

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HELOPHORUS* (COLEOPTERA: HELOPHORIDAE) CİNSİNE AİT
BAZI BÖCEK TÜRLERİNDEN ELDE EDİLECEK PROTEİN
EKSTRAKTLARININ ANTI KANSER ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUBA ELHAZAR İŞCEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAYA

BİNGÖL-2019



T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HELOPHORUS (COLEOPTERA: HELOPHORIDAE) CİNSİNE AİT BAZI BÖCEK
TÜRLERİNDEN ELDE EDİLECEK PROTEİN EKSTRAKTLARININ ANTI
KANSER VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAYA danışmanlığında, **Tuba ELHAZAR İŞCEN** tarafından hazırlanan bu çalışma **27/06/2019** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ** Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Abdullah MART

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAYA

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ekrem DARENDELİOĞLU

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve/..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: BAP-FEF.2017.00.003

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Bingöl Üniversitesi, Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve çalışmanın her aşamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAYA'ya derin minnet ve şükranlarımı sunarım. Çalışmamızda kullandığımız böcek türlerinin toplanması ve teşhisinde gerekli yardım ve kolaylığı sağlayan Prof. Dr. Abdullah MART'a ve Western Blot kısmında bizden desteklerini esirgemeyen ve fedakarlığıyla bize yardımcı olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Ekrem DARENDELİOĞLU'na ve yüksek lisans öğrencimiz Sedanur ÖZBOLAT'a, tüm hocalarıma, arkadaşlarıma ve öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak sürekli yanımda olan ailem ve eşim Yunus İŞCEN'e ayrıca Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne, Bübap birimine destekleri için teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISATMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Malzemeler.....	14
3.2. Metod.....	15
3.2.1. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi.....	15
3.2.1.1. DPPH Aktivitesinin Belirlenmesi.....	15
3.2.1.2. Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi.....	15
3.2.2. Anti Kanser Aktivitesinin Belirlenmesi.....	16
3.2.2.1. Hücreler.....	16
3.2.2.2. Medyum Hazırlama.....	16
3.2.2.3. Hücre Kültürü.....	16
3.2.2.3. WST-1 Tuzu ile Hücre Canlılığı Analizi.....	16
3.2.3. Protein Özütünün Hazırlanması.....	17

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	18
4.1. Antioksidan Test Sonuçları	18
4.1.1. DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi	18
4.1.2. Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi	19
4.2. Antikanser Test Sonuçları	20
4.2.1. Bradford Yöntemi İle Total Protein Tayini	20
4.2.2. WST-1 ile Hücre Canlılık Analizi.....	21
4.2.3. Western Blot Tekniği ile Hedef Proteinlerin Analizi	22
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	26
KAYNAKLAR.....	27
ÖZGEÇMİŞ.....	31

SİMGELER VE KISATMALAR LİSTESİ

CO ₂	: Karbondioksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Media
DMSO	: Dimetilsülfoksit
FBS	: Fetal bovine serum
PBS	: Phosphate Buffered Saline
WST-1	: 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H tetrazolium monosodium salt
ml	: Mililitre
mm	: milimetre
µg	: Mikrogram
Pc-3	: Prostate Cancer Cells
PSA	: Prostat Spesifik Antijen Testi
PCa	: Prostat kanseri
DNA	: Deoksiribonüklerikasit
MÇ	: Mikro Çekirdek
KA	: Kromozom Aberasyonu
Mg	: Miligram
TAK	: Toplam Antioksidan Kapasitesi
TOD	: Toplam oksidatif Durum
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
°C	: Santigrad derece
TCA	: Trikloroasetik asit
L929	: İnsan meme dokusu normal epitel hücre hattı
Ld50	: Radyasyon Ortalama Öldürücü Dozu
PGRP	: Peptidoglikan Reseptör Proteinleri

PRR	: Model Tanıma Reseptörleri
RPM	: Revolutions Per Minute
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HSV	: Herpes Simpleks Virüsü
UV	: Ultraviyole ışınları
Ph	: Power of Hydrogen
kDa	: Kilodalton
NaCl	: Sodyum klorür
KCl	: Potasyum klorür
TBS	: Transfer buffer saline
APS	: Amonyum persulfate
ECL	: Elektrokemilüminesans
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrihidrazil
FeCl ₂	: Demir(II) klorür
PIC	: Proteaz inhibitör kokteyli
PMSF	: Pheylmethyl sulfonyl flüoride
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
PVDF	: Polyvinylidene difluoride

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	DPPH giderme aktivitesi	18
Şekil 2.	Metal Şelatlama Aktivitesi	19
Şekil 3.	Bradford protein tayini için standart kalibrasyon grafiği	20
Şekil 4.	H. aquaticus türüne ait farklı konsantrasyonların hücre inhibisyonu üzerine etkisini gösteren	21
Şekil 5.	H. syriacus türüne ait farklı konsantrasyonların hücre inhibisyonu üzerine etkisini gösteren	22
Şekil 6.	Western Blot tekniği ile protein analizi A. Proteinlerin Jel üzerindeki fotoğrafları B. Protein oranlarının Çizelgeleri.....	23

HELOPHORUS (COLEOPTERA: HELOPHORIDAE) CİNSİNE AİT BAZI BÖCEK TÜRLERİNDEN ELDE EDİLECEK PROTEİN EKSTRAKTLARININ ANTI KANSER ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Bu çalışmada *Helophorus* (Coleoptera: Helophoridae) cinsine ait *H. aquaticus* ve *H. syriacus* türlerinin protein ekstrasyonu yapılmıştır. Protein miktarları Bradford yöntemi ile hesaplanmış ve sırasıyla 0,3514 mg/ml ve 0,3878 mg/ml olarak belirlenmiştir. Daha sonra bu örnekler hücre kültürüne PC3 (prostat Kanseri hücresi) hücrelerinde WST-1 ile hücre canlılık testine maruz bırakılmıştır. Test sonucu her iki türde böcek proteinleri hücre inhibisyonunda düşmeye neden olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek hücre inhibisyonu 1000 µg/ml böcek protein ekstraktı eklenmiş örneklerde gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın devamında etkin doz bulunmasından sonra western blot tekniği ile gen ürünü olan protein ürünlerine bakılmıştır. Sonuç olarak western blot tekniğinde böcek proteinlerinin hücre ölümünü sağlayacak olan proteinlerin üretimini desteklediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Helophorus, protein, western blot, CYT-c, kaspaz-3, hücre ölümü, kanser.

DETERMINATION OF ANTI-CANCER PROPERTIES OF PROTEIN EXTRACTS OBTAINED FROM SOME SPECIES OF HELOPHORUS GENUS (COLEOPTERA: HELOPHORIDAE)

ABSTRACT

In this study, protein extraction of *H. aquaticus* and *H. syriacus* species of Helophorus (Coleoptera: Helophoridae) was performed. Protein amounts were calculated by Bradford method and determined as 0.3514 mg/ml and 0.3878 mg/ml, respectively. These samples were then subjected to cell viability testing with WST-1 in cell culture PC3 (prostate cancer line) cells. It was observed that insect proteins in both species caused a decrease in cell inhibition. The highest cell inhibition was observed in samples with 1000 µg / ml insect protein extract added. After the effective dose was found, protein products which were gene products were examined by western blot technique. As a result, it was found that insect proteins supported the production of proteins that would cause cell death in western blot technique.

Keywords: *Helophorus*, protein, western blot, CYT-c, Caspase-3, cell death, cancer.

1. GİRİŞ

Böcekler, yeryüzündeki biyolojik çeşitliliğin %55'lik kısmını temsil etmektedir (Chernysh et al 2002). Yüksek oranda çeşitlilik gösteren bu grubun üyeleri dünya üzerinde hemen hemen her türlü ortama yayılmışlardır. Böceklerin çeşitli ortamlarda yaşayabilmeleri, uyum yeteneklerinin son derece güçlü olması sayesinde gerçekleşmiştir. Böcekler, insanların ve diğer canlı gruplarının ekolojik ve ekonomik yaşamları açısından çok önemli bir yer tutmaktadırlar (Koç 2011).

Böcekler, sağlıklı ve sürdürülebilir yüksek kaliteli protein kaynaklarıdır. İnsanlık tarihi boyunca geniş çapta tüketilmiştir. Yenilebilir böceklerin diyet proteinlerinin kaynaklarını zenginleştirdiği ve et, süt ürünleri ve tohumlar gibi geleneksel protein kaynaklarına oranla daha fazla protein içerdikleri bilinmektedir. Aynı zamanda böcekler yüksek yem dönüşüm verimliliğine sahip olduklarından hayvansal protein kaynaklarından daha üstündürler. Bunun nedeni, poikilotermik olmaları ve çok daha az miktarda enerji ve besin harcamalarıdır. Böcekler ayrıca diğer hayvanlara oranla daha hızlı ürer ve büyürler (Inje et al. 2018). Entomofajiye 90'dan fazla gelişmekte olan ülkelerde rastlanmaktadır (Defoliart 1995). Özellikle Asya, Afrika ve Latin Amerika'da insanların beslenme tarihinde çok önemli rol oynamıştır. Günümüzde ise hala güney Amerika, Afrika ve Asya'da meşhur yiyecekler arasındadır (Koç 2011). Gelenek ve kültürün yanı sıra insanlar türlerin lezzetini takiben genç aşamaları (larva ve nimf) dönemlerini tercih edebildikleri gibi pupaları yetişkinleri ve bu böceklerin tüm aşamalarını tercih edebilmektedirler (Jonas and Martinez 2017). Son 10 yılda, entomofajiye ilgi sürekli artmaktadır. Günümüzde böcekler dünya çapında 2 milyar insan tarafından tüketilmektedir.

2100'den fazla böcek türü literatürde yenilebilir olarak belgelendirilmiştir. Ayrıca, böcekler iyi bir protein kaynağı olarak bilinmektedir ve gelişmekte olan ülkelere Birleşmiş Milletler Gıda Tarım örgütü gibi çeşitli kuruluşlar tarafından yenilebilen

böceklerin üretimi desteklenmektedir. Ancak batılı tüketiciler böcekleri bir protein kaynağı olarak kabul etmekte isteksiz oldukları için gıda üretiminde böceklerin kullanımı, bunların çeşitli kaynaklarda kullanılabilmesi için farklı seviyelerde daha ayrıntılı araştırmalar yapılmasını gerektirmektedir. Bunun yanı sıra; birçok ülkede böcekler sıklıkla tüketildiği gibi hamur, pasta gibi gıda ürünlerinde kullanılmadan önce izole edilmektedir. Bu dikkatli tüketiciler arasında kabul edilebilirliği arttırmak için faydalı bir yol olabilir (Zielińska 2018).

Yenilebilen böceklerin bazıları farmakolojik olarak oldukça etkin maddelere sahip olduğu gibi bazısında savunma veya başka amaçlar için ürettikleri toksik metabolitler, bazısında ise alkaloid gibi kimyasal bileşikler bulundurlar. Diğer bazı böcekler ise kendi savunma mekanizmaları için konakçı bitkilerden sekonder metabolitleri ayrıştırıp aristokolit asit ve glukosinotlar gibi maddeleri elde ederek depolayabilirler (Duffey 1980; Harborne 1993; Berenbaum 1993; Blum 1994).

Böceklerin ve böcek kaynaklı ürünlerin tedavi amaçlı kullanımına “Entomoterapi” denir (Costa-Neto 2002). Entomoterapi dünyanın birçok yerinde çeşitli toplumlar tarafından geleneksel halk hekimliğinde uygulanmaktadır (Pemberton 1999; Costa-Neto 2002; Paoletti 2005). Arı ve eşek arıları, karıncalar, çekirgeler, termitler, kriketler, hamamböceği, gübre böceği ve tırtıllar tercih edilmektedir. Bunlar; mide rahatsızlığı, cilt hastalıkları, epilepsi, astım, bronşit, romatizma ve kısırlık gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için demlenmiş içecek ve merhem olarak kullanılmaktadır (Costa-Neto 2002). Ayrıca böcekler, antibakteriyel veya antifungal peptidler ve polipeptidleri dahil olmak üzere, bağışıklık kaynaklı moleküllerin çoğunu üreterek mikrobiyal enfeksiyonları hızla temizleyebilir (Chernysh et al. 2002).

Helophorus (Coleoptera: Helophorida) türleri, Coleoptera takımı böceklerin en geniş grubunu oluşturmaktadır ve bu takımın tanımlı 360 000 türü bulunmaktadır (Beutel and Haas 2000). Holometabol böcekler olan kınkanatlılar yaşam evreleri yumurta-larva-pupa-ergin şeklinde gerçekleşmektedir. Bu takımın en tipik özelliği uçuş sırasında ön kanatlarının uçuş yeteneğini yitirerek elitrayı oluşturması ve zamanla sadece arka kanatlarının uçuş yeteneğini korumasıdır. Çeşitli minerallerin birikmesiyle ön kanatlar

damarsız olup ve sert bir kın şeklini alır. Hassas yapılı olan arka kanatlar ise örtü halinde abdomeni koruyan bir yapıya sahiptirler (Jäch and Balke 2008).

Çoğunlukla yaşam evreleri suda geçen sucul kınkanatlılar larva ve ergin dönemleri genellikle su altında geçerken; pupa dönemleri ve bazı familyaları hariç karasaldir.

Helophoridae familyası, tek cinse sahip ve geniş yayılış gösteren bir familyadır (Darılmaz 2010). Diğer sucul Coleoptera üyelerinden pronotomlarında bulunan beş boyuna yarık dizisi ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Genel olarak vücut şekilleri boyuna olarak uzamış olup pronotum ve elitra arasında bir kesinti bulunmaktadır. Baş ve pronotumdaki noktalanmalar yarıklar dışında oldukça iyi bir şekilde gözlenmektedir. Başın üst yüzeyinde oldukça farklı büyüklüklerde olabilen Y şeklinde bir oluk bulunmaktadır. Bu oluk bazen oldukça dar olabildiği halde genelde üst yüzeyde genişlemiştir. Pedisel ile kupule arasındaki segment sayısının iki ya da üç olmasına bağlı olarak, antenler 8 ya da 9 segmentli olabilmektedir. Maxillar palpler, alt cinslerin teşhisinde kullanılan oldukça önemli karakterlerdir (Hansen 1987; Angus 1992). Elitra, aralıklarla bölünmüş 10 tam delik sırasına sahip olup, bazı türlerde birinci ve ikinci sıraların alt kısımlarında fazladan bir delik sırası bulunmaktadır. Elitra, orta kısmında sahip olduğu ok şeklindeki yapı ve siyah noktalar ile karakterize olup pek çok türde sarımsıdan kahverengiye kadar oldukça geniş bir renk yelpazesine sahiptir (Hansen 1987). Bacaklar oldukça zayıf olup tarsuslar 5 segmentlidir. Meso ve meta tarsusların basal segmenti küçük; dorsal yüzeyi ise oldukça uzun, iyi yapıda yüzme tüylerine sahiptir (Yılmaz 2011). Helophoridae türlerinin boyları 2-8 mm uzunluğundadır (Darılmaz 2010).

Helophorus türleri, yüksek dağların zirvelerinden deniz seviyesine kadar oldukça geniş bir alanda yayılış göstermektedir. Pek çok tür küçük su birikintilerinin kenar kısımları gibi organik madde bakımından zengin, durgun ve sığ suları yaşam alanı olarak tercih etmektedir. Bunun yanı sıra su ve toprak arasında kalan kum veya çamurlu alanlar, yosun ya da diğer vejetasyon elamanlarının bulunduğu çok önemli bölgeler de türler tarafından yaşam alanı olarak seçilebilmektedir (Yılmaz 2011).

Bir gıda maddesinin besin değeri büyük ölçüde içinde mevcut olan proteinin kalitesine bağlıdır. Diyet proteinleri, ozmotik dengeyi korumak, maddeleri kan yoluyla taşımak ve

bağışıklığı korumak için gerekli olan plazma proteinlerinin sentezini aminoasitler sağlamaktadır.

Proteinler ayrıca vücutta enzim ve hormon olarak önemli bir göreve sahiptirler (Inje et al. 2018). Aminoasitler, protein sentezinde ve fizyolojik aktivitelerde en çok bulunan metabolik familyalardan biridir ve aminoasit metabolizmasının işlevsizliği kanser hastalarında yaygın olarak görülür. Örneğin; taurin, glutamikasit, glisin, lizin ve ornitin akciğer kanseri dokularında önemli ölçüde değişmektedir ve kandaki serbest aminoasitler mide ve meme kanseri hastalarında lenf düğümü metastazları ve klinik tümör belirteçleri ile yüksek oranda ilişkilidirler (Yin et al. 2018). Herhangi bir gıdanın protein kalitesi, vücut fonksiyonlarının büyümesi ve bakımı için gerekli olan tüm aminoasitler ve protein sindirilebilirliğini sağlama yeteneğinin bir ölçüsüdür. Proteinlerin kalitesi, sıçan beslenme çalışmalarına dayanarak tarihsel olarak değerlendirilmiştir. Bu testler, protein kullanımı ve metabolizmasının bir göstergesi olarak büyüme veya azot dengesini ölçer. Protein kalite deneyleri, esansiyel aminoasit içeriğini, aminoasitlerin biyolojik olarak ölçülmesini ve test edilen gıda veya besin bileşeninin protein sindirilebilirliğini yansıtacak şekilde tasarlanmıştır. Protein kalitesini tahmini elde edebilmek için sık sık referans proteinlerle aminoasit kompozisyonu verileri derlenir (Inje et al. 2018).

Çok proteinli komplekslerin çoğu hücrenel süreçte anahtar düzenleyicilerdir. Bu komplekslerin boyutları yalnızca iki veya üç bileşenden büyük multimerik komplekslere kadar değişiklik gösterebilir (Charbonnier et al. 2008; Doucet and Hetzer 2010; Riccio 2010). Rekombinant protein teknolojileri sadece çok fazla araştırmanın değil, aynı zamanda biyolojik ilaçların temelini oluşturmaktadır (McKenzie and Abbott 2018). Son 10 yılda, özellikle yapısal biyoloji için ve rekombinat protein üretimi için teknolojide büyük ilerlemeler olmuştur. Bunun büyük bir kısmı, paralel işleme elde etmek için laboratuvar otomasyonunun kullanılmasında dahil olmak üzere, numune hazırlamada yüksek verim yaklaşımlarına öncülük etmiş yapısal genomik merkezleri tarafından yönetilmiştir (Nettlehip et al. 2010). Rekombinant proteinler, biyoformasötik endüstri tarafından geliştirilen en büyük yeni terapötik ürünler sınıfını temsil eder (Stuible et al. 2018).

Baykara (2016)'ya göre kanser; "Hücrelerin genetik faktörler ve çevresel koşulların etkisiyle kontrolsüz bölünmesi ve çoğalmasıyla ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Kanser aynı zamanda kişisel bir hastalıktır. Kişilerin benzer tedavilere farklı tepkiler vermesi dünya üzerindeki hiçbir insanın DNA'sı birbirine benzememesinin bir kanıtıdır. Teknolojinin ilerlemesi ile yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlere ek olarak biyolojik, hormonal, aşılar ve gen terapileri giderek artan sayıda kullanıldığını belgelemiştir."

Farklı hücre tiplerinin kanserleşme süreçleri birbirlerinden farklılık göstere bildiği gibi aynı hücre tipinin kansere gitme şekillerinde çeşitlilik gösterebilmektedir. Bilindiği üzere gelişmiş organizmalarda her işlevsel fonksiyonlar için farklı hücre tipleri özelleşmiştir. Hücrelerde ortak yollar olmasına rağmen gerçekleştirdikleri göreve bağlı olarak ifade edilen genler ve dolayısı ile tetiklenen yollar birbirlerinden farklılık gösterebilmektedirler (Bertram 2000; Hanahan and Weinberg 2011).

Kanser, özellikle Avrupa ülkeleri ve Amerika'da ikinci önde gelen ölüm nedenlerinden biri olup ve sınırsız hücre büyümesi ve bölünmesiyle ile karakterize olan oldukça heterojen bir hastalıktır. Kanserde hücre canlılığı ve hücre ölüm arasındaki denge kaybı, biyologlar arasında yaygın olarak incelenen bir konudur. Araştırmacılar için önemli bir zorluk ise, hastanın prognozunu ve genel sağkalımını arttıracak etkisi yüksek kanser tedavilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilmek ve kanser büyümesini hızlandıran karmaşık mekanizmaların tüm spektrumunu çözmektir.

Hücre ölümleri apoptoz ve nekroz olarak 2 tiptedir. Apoptozis, omurgalılarda gelişmekte olan ve homeostazide merkezi bir rol oynayan omurgalılarda programlanmış hücre ölümünün organize edilmiş bir işlemidir. Apoptoz kompleksinin mekanizması birçok yolu içerir. Morfolojik olarak ölen hücreler, birkaç yönden canlı hücrelerden büyük ölçüde farklılık gösterir. Spesifik morfolojik özellikler, özellikle hacim değişiklikleri hücre ölümü işlemine eşlik eder ve sıklıkla farklı hücre ölümü yollarını tanımlamak için kullanılır. Nekroz canlı dokulardaki hücrelerin erken ölüm olayıdır (El-Schich et al. 2015).

Prostat kanseri; en yaygın dermatolojik olmayan bir malignitedir (Das et al. 2019). Sanayileşmiş ülkelerde erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden biridir ve insidansı giderek artmaya devam etmektedir (Chistiakov et al. 2018). Prostat kanseri serum prostat Spesifik Antijen Testi, digital rektal muayene, manyetik rezonans görüntüleme ve biyopsi kombinasyonu ile lokalize bir aşamada teşhis edilir. Potansiyel prostat kanserine özgü biyo belirteçlerin geliştirilmesi uygun popülasyon taraması için çok önemlidir. Bu belirteçler, bir tedavinin klinik sonuçlarının tahmininde yardımcı olabilir. Tanı konduktan sonra düşük risk tümörlü erkeklere genellikle aktif bir sürveyans programı verilirken, orta veya yüksek risk tümörlü erkeklere cerrahi veya radyasyon tedavisi ile tedavi edilir (Das et al. 2019). Prognostik belirteçler, ölüm tümör nüksü veya metastaz dahil olmak üzere advers olay riskini değerlendirebilmek için klinik bir değere sahiptir. Prostat Spesifik Antijen Testi (PSA), bugüne kadar, ABD Gıda ve İlaç tarafından onaylanan tek belirteçtir (Chistiakov et al. 2018).

Prostat kanseri epidemiyolojisi, PSA testinin 50 yaşın üzerindeki erkeklerde prostat kanseri tarama yöntemi dahil edilmesinin bir sonucu olarak son 20 yılda önemli ölçüde değişmiştir. Bu 90'lı yılların ortalarında prostat kanseri insidansında çarpıcı bir şekilde artışa neden olmuştur. Erken tanıdaki artışa rağmen, metastatik hastalık tanısı olan veya tedavi edilemeyen hasta sayısı önemli ölçüde değişmemiştir. Tarama çabalarına paralel olarak, son 10 yılda hem lokalize hem de metastatik hastalığın tedavisinde önemli ölçüde iyileşme görülmüştür (Dellis et al. 2019).

2015 yılında prostat kanseri erkeklerde en yaygın olarak birinci sırada 55 yaş ve üstü hastaların %90,2'sin de görülmekte olup Tayvan ve Amerika Birleşik Devletler'in de ortalama prostat kanseri hastalarının yaş ortalaması sırasıyla 73 ve 66 yıldır (Chien et al. 2018). Amerika ve Avrupalı erkeklerde ikinci ve üçüncü önde gelen kanser ölüm nedenidir. ABD'de 2018'de yaklaşık 160,000 yeni PCa teşhisi konulmuş olup 29,000'den fazla ölüm olacağı tahmin edilmektedir.

Çinde dahil olmak üzere Asya ülkelerinde bildirilen PCa insidansı ve ölüm oranı Batı ülkelerine oranla daha düşük olmasına rağmen, PCa insidansı 2000'den bu yana yıllık %12,6 oranında değişim göstererek hızla artmıştır. Metastatik olmayanların %98,9'un da

5 yıllık sağkalım oranı, ancak ilk tanıda metastatik PCa hastalarında sağkalım oranı %30'dan azdır (Dong et al. 2019). Kanser teşhisi ve tedavisinde, genel anksiyete, depresyonun olumsuz etkilerinin yaşam kalitesini düşürdüğü bilinmektedir. Prostat kanserine özel anksiyeteyi içeren hastalarda değişik tipte duygusal sıkıntılara sebep olduğu bilinmektedir. Çoğu durumda prostat kanseri yavaş ilerler ancak agresif durumlarda ayrıca hızla büyüebilmektedir. Ancak pozitif etkiler fiziksel rahatsızlık semptomlarını hafifletmeye yardımcı olur ve vücudun kendini onarma yeteneğini geliştirir. Pozitif etki, bir insanın hayattan zevk aldığını ve kendini coşkulu, aktif, güçlü ve enerjik hissettiğini ifade eder (Chien et al. 2018).

Doğadaki bu böcekler insanlar için doğru ilacı üreten bir fabrikaya dönüştürülebilir ise bu kadar yüksek oranda biyolojik çeşitliliğe sahip olan bir canlı grubunun var olan ekolojik görevlerinin yanında çağımızın hastalı olan kanserin tedavisinde de insanlığın hizmetine sunulabilmesi son derece büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışma ile doğal habitatlardan toplanan *Helophorus* (Coleoptera: Helophoridae) cinsine ait bazı böcek türlerinden elde edilen protein ekstraktlarının anti-kanserojen özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları ileriki çalışmalara rehber olacağı gibi kompleks hastalıklarından biri olan kanser hastalığında potansiyel tedavi edici olarak uygulanıp uygulanmayacağı hakkında bilgi verecektir.

Helophoridae familyasına ait böcek türlerinden elde edilen protein ekstraktlarının anti-kanser özellikleri ile ilgili daha önceden yapılmış bir araştırmanın bulunmayışı nedeniyle böyle bir çalışma planlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Paoletti (2005), Minilvestock'un böcekler, kemriyenler, kurbağalar ve salyangozlara potansiyel etkileri hakkında bilgi vermiştir. Minilvestock'a özellikle tropik bölgelerde (Orta ve Güney Amerika, Afrika, Çin, Güneydoğu Asya, Avustralya ve Japonya) yaşayan insanların diyetlerinde protein, yağ, mineraller ve vitaminler bakımından zengin bir kaynak oluşturduğunu ileri sürmüştür.

Cota-Neto (2002), Böceklerin geleneksel olarak birçok toplum tarafından besin kaynağı olarak tüketildiğini ve ancak tüketimle ilgili şuan ki tutumun azaldığını bildirmiştir. Böceklerin beslenme özellikleri düşünüldüğünde, dünyanın birçok yerinde malnütrisyon ve açlık sorununu azaltmayı amaçlayarak yenilebilir kaynaklar olabileceğini önermiştir.

İncekara vd. (2008), *Callimenes lapites* türü çekirgenin sulu ekstresinin in-vitro şartlarda insan lenfositleri üzerinde genetik ve oksidatif etkilerini araştırmışlardır. Aseton, etanol ve dietil eter gibi çeşitli çözücülerde hazırlanan *C.lapites* ekstrelerinin kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında herhangi bir mutajenik potansiyele sahip olmadığı fakat artan dozlarda sitotoksitesinin dikkate alınması gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca in-vitro şartlarda MÇ (Mikro çekirdek) ve TAK (Toplam Antioksidan Kapasitesi) testlerinin ortak kullanımının, mutajenite ve karsinojeniteye bağlı olarak yenilebilen böceklerin potansiyel sağlık risklerinin değerlendirilmesine olanak sağlayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Türkez vd. (2010), suda çözünebilir *Saga ephippigera ephippigera* ve *Callimenes dilatatus* ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarına (1,5, 10, 20, 25, 50, 75 ve 100 mg/l) tabi tutulan insan tam kan kültürlerindeki genotoksitesiyi belirlemişlerdir. In-vitro şartlarda sulu ekstrelerle oluşturulan DNA ve kromozom hasarlarının tespitinde ilk kez Kromozom Aberasyonu (KA) ve Mikro çekirdek (MÇ) testleri kullanılmıştır. Test edilen

konsantrasyonlar da bu ekstrelerin genotoksik etkilerinin bulunmadığı sonucu ortaya çıkarılmıştır. Yenilebilir böceklerin mutajenite ve karsinojenite ile ilgili potansiyel sağlık risklerinin değerlendirilmesinde in-vitro genotoksisitesinin biyolojik izlenmesinin faydalı olabileceği önerilmiştir.

Pemberton (1999), Böcekler ve diğer eklem bacaklılar Kore’de geleneksel olarak tıpta kullanılırken modern Güney Kore tıbbında kullanımları hakkında çok az bilgiye sahip olduğunu bildirmiştir. Eklem bacaklı ilaçların çoğu geleneksel olarak Kore yarımadasından toplandığını ya da yetiştirildiğini, ancak şimdi Çin’den ithal edildiğini bildirmiştir. Fakat eklem bacaklıların birçoğunda, zehir ve biyolojik açıdan aktif diğer savunma kimyasalları bulundurduğunu ve eklem bacaklılar için modern tıpta keşfedilmemiş bir uyuşturucu kaynağı olarak gördüğünü rapor etmiştir.

Duffey (1980), Organizmalar yiyeceklerden aldığı temel kimyasal maddeleri çeşitli kimyasallardan ayırabileceğini bildirmiştir. Sekresyonun diğer bir şeklininse ölüm olabileceğini dile getirmiştir. Çünkü; alımın spesifik olmaması toksinlerin rahatça girmesine sebebiyet verdiğini ileri sürmüştür. Özellikle fitofajlar, yararlı olanları arasında zararlı kimyasallarında rahatça organizmalara girmesiyle mitrodatik uyarılmalara sebebiyet verdiğini ileri sürmüştür.

Otvos et al. (2000), Böceklerden izole edilen antimikrobiyal peptidleri farelerde çalışmıştır. Böceklerin bakteriyel enfeksiyonlara karşı dirençli olduğunu ve böcek antibakteriyel peptidlerine dayanan kurşun moleküllerinin dikkatli seçimi, bunların kullanım alanlarını genişletebilir ve antimikrobiyal bileşikler memeli tedavisinde uygulanabilir bir alternatif yol olduğunu rapor etmiştir.

Chernysh et al. (2002), Böceklerin antibakteriyel, antifungal peptidler ve polipeptidler dahil olmak üzere bağışıklığın neden olduğu molekülleri üretmek suretiyle mikrobiyal enfeksiyonları hızla temizleyebilir özellikte olduğunu belirtmişlerdir. Bu raporda; alloferon olarak adlandırılan bir grup biyoaktif, hafif karyonik peptidin iki varyantın izolasyonunu ve biyolojik özelliklerini sunmuşlardır. Farelerde yapılan in-vivo deneylerde alloferonun anti-viral ve anti-tümör özelliklere sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar bağışıklık düzenleyici özelliklere sahip olan bu peptidin terapötik kapasiteye sahip olabileceğini düşünmüşlerdir. Böceklerin, insan bağışıklığı için temel mekanizmaları modüle eden sitokin benzeri materyaller üretebileceği, anti-enfeksiyon, anti-tümöral, bio-farmasötiklerin kaynağına işaret ettiğini rapor etmişlerdir.

Slocinska et al. (2008), Böceklerin patojen enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattı olarak çok çeşitli protein ve peptid ürettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca bazı böcek peptidlerinin viral gen ve protein ekspresyonunu DNA'yı baskıladığını ve buna mukabil membran lizisine neden olduğu, apoptozu indüklediğini ve hücre döngüsünü durdurduğunu belirtmişlerdir. Böcek kaynaklı saflaştırılmış ve karakterize edilmiş peptidlerin birçoğu, insan immün yetmezlik virüsü (HIV), herpes simpleks virüsü (HSV) veya lösemi gibi ciddi hastalıklarının tedavisinde çok umut verici olduğunu rapor etmişlerdir.

Yiğit (2003), Örümcek zehirleri ve toksinlerin omurgasız ve omurgalı hayvanlarda nöronların sinaptik fonksiyonlarının ve iyon kanallarının çalışması için gerekli araçlar olarak düşünüldüğünü, örümcek zehirlerinde bulunan antimikrobiyal peptidler, antibiyotiklere karşı dirençli mikroorganizmaların doğal kaynaklı, yeni ve etkili antibiyotik üretiminde önemli modeller oluşturduğunu rapor etmiştir.

Bertram (2000), çalışmasında normal hücrelerin kademeli olarak maligniteye dönüştürülme sürecinin, genom hasarının bir sonucu olarak ortaya çıkan mutasyonların ardışık kazanılmasını gerektirdiğini, bu hasar, DNA çoğalması hataları, bazı DNA bazılarının asli kimyasal dengesizliği veya metabolizmada oluşan serbest radikallerin saldırısı gibi endojen süreçlerin bir sonucu olabileceği, DNA hasarı, iyonlaştırıcı radyasyon, UV radyasyonu ve kimyasal kanserojenler gibi eksojen maddelerle olan etkileşimlerden de kaynaklanabileceğini vurgulamıştır.

Hanahan and Weinberg (2011), çalışmalarında kanserin ayırıcı özellikleri, insan tümörlerinin çok adımlı gelişimi sırasında edinilen altı biyolojik özellikten oluştuğunu vurgulamışlardır. Bu özelliklerin altında yatan genetik istikrarsızlık, edinimlerini

hızlandıran genetik çeşitliliği ve birden çok özellik kazandıran iltihabı ortaya çıkardıklarını belirtmişlerdir.

Phan et al. (2000), Hücre adhezyon molekülü 1(CAM1), prostat kanseri için tümör baskılayıcı olarak önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Prostat, meme ve kolon karsinomasında C-CAM1'in azalmış ekspresyonu tespit edildiği, in-vivo şartlarda prostat ve göğüs kanseri hücre hatlarında C-CAM1 arasında tümör oluşum nedenlerinin baskılanmasının mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Bu gözlemlerin C-CAM1'in kanser tespiti veya teşhisi için işaretleyici olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir. Protein, nikel afinite kromatografisi kullanılarak 104 kat saflaştırmışlardır. Yaklaşık 0,4 mg saflaştırılmış C-CAM1, 200 mg enfekte olmuş hücrelerden elde etmişlerdir. Araştırmacılar bu protokolü kullanarak, monoklonal antikor üretimi ve biyokimyasal çalışma için uygun saflıkta bu proteinin yeterli miktarının üretilebileceğini rapor etmişlerdir.

Koç (2011), Bazı yenilebilen in-vivo böceklerin genotoksik ve oksidatif etki potansiyelinin incelenmesi başlıklı yüksek lisans tez çalışmasında test edilen konsantrasyonlar da böcek ekstrelerinin genotoksik etkilerinin bulunmadığını, ancak ekstreler, hem toplam antioksidan kapasitesi (TAK) hem de toplam oksidatif durum (TOD) seviyelerinde doza bağlı değişimlere yol açtığını kaydetmiştir.

Hansen (1987), Çalışmasında İskandinavya ve Danimarka'nın Hydrophilidae faunasını tespit ederek 118 olan tür sayımına 18 tür daha eklemiştir. Bunun yanı sıra türlerin karakteristik kısımları, biyolojileri ve yayılışları çalışmada detaylı bir şekilde incelenmiş, ilgili teşhis anahtarları verilmiştir.

Khan et al. (2015), *Galleria melonella* kullanılarak elde edilen böcek toksin proteini olan Bb70p'nin *Beauveria bassiana*'dan tanımlanması ve karakterizasyonunda kullanılmıştır. Bu çalışmada böcek zehirli bir protein olan Bb70p, amonyum sülfat çökeltmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyonu kullanılarak *Beauveria bassiana*'dan saflaştırmışlardır. Bb70p, anyon değiştiricileri için yüksek bir afiniteye sahip olduklarını ve 2D elektroforez sonuçları, 35,5kDa'luk bir molekül ağırlığına ve 4,5 bir izoelektrik

noktasına sahip tek bir nokta da ortaya çıkardığını, Bb70p 4 ile 60°C arasında, 4 ila 10 pH aralığında aktif kaldığını, ancak hafif asidik pH'da daha aktif olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca saf bir protein olan Bb70p'nin herhangi bir karbonhidrat yan zinciri olmadığını, proteinin 334,4 I/g vücut ağırlığı Ld50'si ile *Galleria mellonella*'ya hemoselik enjeksiyon yoluyla yüksek molariteye neden olmuş ve fenol oksidaz kademesini harekete geçirmiş olduğunu bildirmişlerdir. NCBI veritabanını kullanarak kısmi bir aminoasit sekansı karşılaştırılması ile entomopatojenik mantarların bilinen toksin proteinlerine homoloji göstermemiş. Böylece, Bb70p yenilik gösteren bir böcek toksin proteindir. Bu böcek toksik proteinin tanımlanması, *B. bassiana*'nın genetik bir manipülasyon yoluyla virülansını artırma potansiyelini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Dellis et al. (2019), Gelişmiş prostat kanserinin tedavi ortamı, mevcut olan şartların sürekli değiştiğini tedavi seçenekleri ve hastalığın moleküler özelliklerinin daha iyi anlaşılması, hastalığın seyri sırasında bu terapötik yaklaşımların daha erken uygulanması ile birlikte bu tedavilerin sıralanmasına ilişkin yüksek kalitedeki kanıtların eksikliği, ilerlemiş prostat kanserli hastaların optimal tedavisi ile ilgili sorunları yaratmıştır. Bu nedenle, mevcut klavuzların ve bu klavuzlara dahil edilmemiş olan son randomize çalışmaların sistematik olarak incelemesini yapmış ve ileri prostat kanserinin her bir aşamasında mevcut tedavi seçeneklerinin kapsamlı bir analizini ve ayrıca bu hastalar için destekleyici tedaviler olduğunu ileri sürmüşlerdir.

El-Schich et al. (2015), Holografik mikroskopi ile izlenen ölüme bağlı kanser hücrelerinde morfolojik değişikliklerin indüklenmesi çalışmasında; Kültür hücrelerinde önceden hücre ayrılmadan iki temsili hücre çizgisinin (L929 ve DU145) morfolojik analizi yapılmıştır. İki hücre çizgisi, anti-tümör ajanı etopositiyle 1-3 gün muamele edilmiş ve holografik mikroskopi ile yapılan ölçümler, muamele edilmemiş hücrelerle muamele edilmiş etoposid ile karşılaştırıldığında ortalama hücre sayısı, birleşme, hacim ve alanda önemli farklılık gösterdiğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca tedavi edilen hücre çizgilerinin hücre hacmi başlangıçta erken noktalarında artırılmış olup daha sonra hücreler özellikle yüksek dozda etoposid ile muamele edildiğinde hacimce azalmışlardır. Sonuç olarak, holografik mikroskopi ile tamamen invaziv olmayan morfolojik hücre büyümesi, canlılık ve ölüm ölçümleri yapmışlardır ve gelecekteki uygulamalar, klinik

olarak ilgili bileşiklere cevap olarak hücrelerde bu holografik mikroskopi parametrelerinin kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Chalouhy et al. (2019), Prostat kanserinde lenf nodu diseksiyonunun yararları ve zararları ile ilgili yapılan derlemede; Lenf nodu diseksiyonu çeşitli kanserler için standart tedavi protokolünün bir parçasıdır, ancak prostat kanserindeki rolü bir süredir tartışılabilir olduğunu ve pelvik lenfadenektominin, prostat kanseri hastalarına iyi yardımcı olabildiği, ancak hayatta kalabilmek için bir yararı olduğu kesin olarak kanıtlanmamış olduğunu ileri sürmüşlerdir. Pelvik lenfadenektomi biraz daha fazla oranda komplikasyonlara ve ameliyata yol açabileceğini ve bunların kullanımının yeterince lenf nodu tutulumu riski olan hastalar da makul bir şekilde uygulanması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

Wang et al. (2019), Bu çalışmada PGRP'lerin yapısı, sınıflandırılması ve işlevleri özetlenmiş ve PGRP'lerin böceklerin doğal bağışıklığındaki rolü tartışılmıştır. Böceklerde kazanılmış bir bağışıklık sistemi yoktur ve mikrobiyal enfeksiyonla savaşmak için yalnızca doğal bağışıklık sistemine güvenir. Böceklerin doğuştan doğuştan gelen bağışıklık sistemi esas olarak konakçının model tanıma reseptörü (PRR) arasındaki etkileşime bağlıdır. Peptidoglikan tanıma proteinleri (PGRP'ler) ailesi, böcekler için en önemli tanıma reseptörlerüdür (PRR). Patolojik mikroorganizmanın hücre duvarının ana bileşenini, peptidoglikan'ı tanıyabilir ve böceklerin bağışıklığında önemli bir rol oynadığını kaydetmişlerdir.

Harborne (1993), Ekoloji ve biyokimyasal gibi çeşitli disiplinler arasındaki ilişkinin başlangıçta merak uyandırıcı bir ittifak olduğunu ileri sürmüştür. Ekolojinin canlı organizmalar ile yaşadığı ortamda incelendiğini ve buna karşın biyomühendisliğin, molekül seviyesindeki etkileşimlerini deneysel olarak laboratuvar ortamında incelendiğini kaydetmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Malzemeler

Tripsin-EDTA, Tripan-blue, WST-1 canlılık ve yayılım maddesi, Penisilin streptomisin solüsyonu, FBS (fetal bovine serum), SDS, %10' luk TCA (Trikloroasetik asit), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media), %70'lik ve %95'lik etil alkol, metanol, DMSO (Dimetil sülfoksit), PBS, (Phosphate buffer saline), antibodyler (GABDH, Caspase-3 ve CYT-c), sample buffer, running buffer, transfer buffer, marker, %12'lik jel, RIPA lizis buffer, Nitroselüloz membran, kurutma kağıdı, yağsız süt tozu, sekonder antibody, ECL, peroksit solüsyonu, TBS, Tween20, Ac./Bis, %10 APS, TEMED, Tris-Cl, NaCl, KCl.

Thoma lamı, 25 cm ve 75 cm'lik flasklar, çeşitli ebatlarda serolojik pipetler, 96-kuyucuklu plateler, 15 ml santrüfuj tüpleri, 50 ml santrüfuj tüpleri, çeşitli ebatlarda edendorf tüpleri, çeşitli ebatlarda otomatik pipetler, Homojenizatör (Hücre parçalama tüpü).

Kullanılan malzemeler ise Mikrobiyolojik emniyet kabini, Isıtmalı su banyosu, Otomatik pipetler, Derin dondurucu, Havan, Vorteks, Sonikatör, Hassas terazi, Buzdolabı (+4°C), Otoklav, Saf su cihazı, Etüv %5 CO₂ inkübatörü, dikey ve yatay elektroforez, Jel görüntüleme, trans blot şeklinde yapılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

3.2.1.1. DPPH Aktivitesinin Belirlenmesi

1 mg/ml konsantrasyonda hazırladığımız böcek protein ekstraktının (0,3 ml) içerisine, litrede 6×10^{-5} mol olacak şekilde hazırlanan DPPH radikali içeren 2,7 ml metanolik solusyon karıştırıldı. Bu karışım güçlü bir şekilde karıştırılarak 60 dakika karanlık bölgede bekletildi. DPPH radikalinin etkinliğinin giderilmesi 517 nm'de spektrofotometre'de absorpsiyonunun ölçülmesi ile belirlendi. Bu radikalın etkinliğinin giderilmesi çalışmaları çeşitli araştırmacıların ortaya koydukları metodu takiben yapıldı (Hatano et al. 1988).

3.2.1.2. Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi

Metal şelatlama aktivitesine demir şelatlama özelliği üzerinden bakıldı. Dinis, Madeira ve Almeidam (1994) metoduna göre yapıldı. ,bu metoda göre özellik belirlenmesi kısaca; her bir 0,5 ml ekstrakt'a 1,6 ml deiyonize su ve 0,05 ml 2 mM $FeCl_2$ 'den eklenerek başlandı. 30 saniye sonrasında 5 mM Ferrozine'den 0,1 ml eklendi. Ferrozine iki değerlikli demir ile rekasiyona girdiğinde suda çok iyi çözünür hale geldi. Bunu takiben 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi karışımın Fe^{+2} Ferrozine kompleksinin absorbansı 562 nm.'de ölçüldü. Böylelikle ekstraktın demiri şelatlama aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Yu, et al. 2004).

$$\text{Şelatlama Oranı} = (A_0 - A_1) / A_0 \times \% 100;$$

Burada A_0 kontrol ya da körün absorbansı, A_1 ise ekstraktın varlığında ölçülen absorbans değeridir.

3.2.2. Anti Kanser Aktivitesinin Belirlenmesi

3.2.2.1. Hücreler

PC3 hücre hattı Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü Öğretim Üyesi Dr. Bülent KAYA'nın stoğundan -80°C den temin edildi.

3.2.2.2. Medyum Hazırlama

500 ml DMEM, 50 ml Fetal Bovine Serum, 5 ml, penicilin-streptomisin medium kabında karıştırıldı. İhtiyaç oldukça aynı oranda gereken maddeler karıştırıldı ve bu medium hazırlandı.

3.2.2.3. Hücre Kültürü

-80°C de muhafaza edilen PC3 hücreleri DMEM büyüme medyumunda, %5 CO₂ etüvde 37°C 'de 2 veya 3 günde bir pasajlanarak çoğaltıldı.

3.2.2.3. WST-1 Tuzu ile Hücre Canlılığı Analizi

96 kuyucuklu plate alınarak ters mikroskopta incelendi ve bu hücrelerin yeterince çoğaldığından emin olunduktan sonra her bir kuyucuğa böcek protein ekstraktlarından 5-100 µg/ml konsantrasyonlarında her kuyucuğa eklendi ve 48 saat inkübe edildi. Kontrol olarak sadece medium hücrelere uygulandı. 48 saat sonunda her bir kuyucuğa 15 µl WST-1 maddesi eklendi. Hücreler %5 CO₂ li inkübatörde 37°C 4 saat inkübe edildi. 4 saat inkübasyondan sonra 96 gözlü plate ELISA reader cihazına yerleştirildi ve her bir kuyucuğun 450-630 nm deki absorbans değerleri alındı ve kaydedildi. WST-1 toksisite testinde yaşayan hücreler sarı renk oluşturdu ve ölü hücrelerde renk oluşumu spektrofotometrik olarak 450 nm'de ve boyanın WST-1 varlığı 630 nm'de negatif girişim olarak belirlenerek absorbans değerleri olarak grafiğe geçirildi.

3.2.3. Protein Özütünün Hazırlanması

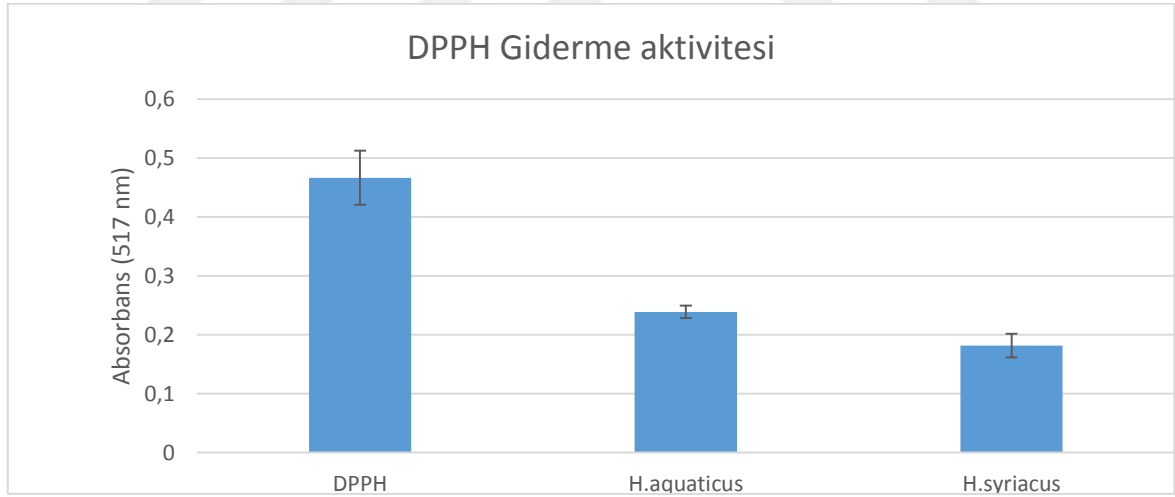
-80°C'de muhafaza edilen *Helophorus syriacus* ve *Helophorus aquaticus* böcek türleri alınarak 2 gr tartıldı ve havana alınarak iyice ezildi daha sonra falkonlara alınarak üzerine 4 ml %10'luk TCA eklenerek homojenizatör de iyice parçalandı. Akabinde üzerine 1 ml daha %10'luk TCA eklenerek 50 dk 4,000 RPM'de soğutmalı santrifüj de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı çekilerek atıldı ve pellet kısmı 3'er tekrarlar 10 dk boyunca 3,500 RPM'de dönerek 5 ml %95'lik etil alkolle yıkandı ve kuruması için 37°C'de etüvde bekletildi. Kuruyan numune havanda iyice ezildi ve üzerine 2 ml saf su konuldu 15 dk 37°C'de etüvde inkübe edildi ve 15 dk 4,500 RPM'de santrifüj edildi. 100µl'si bradford için kullanıldı. Kalanının üzerine 2 ml %95'lik etil alkol eklendi ve 1 gece 37°C'de bekletildi. Ertesi gün santrifüj de 1 saat 4,500 RPM'de santrifüjlendi ve alkolün tamamen uzaklaşması ve protein özütlerinin kuruması için 37°C'de bekletildi. Alkolü uzaklaştırılan çökelti daha sonra ince bir spatül yardımıyla tüp içerisinde dövülerek toz haline getirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Antioksidan Test Sonuçları

4.1.1. DPPH Giderme Aktivitesinin Belirlenmesi

Ticari olarak elde edilebilen DPPH stabil organik nitrojen radikalidir. Doğal ekstraktların antioksidan kapasitesini ölçmede kullanılan bir metottur. Temel olarak antioksidan tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu 517 nm’de absorbansın azalmasına sebep olur. Bu metot görünür alanda spektrofotometre ile absorbans sabitlenene kadar takip edilmesine dayanmaktadır (Okan vd. 2013).



Şekil 1. DPPH giderme aktivitesi

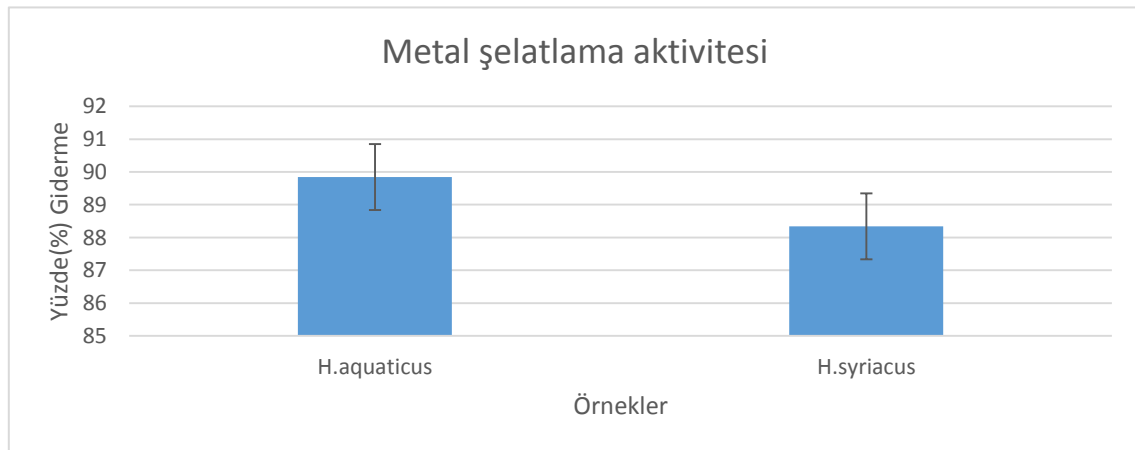
DPPH giderme aktivitesi baktığımızda DPPH’ın absorbans değerine göre türlerimizi karşılaştırdığımızda *H. syriacus* türünde %62’ye yakın bulunmuş *H. aquaticus*’da ise %48 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç bize türlerin protein ekstraktlarının antioksidan giderme kapasitesinde olduğunu göstermiştir.

4.1.2. Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi

Metal şelatlama aktivitesine demir şelatlama özelliği üzerinden bakıldı. Dinis, Madeira ve Almeida (1994) metoduna göre yapıldı. ,bu metoda göre özellik belirlenmesi kısaca; her bir 0,5 ml ekstrakt'a 1,6 ml deiyonize su ve 0,05 ml 2 mM FeCl₂'den eklenerek başlandı. 30 saniye sonrasında 5 mM Ferrozine'den 0,1 ml eklendi. Ferrozine iki değerlikli demir ile rekasyona girdiğinde suda çok iyi çözünür hale geldi. (Kimyasal olarak tepkime verdiği için dolayı küçük patlamalar il reaksiyon verdi) Bunu takiben 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi karışımın Fe⁺² Ferrozine kompleksinin absorbansı 562 nm.'de ölçüldü. Böylelikle ekstraktın demiri şelatlama aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Şelatlama Oranı} = (A_0 - A_1) / A_0 \times \% 100;$$

Burada A_0 kontrol ya da körün absorbansı, A_1 ise ekstraktın varlığında ölçülen absorbans değeridir.



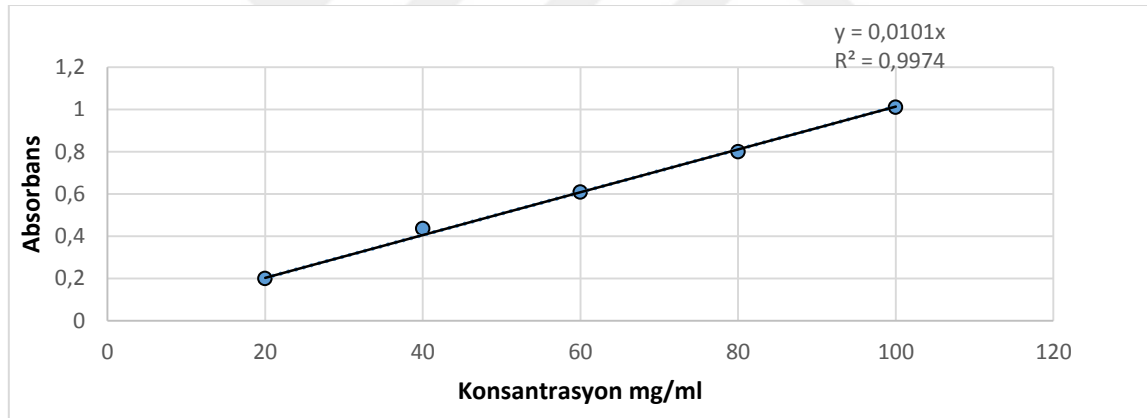
Şekil 2. Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama aktivitesine göre değerlendirme yaptığımızda ise *H. aquaticus* türünde metal şelatlama aktivitesi %90'a yakın olarak ortamdaki metal iyonunu giderdiğini *H. syriacus*'un %89 yakın bir metal giderimi yaptığı gözlenmiştir. Burada standart olarak EDTA şelatlayıcı olarak kullanılmıştır.

4.2. Antikanser Test Sonuçları

4.2.1. Bradford Yöntemi İle Total Protein Tayini

Bu yöntem (5-100 μ l); organik boyaların, proteinlerin bazik ve asidik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmaya dayanır. Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik aminoasitlere ve bazı aromatik aminoasitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Bu yöntemde ele alınan temel olgu, boya normal şartlarda 465 nm'de maksimum absorbanı verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanı vermesidir. Sığır serum alümin (BSA) çözeltisi belirli konsantrasyonlar da hazırlanarak, standart çözeltiler hazırlandı. Standart çözeltilerin tümü spektrofotometrede okutuldu ve absorbanı değerleri elde edildi. Bu değerlere göre standart eğri çizildi.

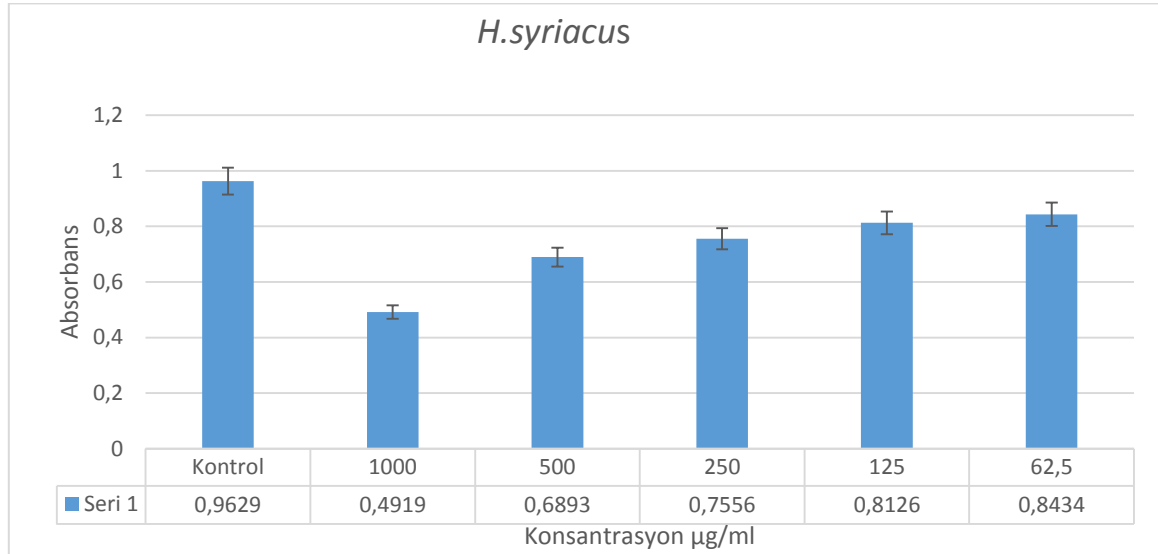


Şekil 3. Bradford protein tayini için standart kalibrasyon grafiği

Daha önce hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiş böcek örnekleri, spektrofotometrede absorbanları ölçüldü. Örneklerin protein miktarları, okunan absorbanların bu regresyon denkleminde yerine konulmasıyla hesaplandı.

Helophorus syriacus 595 nm'de okunan absorbanı değeri 0,3478 nm'dir. Absorbansın regresyon denkleminde yerine konulmasıyla total protein miktarı 34,78 mg/Ml dir.

H. aquaticus'ta en yüksek inhibisyon 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'de görülmüştür. Bunu takiben sırası ile 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında inhibisyon görülmüştür.



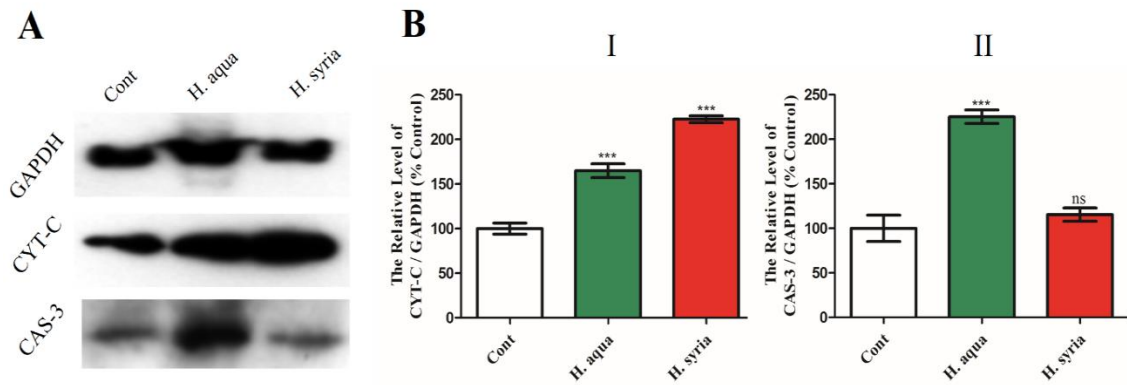
Şekil 5. *H. syriacus* türüne ait farklı konsantrasyonların hücre inhibisyonu üzerine etkisini gösteren WST-1 Canlılık testi analizi

H. syriacus'da en yüksek inhibisyon 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunun da görülmüştür. Bu konsantrasyonu takiben sırasıyla 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$ ve 62,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında inhibisyon görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda tüm çalışmalar karşılaştırıldığında en etkin konsantrasyon olarak 1000 $\mu\text{g/ml}$ belirlenmiştir.

4.2.3. Western Blot Tekniği ile Hedef Proteinlerin Analizi

PC-3 hücreleri 75 cm^2 'lik flasklarda 3-4 $\times 10^6$ olacak kadar yetiştirilerek böcekten elde edilmiş protein ekstraktları 1 mg/ml konsantrasyonda muamele edildikten sonra PBS ile yıkayıp santrifüj edilerek protein izolasyonuna hazır hale getirildi. Yaklaşık olarak 3-4 $\times 10^6$ hücre 1:5 (w/v) oranında protein izolasyon kiti yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Proteinlerin proteaz aktivitesi ile bozulmalarını engellemek amacıyla homojenizasyon işlemleri esnasında hem proteaz inhibitör kokteyli (PIC) ve PMSF kullanılıp hem de tüm işlemler buz içerisinde yapıldı. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4°C'de 20 dk süreyle 14000 RPM'de santrifüj edilerek ve elde edilen süpernatantlar mikrosantrifüj tüplere alınarak Bradford yöntemi kullanılarak her bir örnek içerisindeki protein miktarları tayin edildi. Daha sonra western blot deneyleri yapılncaya kadar -80

°C’de saklandı. Hücre kültürüne ait protein lizatları SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) tekniği ile %12 konsantrasyondaki jelde yürüterek, devamında kaspaz 3, sitokrom C ve housekeeping olarak GAPDH için Western blot tekniği kullanılarak PVDF membrana aktarıldı ve %5’lik BSA ile 1 saat süresince blotlama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında membranda sabitlenen proteinlere ait bantlar uygun primer antikolar aracılığıyla 3 saat süresince inkübe edilip 5x5 dk olacak şekilde TBS-T (Tris Buffer Saline-Tween20 %0,1) ile yıkama gerçekleştirildi ve primere uygun sekonder ile 1,5 saat inkübe edilip 5x5 dk TBS-T ile yıkama gerçekleştirildi. Daha sonra membran ECL tamponu ile yaklaşık 3-4 dk inkübe edilip membrandaki ışımaya sayesinde medikal X-Ray görüntü sabitleme cihazında protein bantları X-Ray filmlere sabitlendi. Daha sonra bu bantların komputere yazılım programı aracılığıyla sentezlenme miktarları hesaplandı (Image Lab, Bio Rad). Hesaplama kullanılan yöntem, hedef genlerin housekeeping gen olan GAPDH ile normalize edilmesi ve kontrole göre yüzde değişimi olacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 6. Western Blot tekniği ile protein analizi A. Proteinlerin Jel üzerindeki fotoğrafları B. Protein Oranlarının Çizelgeleri

Western Blot tekniği ile protein ürünlerinin analizi gerçekleştirildi. Bu çalışmada kontrol grubuna göre *H. aquaticus* ve *H. syriacus*'da protein miktarları karşılaştırıldı.

Housekeeping protein olarak GAPDH kullanıldı. Ve bu proteine oranla hücre inhibisyonu ve hücre ölümü sağlayan CYT-C ve CAS-3 oranları ile değerlendirildi.

Apoptoz geçiren hücrelerde, serbest bırakılmış sitokrom-c ardından mitokondriyal dış zar geçirgenleşmesinde (MOMP) ni ile teşvik edilen kaspaz aktivasyonunu takip eder.

Kaspazlar apoptotik fenotipe aracılık etmesine rağmen, kaspaz inhibisyonu MOMP sonrası hayatta kalmak için genellikle yeterli değildir; bunun yerine hücreler "kaspazdan bağımsız bir hücre ölümü" (CICD) geçirir. Dolayısıyla, MOMP hücre ölümüne bağlılık noktasını temsil edebilir. Burada CYT-C'nin miktarının artması ve mitokondriden sızması hücrenin apoptoz yoluna girmesine neden olmaktadır (Colell, Ricci et al. 2007).

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) kritik araçlarıdır. Bunlar arasında, kaspaz-3, birçok önemli hücre proteinin spesifik bölünmesini katalize eden, sıklıkla aktive olan bir ölüm proteazıdır. Bununla birlikte, apoptozdaki bu (veya başka herhangi bir) kaspazın spesifik gereklilikleri bugüne kadar büyük ölçüde bilinmemektedir. Kaspaz-3 aktivasyonuna giden yollar, mitokondriyal sitokrom-c salımına ve kaspaz-9 fonksiyonuna bağlı veya bunlardan bağımsız olarak tanımlanmıştır. Kaspaz-3 normal beyin gelişimi için gereklidir ve dikkate değer bir doku, hücre tipi veya ölüm uyarıcısına özgü bir şekilde diğer apoptotik senaryolarda önemlidir. Kaspaz-3 ayrıca bazı tipik apoptoz belirteçleri için de gereklidir ve incelenen tüm hücre tiplerinde apoptotik kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu için vazgeçilmezdir. Bu nedenle kaspaz-3, hücrenin sökülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile bağlantılı bazı işlemler için şarttır (Porter and Jänicke 1999).

Grafikten anlaşılacağı üzere *H. aquaticus*'da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CYT-C'nin GAPDH'e oranı kontrole göre yüksektir. Bu yükseklik kontrol grubuna (yani böcek proteini eklenmemiş aynı şartlar altında aynı zamanda çoğaltılmış hücreler) kıyasla bakıldığında CYT-C'nin yüksek miktarda salındığını göstermektedir. Bu durum apoptoz'un ve mitokondri dış zarlarının geçirgenliğinin artması ile kaspaz'ların oluşumunu indüklemektedir. Aynı zamanda kaspaz'ların GAPDH oranına bakıldığında aynı şekilde kontrol grubuna göre yüksek çıkmaktadır. Bu yükseklik kaspaz-3'ün miktarının kontrol grubuna göre fazla olduğunu göstermektedir. Bu fazlalık hücrenin hücre ölümüne götürecek öncül kaspaz-3 aktivitesinin yüksek miktarını ve varlığını göstermekte böylelikle *H. aquaticus* proteinlerinin hücre ölümüne hücreyi yönlendirdiğini göstermektedir.

H. syriacus'da ise yine aynı şekilde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CYT-C'nin GAPDH'e oranı kontrolün CYT-C'nin GAPDH oranına göre yaklaşık olarak 2,25 katı kadar yüksektir. Bu yükseklik kontrol grubuna (yani böcek proteini eklenmemiş aynı şartlar altında aynı zamanda çoğaltılmış hücreler) kıyasla CYT-C'nin *H. aquaticus*'dan daha yüksek miktarda salındığını ve daha etkin olduğunu göstermektedir. Ancak kaspaz-3 açısından değerlendirildiğinde *H. aquaticus*'a göre Kaspaz-3 miktarı daha düşük kaldığını farklı bir yolağın hücre ölümünü desteklemiş olacağını hücre canlılık testi ile karşılaştırıldığında açıklamaktadır. Ancak proje çevresinde farklı yollarla ilgili çalışma planlanmadığından, bunun kesin kanıtları için DNA fragmentasyonu real time pcr gibi yöntemler ile desteklenmesi gerekmektedir. Ancak bu çalışmanın bütçesi ve kapsamı bunu kapsamamaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu sonuçlar göstermektedir ki; çalışılan her iki türe ait veriler değerlendirildiğinde PC-3 kanser hücre hattında hücre ölümünün kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede gerçekleştiğini WST-1 hücre canlılık testi ile ve CYT-c ve Kaspaz-3 aktivitelerine bakarak protein düzeyinde de gözlemlenmiş bulunmaktadır. Bu çalışma bir yüksek lisans tez çalışması olduğundan dolayı proje çerçevesi içinde gerekli çalışmalar tamamlanmıştır. Hücre ölümü belirlemek için gerekli olan ek çalışmalar için gerekli olan bütçe eksikliği ve süre kısıtlaması ile birlikte konunun genişliği açısından değerlendirildiğinde çalışmanın devamı doktora olarak planlanmış olmasıyla hücre ölümünün hangi mekanizma ile gerçekleştiği, daha farklı antikolar kullanılarak hangi proteinin daha aktif olduğu ve proteinlerin gen seviyeleri belirlenmesi ve hangi yolakların etkin olduğu bulunabilir.

KAYNAKLAR

Angus RB (1992) Süßwasserfauna von Mitteleuropa (Insecta: Coleoptera: Hydrophilidae: Helophorinae), Gustav Fischer Verlag, Jena p. 144

Baykara O (2016) Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi 5(3): 154-155

Berenbaum MR (1993) Sequestered plant toxins and insect palatability. The Food Insects Newsletter 6(3): 6-9

Bertram JS (2000) The molecular biology of cancer, Molecular Aspects of Medicine, 21: 167-223

Beutel RG, Haas F (2000) Phylogenetic Relationships of the Suborders of Coleoptera, (Insecta), Cladistics 16: 103-141

Blum MS (1994) The limits of entomophagy: a discretionary gourmand in a world of toxic insects. The Food Insects Newsletter 7(1): 6-11

Chalouhy CMD, Gurram SMD, Ghavamian RMD (2019) Current controversies on the role of lymphadenectomy for prostate cancer, Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 37(3): 219-226

Charbonnier S, Gallego O, Gavin AC (2008) The social network of a cell: recent advances in interactome mapping. Biotechnol Ann. Rev. 14: 1-28

Chernysh S, Kim SI, Bekkers G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, Platonov VG, and Bulet P (2002) Antiviral and antitumor peptides from insects, PNAS 99(20): 12628-12632

Chien CH, Chuang, CK, Liu, KL, Wu CT, Pang ST, Chang YH,(2018) Positive and negative affect and prostate cancer-specific anxiety in Taiwanese patients and their partners. European Journal of Oncology Nursing 37: 1-11

Chistiakov DA, Myasoedova VA, Grechko AV, Melnichenko AA, Orekhov AN (2018) New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer. Seminars in Cancer Biology 52: 9-16

Colell A, Ricci J-E, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW, Mari B, Barbry P, Newmeyer DD, Beere HM and

Green DR (2007) GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome-c Release in the Absence of Caspase Activation. *Cell* 129(5): 983-997

Costa-Neto EM (2002) The use of insects folk medicine in the State of Bahai, Northeastern Brazil, with notes on insects reported elsewhere in Brazilian folk medicine. *Human Ecology* 30(2): 254-263

Darıılmaz M (2010) İç Batı Anadolu Sucul Coleoptera Faunasının Araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s. 5-9

Das R, Feng FY, Selth LA (2019) Long non-coding RNAs in prostate cancer: Biological and clinical implications, *Molecular and Cellular Endocrinology* 480: 142-152

Defoliart GR (1995) Edible insects as minilivestock. *Biodivers. Conserv.* 4: 306-321

Dellis A, Zagouri F, Lontos M, Mitropoulos D, Bamias A, Papatsoris AG, Genito-Urinary H (2019) Cancer Group (HCUCG), Management of advanced prostate cancer: A systematic review of existing guidelines and recommendations, *Cancer Treatment Reviews* 73: 54-61

Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM (1994) Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radicals scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315: 161-169

Dong L, Zieren R, Xue W, Reijke TM, Pienta KJ (2019) Metastatic prostate cancer remains incurable, why? *Asian Journal of Urology* 6: 26-28

Doucet CM, Hetzer MW (2010) Nuclear pore biogenesis into an intact nuclear envelope. *Chromosoma* 119: 469-477

Duffey SS (1980) Sequestration of plant natural products by insects. *Annual Review of Entomology* 25: 447-477

El-Schich Z, Mölder A, Tassidis H, Härkönen P, Miniotis MF, Wingren AG (2015) Induction of morphological changes in death-induced cancer cells monitored by holographic microscopy, *Journal of Structural Biology* 189: 207-212

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell* 144(5): 646-674

Hansen M (1987) The Hydrophilidae (Coleoptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Ent. Scand.* 18: 1-253

Harborne JB (1993) *Introduction to Ecological Biochemistry* 4th edition. Academic Press, London, pp. 36-70

Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T (1988) 2 new flavonoids and other constituents in licorice root-their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmacological Bulletin* 36: 2090–2097

Inje OF, Olufunmilaya AH, Audu JA, Ndaman SA, Chidi EE (2018) Protein quality of four indigenous edible insect species in Nigeria. *Food Science and Human Wellness* 7: 175-183

İncekara Ü, Türkez H, Memiş E, Güner A, Vafaei-Shoushtari R (2008) The genetic and oxidative effects of *Callimenus latipes* Stal (Tettigoniidae: Bradyporinae) extracts on human whole blood cultures. *Journal of Entomological Research* 2(1): 1-5

Jäch MA (1998) Annotated checklist of aquatic riparian/littoral beetle families of the World (Coleoptera), *Water Beetles of China* 11: 25-42

Jonas-Levi A, Martinez JJI (2017) The high level of protein content reported in insects for food and feed is overestimated, *Journal of Food Composition and Analysis* 62: 184-188

Khan S, Nadir S, Lihua G, Xu J, Holmes KA, Dewen Q (2015) Identification and characterization of an insect toxin protein, Bb70p, from the entomopathogenic fungus, *Journal of Invertebrate Pathology* Volume 133, January PP. 87-94

Koç K (2011) Bazı Yenilebilen Böceklerin In vitro Genotoksik ve Oksidatif Etki Potansiyellerini İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, s. 1-7

McKenzie EA, Abbott WM (2018) Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells, *Methods* 147: 40-49

Nettleship JE, Assenberg R, Diprase M, Rahman-Huq N, Owens RJ (2010) *Journal of Structural Biology* 172: 55-65

Okan TO, Varlıbaş H, Öz M, Deniz İ (2013) Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler. *Kastamonu Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi* 13(1): 48-59

Otvos LJR, Bokonyi K, Varga I, Otvos BI, Hoffmann R, Ertl HCJ, Wade JD, Mcmanus AM, Craik DJ, Bulet P (2000) Insect peptides with improved protease-resistance protect mice against bacterial infection, *Protein Science* 9: 742–749

Paoletti MG (2005) Ecological implications of minilivestock. *Science Pub, Enfield NH, USA*, pp. 481-490

Pemberton RW (1999) Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 65: 207-216

Phan D, Han E, Birrell G, Bonnal S, Duggan L, Esumi N, Gutstein H, Li R Lopato S, Manogaran A, Pollak ES, Ray A, Reddi PP, Reichert AS, Struffi P, Tiscornia G,

Ximenez-Fyvie LA, Zhang H, Lin SH (2000) Adhesion Molecule 1 (C-CAM1) Expressed in Insect Cells. *Protein expression and purification* 21(2): 343-351

Porter AG, Jänicke RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death And Differentiation* 6: 99-104

Riccio A (2010) Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways. *Nat. Neurosci* 13: 1330-1337

Slocinska M, Pawel M and Rosinski G (2008) Insects Antiviral and Anticancer Peptides; New Leads for the Future? *Protein pept Lett.* 15(6): 578-585

Stuible M, Burlacu A, Perret S, Brochu D, Paul-Roc B, Baardsnes J, Loignon M, Grazzini E, Durocher Y (2018) Optimization of a high-cell-density polyethylenimine transfection method for rapid protein production in CHO-EBNA1 cells, *Journal of Biotechnology* 281: 39-47

Türkez H, İncekara Ü, Erman O (2010) Biomonitoring of the genotoxic potentials of two edible insects species in vitro. *Turkish Journal of Entomology* 34(4): 411-417

Wang Q, Ren M, Liu X, Xia H, Chen K (2019) Peptidoglycan recognition proteins in insect immunity, *Molecular Immunology* 106: 69-76

Yılmaz A (2011) Isparta İli Helophoridae, Hydrophilidae (Coleoptera) Türlerinin Faunistik ve Sistematik Yönden İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, s. 1-7

Yiğit F (2003) Örümcek zehirlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 1(3): 1-9

Yin J, Ren W, Huang X, Li T, Yin Y (2018) Protein restriction and cancer. *BBA-Reviews on Cancer* 1869: 256-262

Yu W, Zhao Y, Shu B (2004) The radical scavenging activities of radix puerariae isoflavonoids: A chemiluminescence study. *Food Chemistry* 86: 525–529

Zielińska E, Karaś M, Baraniak B (2018) Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof, *LWT-Food Science and Technology* 91: 168-174

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Bingöl’de doğdu. İlkokulu ve ortaokulu 75.yıl ilköğretim okulu ve liseyi Rekabet Kurumu Lisesi’nde tamamladı. 2010 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2015 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2013 yılında Bingöl Kredi Yurtlar Kurumu Kız Öğrenci Yurdunda Özel Güvenlik Görevlisi olarak göreve başladı ve halen çalışmaktadır. Evlidir.