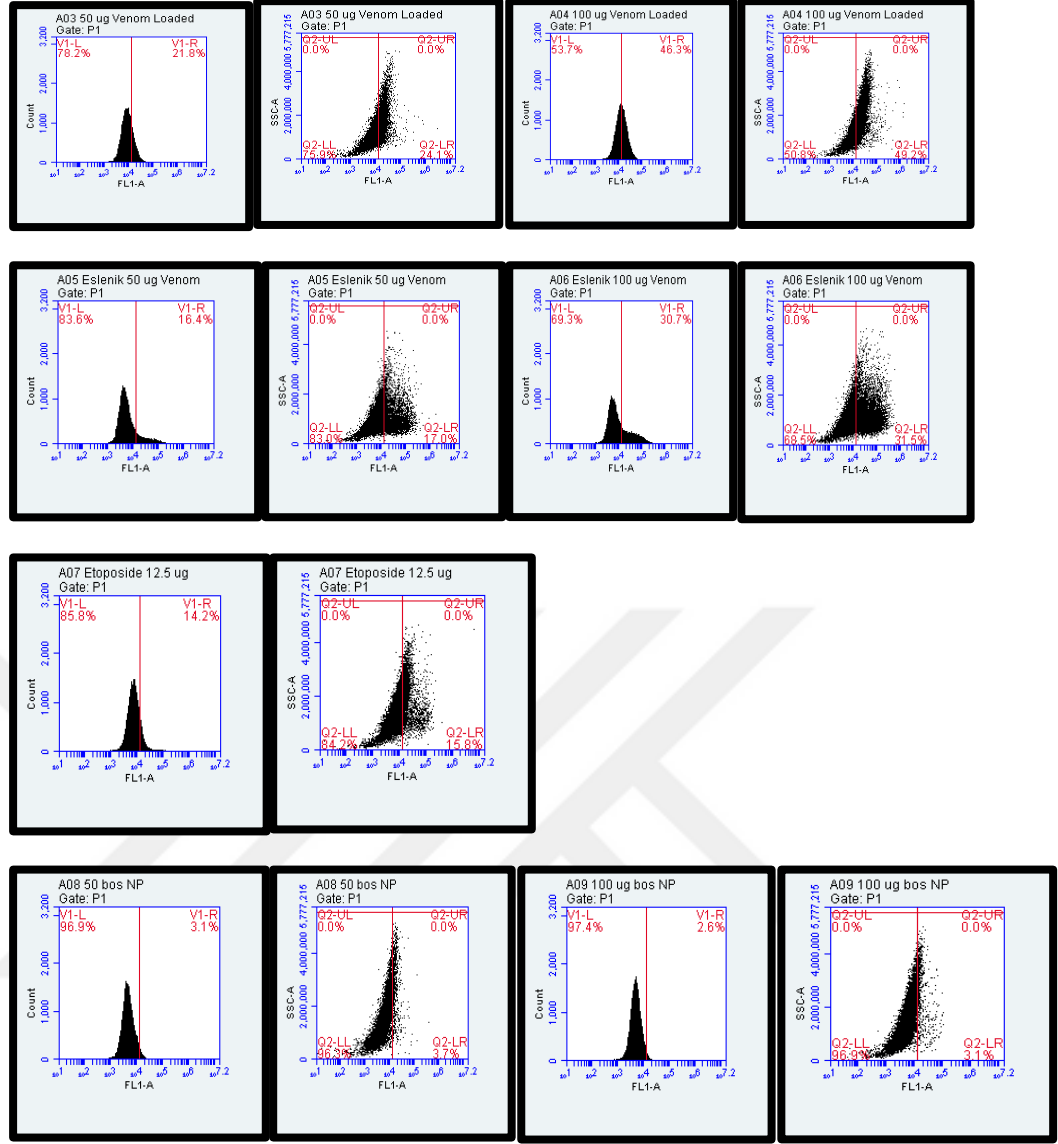
50 $\mu\text{g/mL}$ – Zehir Yüklü MSN %10 APTES, PC3



Ek 2. Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi

Ek 2.1 Flow sitometri ile Aneksin V boyama yöntemi kullanılarak elde edilen analiz sonuçları. A) 24 saat uygulama sonrası MDA-MB 231 meme kanseri hücreleri B) 24 saat uygulama sonrası PC3 prostat kanseri hücreleri

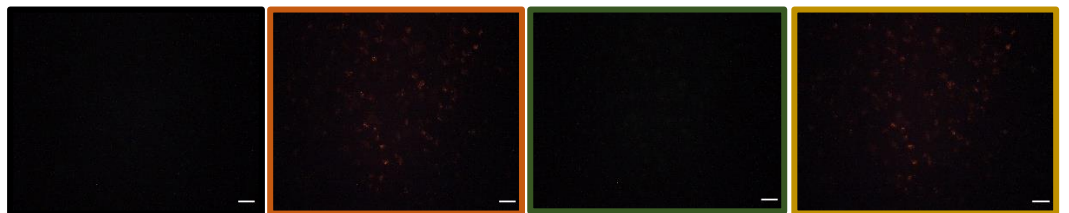
A**B**

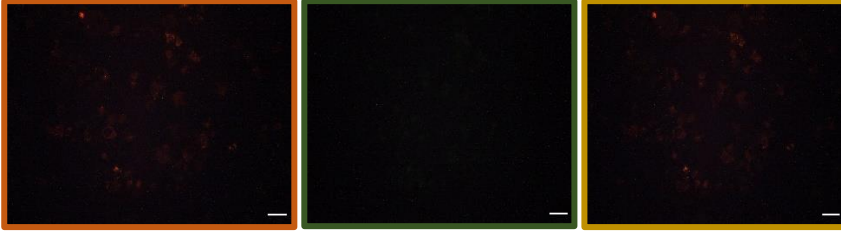
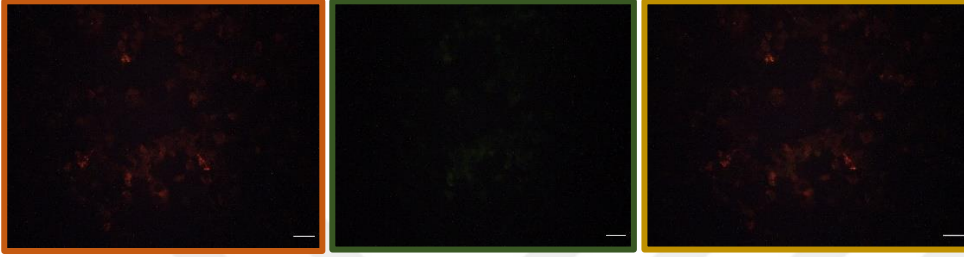
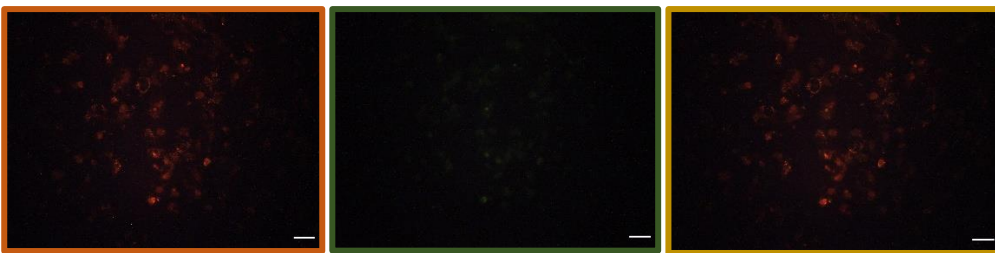


Ek 2.2 Arı zehri, arı zehri yüklü MSN ve yüklenmemiş MSN'lerin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi, soldan sağa kırmızı, yeşil ve çakıştırılmış halleri. A) MDA-MB 231 floresan mikroskobu görüntüleri, B) PC3 floresan mikroskobu görüntüleri, (Ölçek çubuğu : 100 μ m)

A

MDA-MB 231 Boyanmamış Kontrol ve Boyanmış Kontroller

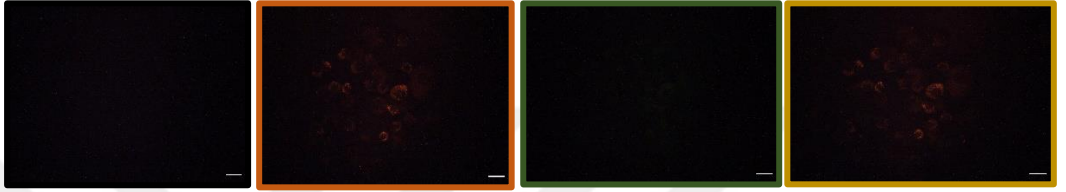


MDA-MB 231 50 µg/mL Zehir Yüklü MSN %10 APTES**MDA-MB 231 100 µg/mL Zehir Yüklü MSN %10 APTES****MDA-MB 231 50 µg/mL Nanopartiküle Yüklenen Eşlenik Zehir****MDA-MB 231 100 µg/mL Nanopartiküle Yüklenen Eşlenik Zehir****MDA-MB 231 50 µg/mL Yüklenmemiş Nanopartikül****MDA-MB 231 100 µg/mL Yüklenmemiş Nanopartikül**

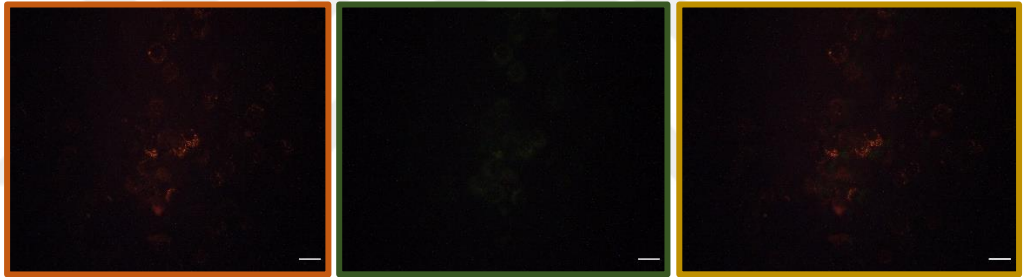


B

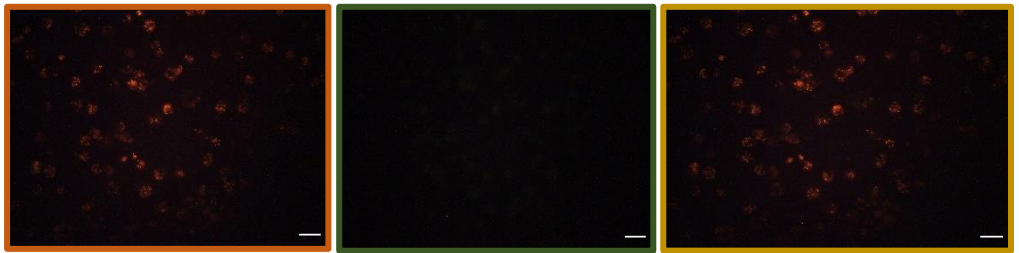
PC3 Boyanmamış Kontrol ve Boyanmış Kontroller



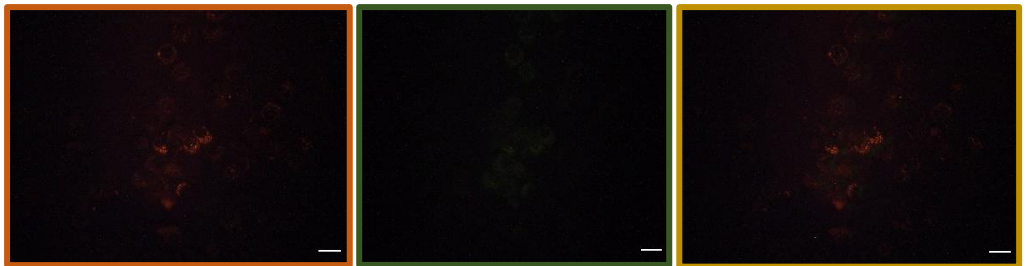
PC3 50 $\mu\text{g/mL}$ Zehir Yüklü MSN %10 APTES



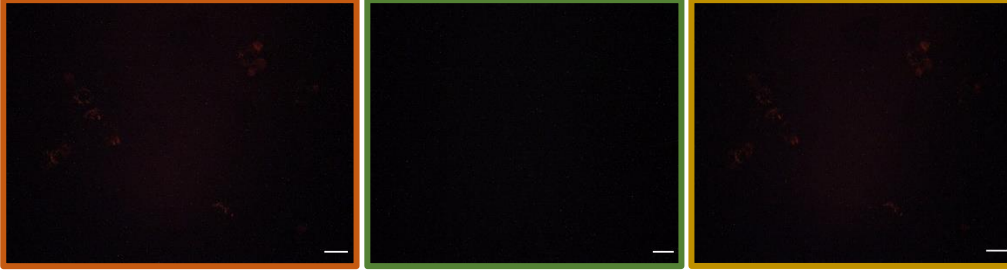
PC3 100 $\mu\text{g/mL}$ Zehir Yüklü MSN %10 APTES



PC3 50 $\mu\text{g/mL}$ Nanopartiküle Yüklenen Eşlenik Zehir



PC3 100 $\mu\text{g/mL}$ Nanopartiküle Yüklenen Eşlenik Zehir



PC3 50 µg/mL Y klenmeyen Nanopartikül



PC3 100 µg/mL Y klenmeyen Nanopartikül



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Batuhan ORMAN

Eğitim Bilgileri

Derece	Alan	Okul	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen, Matematik	M.A. Ersoy Anadolu Lisesi, Tekirdağ	2013
Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi, İzmir	2019
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Ege Üniversitesi, İzmir	2021

DENEYİM

- 07.2018-06.2019 Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL) Kromatografi ve Spektroskopi Laboratuvarı (Stajımı tamamladıktan sonra kısmi zamanlı çalışan olarak devam ettim)

Yabancı Dil : İngilizce

PROJELER

- Pilot Ölçekli Biyobenzer Folikül Stimüle Edici (FSH) Hormon Üretimi, BAP, Sanayi Destekli Proje, (Bursiyer) 2020-2021

YAYINLANMIŞ/YAYINLANMAKTA OLAN ÇALIŞMALAR

- Sarıkahya, B, N., Gören C, A., Okkalı, G., Çöven, O, F., Orman, B., Kırıcı D., Yücel, B., Kışla, D., Demirci B., & Nalbantsoy, A., CHEMICAL COMPOSITION and BIOLOGICAL ACTIVITIES of PROPOLIS SAMPLES from DIFFERENT GEOGRAPHICAL REGIONS of TURKEY, *Phytochemistry Letters*
- Akın, M., Saki, N., Güzel E., Orman B., Nalbantsyo A., Kocak M., Evaluation of in vitro cytotoxic, iNOS, antioxidant and photodynamic antimicrobial activities of water-soluble sulfonated phthalocyanines, *Photochemistry and Photobiology* - İncelemede

ULUSLARARASI ve ULUSAL TOPLANTILARDA YAYINLANMIŞ BİLDİRİ, SUNUMLAR

- Orman B., İlkaç R., Gümüş Z, P., Determination of α -Tocopherol, Vitamin A and β -Carotene by Using Molecularly Imprinted Polymers, 1st International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry (1st ICABC 2019), – Poster Bildirisi
- Orman B., Daşık P., Okutucu B., Atık Sulardan 5-Hidroksiindolasetik Asit Tayini İçin β - Siklodekstrin Konjuge, Damgalı Manyetik Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması, 2019, Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü Kariyer Günleri
- Nalbantsoy A, Karaman Ş, D., Orman B., Arı Zehri ile Kanser Terapisi Sunumu, Düzce Üniversitesi, DAGEM, Bal Arısı Zehri Paneli 10 Mart 2021
- Nalbantsoy A., Orman B Anadolu Propolisinin Ticari Potansiyeli Sunumu, Propolis Webinarı, BÜAGEM ve PİKOM, 14 Nisan 2021

SEMİNER ve KONGRELER

- 1st International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry (1st ICABC 2019), Antalya / Türkiye
- GMP, GLP, ISO 9001, ISO 17025, TSC Management System Academy, 2020, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü İzmir/Türkiye
- İş Güvenliği ve İşçi Sağlığı Kursu, 2020 İzmir/Türkiye
- Uygulamalı Temel Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Eğitimi, 2019 – Ege MATAL, İzmir/Türkiye
- İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Bilim Günü (Kanser ve Metabolizma üzerine), 2020, İzmir/Türkiye
- V. Türkiye *in vitro* Diyagnostik Sempozyumu “Sağlık Biyoteknolojisi”, 2020, İzmir/Türkiye
- 22. Ege Onkoloji Günleri, Onkolojide Yeni Tedavi Arayışları Sempozyumu, 2020, İzmir/Türkiye
- 3. Uluslararası Aşı Bilimi Webinarı “Covid-19 Aşısı ve Güncel Gelişmeler, 2021.
- Tübitak 2237-A Bilimsel Eğitim Etkinlikleri Desteği Programı kapsamında düzenlenen, "In vitro tekniklerden in vivo uygulamalara: 2D-3D Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Çalışmaları -2" Kursu, 2021, Ege MATAL, İzmir/Türkiye
- International Symposium of Cellular Therapies and Cancer: From Lab Bench to Clinic, 2021
- Biyoenformatik ve Disiplinler Arası Yaklaşımlar Konferansı, Bioinfoconferance, Bioinforange, 2021.

