



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

***PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*'UN YUMURTA JELİNİN
FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU VE MELANOM
KANSERİ İÇİN BİYOLOJİK ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Behlül KOÇ BİLİCAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2023

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 192362401 numaralı Doktora öğrencisi Behlül KOÇ BİLİCAN tarafından hazırlanan “**PELOPHYLAX RIDIBUNDUS’UN YUMURTA JELİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU VE MELANOM KANSERİ İÇİN BİYOLOJİK ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. Ebru TOKSOY ÖNER

Marmara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. Serkan GÜL

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 08/06/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali HİNİS
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduđum bu çalıřmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dűşecek bir yol ve yardıma bařvurmaksızın yazdıđımı, yararlandıđım eserlerin kaynakçada gűsterilenlerden olduđuunu, çalıřmamda kullandıđım verilerin orijinalliđini ve her tűrlű intihalden uzak olduđuunu beyan ederim.

Enstitű tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tűm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Behlűl KOÇ BİLİCAN

TEŞEKKÜR

Doktora sürecimde benden yardım ve bilgi birikimini esirgemeyen, akademik tecrübelerinden ve fikirlerinden faydalandığım, her zaman bana göstermiş olduğu anlayış, manevi destek, hoşgörü, sabır ve yardımları için, Doktora Bitirme Tezimin yürütülmesine danışmanlık eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitemde yer alan tecrübesiyle beni yönlendiren ve laboratuvarının imkânlarını sonuna kadar açan değerli hocam Prof. Dr. Ebru TOKSOY'a çok teşekkür ederim. Tez İzleme Komitemin bir diğer üyesi değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN'a yardımlarını ve manevi desteğini esirgemediği için çok teşekkür ederim.

Tez Savunma Jürimde yer alan ve desteğini her zaman hissetmiş olduğum değerli hocam Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK'a çok teşekkür ederim. Tez Savunma Jürimin bir diğer üyesi değerli hocam Prof. Dr. Serkan GÜL'e özellikle arazi çalışmalarında ve tez çalışmamın temeli olan kurbağa yumurtalarının temininde göstermiş olduğu desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Doktora tezimin hücre kültürü çalışmalarında yardımlarından dolayı Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Merve ERGİNER HASKÖYLÜ'ye ve Selay TORNACI'ya teşekkür ederim.

Birbirimizden desteğimizi, bilgilerimizi ve yardımlarımızı esirgemediğimiz arkadaşım Arş. Gör. Bahar AKYÜZ YILMAZ'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda bana güvenen, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, büyük sabır gösteren ve bugünlere gelmemi sağlayan annem, babam ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Sadece doktora sürecimde değil hayatımın her anında desteğini ve motivasyonunu esirgemeyen, her tökezlediğimde dayanağım olan, ne zaman çıkmaza düşsem yoluma ışık olan, sabır ve anlayışıyla daima yanımda olduğunu hissettiren, başarımın ortağı sevgili eşim Doç. Dr. İsmail BİLİCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimi, aynı bedende son günlerimizi yaşadığımız canım kızım Amine Mahru'ya atfediyorum.

2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine teşekkür ederim.

Behlül KOÇ BİLİCAN
AKSARAY, 2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Amfibi	5
2.1.1 <i>Pelophylax ridibundus</i>	8
2.2 Amfibi Yumurta Jelleri	9
2.3 Biyomalzemelerin Kanseri Uygulamaları	13
2.4 Melanom Kanseri	17
3. MALZEME VE YÖNTEM	20
3.1 <i>P. ridibundus</i> Yumurtalarının Toplanması ve Hazırlanması.....	20
3.2 Fizikokimyasal Karakterizasyon	21
3.2.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR)	21
3.2.2 Termogravimetrik analiz (TGA).....	21
3.2.3 Taramalı elektron mikroskopu (SEM).....	22
3.2.4 Enerji dağılım spektrometresi (EDX).....	22
3.2.5 X-ışını kırınım difraksiyonu (XRD)	22
3.2.6 Elementel analiz.....	23
3.3 Karbohidrat Konsantrasyonunun ve Profilinin Belirlenmesi	23
3.3.1 Dubois yöntemi ile konsantrasyonun belirlenmesi.....	23
3.3.2 HPLC analizi ile karbohidrat profilinin belirlenmesi	23
3.4 Protein ve Amino Asit Profilinin Belirlenmesi	24
3.4.1 Kjeldahl yöntemi ile ham protein belirlenmesi	24
3.4.2 LC-MS/MS için kurbağa jeli örneklerinin hazırlanması	24
3.4.3 Kurbağa jeli örneklerinin tca-aseton çöktürme yöntemi ile temizlenmesi.....	25
3.4.4 Kurbağa jeli proteininin konsantrasyon ölçümü.....	25
3.4.5 SDS-PAGE protein jel elektroforezi	25
3.4.6 Kurbağa jeli protein numunelerinin kütle spektrometre analizine hazırlanması.....	26
3.4.7 LC-parametreleri.....	26
3.4.8 Peptid ve protein tanımlama	28
3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları	28
3.5.1 MTT yöntemi.....	28
3.5.2 xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile hücre proliferasyonun belirlenmesi	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	30
4.1 FT-IR	30
4.2 TGA.....	31
4.3 SEM.....	32
4.4 XRD.....	35
4.5 Elementel Analiz ve EDX	36

4.6 Karbohidrat Miktar Tayini ve Profili	37
4.7 Protein Miktar Tayini ve Profili	39
4.8 Hücre Kültürü.....	50
4.8.1 MTT analiz sonuçları.....	50
4.8.2 xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları	52
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ.....	69



DOKTORA TEZİ

PELOPHYLAX RIDIBUNDUS'UN YUMURTA JELİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU VE MELANOM KANSERİ İÇİN BİYOLOJİK ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Behlül KOÇ BİLİCAN

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA

ÖZET

Bu tez çalışmasında test organizma olarak seçilen, Ranidae familyasına ait bir amfibi türü olan *Pelophylax ridibundus*'un (*P. ridibundus*) embriyolarının beslenmesi, gelişmesi ve parazitlerden korunması için salgıladıkları jel yapısı ilk kez detaylı bir şekilde karakterize edilmiş ve literatüre kazandırılmıştır. Kozmopolit ve kolay kültüre edilebilir olması nedeniyle seçilen *P. ridibundus*'un yumurta jel yapısının fizikokimyasal analizleri (FT-IR, TGA, XRD ve elemental analiz), yapının tamamen karbohidrat ve protein yapıda olduğunu ortaya koymuştur. 96 µg/mL karbohidrat içerdiği tespit edilen yumurta jelinin, yapılan HPLC analizi ile profilinde Glikoz, Galaktoz, Mannoz ve Ksiloz varlığı tespit edilmiştir. LC-MS/MS analizi ile yapıda tespit edilen 2,4 µg/µL proteinin ise profili Uniprot/Swissprot veritabanı verilerine göre belirlenmiştir. Tespit edilen 12 proteinden sialik asit bağlı lektin proteini, tümör hücrelerine yönelik bir makrofaj sistemi yoluyla tümör büyümesini inhibe edebilme özelliği sayesinde dikkat çekmektedir.

Kirli sucul ortam şartlarında amfibi embriyosunu koruyan, büyümesine ve gelişmesine olanak sağlayarak güçlü bir bariyer görevi gören yumurta jel yapısının, doğada bu zorlu ortam şartlarında özellikle UV ışınlarından embriyoyu koruması fonksiyonlarından esinlenerek, deri üzerine olumlu etkilerinin olabileceği ilk kez bu tez çalışmasında hipotez edilmiştir. Yüksek metastatik indeksi ile en agresif cilt kanseri olan melanom üzerine yaptığımız çalışmalarda amfibi yumurta jelinin bir biyomalzeme olarak güçlü biyolojik aktiviteye sahip olabileceği bu tez çalışması kapsamında ön görülmüştür. MTT analizi ve eş zamanlı ölçüm imkanı sunan xCELLigence cihazı ile yapılan hücre çalışmaları ile *P. ridibundus* yumurta jelinin 5 mg/mL selektif dozunun melanoma kanser hücrelerine (A375) antikanser bir etki gösterirken (canlılık < %30), sağlıklı insan deri hücrelerine sitotoksikite göstermediği (canlılık > %70) belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında ilk kez doğadan gelen bir mucize olan amfibi yumurta jelinin melanom hücreleri üzerinde etkin bir biyoaktivite sergilediği ve potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceği net olarak ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Amfibi Yumurta Jeli, Karakterizasyon, Melanom Kanseri, *Pelophylax ridibundus*, Toksisite.

Haziran, 2023; 69 sayfa

PhD. THESIS

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* EGG JELLY AND DETERMINATION OF ITS BIOLOGICAL ACTIVITY ON MELANOMA CANCER

Behlül KOÇ BİLİCAN

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Murat KAYA

ABSTRACT

In this thesis, the jelly structure, excreted for feeding, growing, and protecting the embryos of the selected test organism *Pelophylax ridibundus* (*P. ridibundus*), an amphibian species belonging to Ranidae family, was characterized in detail for the first time and gained to the literature. Physicochemical analysis (FT-IR, TGA, XRD, SEM-EDX, and elemental analysis) of the egg jelly structure of *P. ridibundus*, selected due to being cosmopolitan and ease of culture, demonstrated that the structure consists entirely of carbohydrate and protein. Through HPLC analysis, it was found that the egg jelly, identified to have 96 µg/mL carbohydrate, includes glucose, mannose, and xylose in its profile. 2,4 µg/µL protein was detected in the structure by LC-MS/MS analysis, and the protein profile was determined according to the Uniprot/Swissprot database data. Sialic acid-binding lectin, one of the identified 12 proteins, draws attention because of its ability to inhibit tumor growth via the way of the macrophage system against tumor cells.

It was hypothesized for the first time in this study that the egg jelly, protecting the embryo of Amphibia in polluted aquatic conditions and acting the role of a strong barrier by contributing to its growth and improvement, may have positive effects on the skin, as inspired particularly by the protective functions of UV lights on the embryo in these challenging nature conditions. It was predicted within the framework of the current research study that the egg jelly of Amphibia could have a strong biological activity as a biomaterial discussed in the research on melanoma, the most aggressive skin cancer with a high metastatic index. Through cell studies carried out with MTT analysis and xCELLigence device enabling synchronous measurement, it was identified that while 5 mg/mL selective dose of egg jelly of *P. ridibundus* shows an anticancer effect (viability < %30) on melanoma cancer cells (A375), it does not show cytotoxicity (viability > %70) towards healthy human skin cells. It was clearly demonstrated for the first time in this thesis study that amphibian egg jelly, a natural miracle, exerts efficient bioactivity on melanoma cells and can be a potential treatment.

Keywords: Amphibian Egg Jelly, Characterization, Melanoma Cancer, *Pelophylax ridibundus*, Toxicity.

June, 2023; 69 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tez çalışmasında elde edilen <i>P. ridibundus</i> aktif melanoma ve sağlıklı insan deri fibroblastı üzerine etkisinin şematik gösterimi.	3
Şekil 3.1. <i>P. ridibundus</i> , türünün genel görünüşü, doğal ortamındaki yumurta kümeleri, embriyo ve jelin genel ve mikroskop altındaki görüntüsü.	20
Şekil 3.2. Amfibi yumurta jel örneklerinin embriyodan ayrılması ve kurutulma süreci.	21
Şekil 4.1. Yumurta jel örneğine ait FT-IR analiz sonucu.	31
Şekil 4.2. Yumurta jel örneğine ait TGA analiz sonucu.	32
Şekil 4.3. Oda sıcaklığında kurutulmuş yumurta jel örneğine ait SEM görüntüleri. .	33
Şekil 4.4. Liyofilizatör ile kurutulmuş yumurta jel örneğine ait SEM görüntüleri: a) Yumurta jeli içerisindeki embriyo, b) Yumurta jelinin yüzey morfolojisi, c) Yumurta jelinin kesit görüntüsü.	34
Şekil 4.5. Yumurta jel örneğine ait XRD analiz sonucu.	36
Şekil 4.6. Absorbans değerlerine karşı elde edilen standart kalibrasyon eğrisi.	37
Şekil 4.7. Yumurta jel örneğinin HPLC spektrumu: a) N-asetil Galaktozamin ve N-asetil Glukozamin, b) Glikoz c) Galaktoz, Mannoze ve Ksiloz şeker standartları.	38
Şekil 4.8. Yumurta jel örneğinin SDS-PAGE analiz sonucu.	39
Şekil 4.9. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Sialik asit bağlayıcı lektin proteini.	40
Şekil 4.10. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Keratin tip I proteini.	41
Şekil 4.11. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Keratin tip II proteini (SV:1).	42
Şekil 4.12. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Keratin tip II proteini (SV:2).	43
Şekil 4.13. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Keratin-3 tip I proteini.	44
Şekil 4.14. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Arpin proteini. ..	45
Şekil 4.15. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Uzama faktörü 1-alfa proteini.	46
Şekil 4.16. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Tudor alanı içeren protein.	47
Şekil 4.17. MTT analizine % canlılık sonuçları: a) Melanoma (A375), b) İnsan deri fibroblastı.	51
Şekil 4.18. xCELLigence cihazı analizi hücre indeksi sonuçları: a) Melanoma (A375), b) İnsan deri fibroblastı.	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. nHPLC’de analitik kolona uygulanan mobil fazların gradientleri.	27
Çizelge 4.1. Yumurta jel örneğinin Elementel ve EDX analiz sonuçları.	36
Çizelge 4.2. Uniprot/Swissprote veritabanı araştırılarak tanımlanan proteinler.	48



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BSA	Sığır Serum Albumin
CO₂	Karbondioksit
DTG_{max}	Maksimum Bozunma Sıcaklığı
DTT	Dikloro Difenil Trikloroetan
EDX	Enerji Dağılım Spektrometresi
FA	Formik Asit
FBS	Fetal Sığır Serumu
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
H₂SO₄	Sülfirik Asit
IPA	İzopropil Alkol
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum Bromid
pH	Hidrojen Potansiyeli
SD	Standart Sapma
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	Termal Gravimetrik Analizi
UV	Ultraviyole
XRD	X-ışını Kırınımı Yöntemi
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kV	Kilo voltaj
mA	Miliamper
mg	Miligram
mm	Milimetre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
kV	Voltaj
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikrometre
°C	Santigrat Derece

1. GİRİŞ

Eski bir grup olan amfibiler, ilk kara omurgalıların kalıntılarını temsil ederler. Amfibiler, Anura, Urodela ve Apoda olmak üzere üç ana taksondan oluşmaktadır. Bu üç amfibi grubu, görünüşte o kadar farklıdır ki, asla birbirleriyle karıştırılmazlar. En belirgin şekilde paylaştıkları şey, ana solunum organı görevi gören ve çoğu diğer organizmalar için zehirli olan çeşitli salgılar üreten nemli derileridir (Wake ve Koo, 2018). Amfibiler, kuşlar ve memeliler gibi diğer omurgalı gruplarıyla karşılaştırıldığında, onlara kıyasla oldukça az bilinirler (Adler ve Halliday, 2002). Amfibilerin bilinen önemli iki özelliği vardır. Birincisi, amfibiler, su tutma yeteneklerini ciddi şekilde sınırlayan ince, geçirgen bir cilde sahiptir; bu onları nemli habitatlarla sınırlar. Birkaç türleri en kurak çöllerde yaşar, ancak hayatlarının çoğunu yerin derinliklerinde geçirirler ve nadiren yağmurdan sonra ortaya çıkarlar. İkincisi, amfibilerin yumurtaları ince bir zarla çevrilidir ve ancak ıslak tutulursa hayatta kalabilirler. Bu nedenle, amfibilerin yaşam alanı çoğunlukla yılın birçok zamanı ya da tamamı için suyun mevcut olduğu habitatlarla sınırlı kalır (Halliday, 2008).

Amfibi yumurtaları, yumurtayı çevreleyen ve genellikle birkaç farklı katmandan oluşan, jel tabakası olarak adlandırılan ve suda çözünmeyen jelatinli bir matrisin varlığı ile karakterize edilir. Yumurta jel katmanları, yumurta kanalını kaplayan tübüler bez hücrelerinin salgı ürünleridir ve yumurtalıktan salındıktan sonra yumurta kanalını geçerken yumurtaların etrafında biriktirilir. Optik mikroskop çalışmaları ile belirlendiği üzere, jel kaplamalar morfolojik olarak basittirler ve herhangi bir ayırt edici özellikleri yoktur (Yurewicz vd., 1975). Amfibi yumurta jel kabuğunun histokimyası üzerine yapılan çalışmalar ve kimyasal analizler, yapıda protein ve karbohidratın varlığını göstermiştir (Folkes vd., 1950; Lee, 1967; Freeman, 1968; Steinke ve Benson Jr, 1970; Yurewicz vd., 1975; Carroll Jr vd., 1991; Olson ve Chandler, 1999).

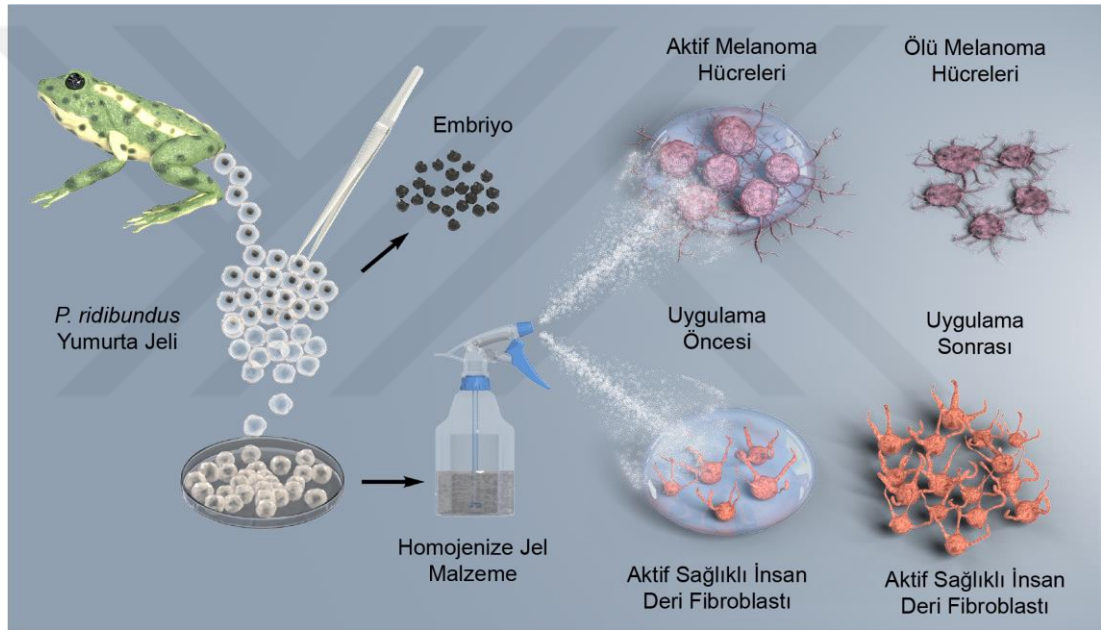
Yakın zamana kadar, amfibi yumurtaları üzerine yapılan çalışmaların birçoğunda, jel tabakalarına nispeten az ilgi gösterilerek vitellin zarfın rolüne odaklanılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda ise jel katmanının döllenme ve gelişmedeki rolü üzerine yoğunlaşmıştır. Fertilizasyon üzerine yapılan çalışmaların tamamı, amfibi yumurta-jel katmanının, başarılı döllenme ve gelişmede önemli bir rol oynadığı konusunda ortak bir noktada karara bağlanmıştır (Humphries Jr ve Hughes,

1959; Lee, 1967; Freeman, 1968; Olson ve Chandler, 1999). Jel kabuğundan yoksun yumurtaların döllemediği bu nedenle jel yapısının kurbağalarda döllelenmenin sağlanmasındaki ana faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir (Turani vd., 2020). Bu hücre dışı matris tabakalarının, sperm bağlanması, spermakrozom reaksiyonunun indüklenmesi, polispermi bloğu ve gelişmekte olan embriyonun korunması dâhil olmak üzere dölleme sırasında bir dizi rol oynadığı bilinmektedir; bunlar hayvanlar âleminde yumurta hücre dışı matrisleri tarafından yaygın olarak paylaşılan rollerdir (Ishihara vd., 1984; Katagiri, 1987; Bakos vd., 1990).

Doğada zorlu ortam şartlarına karşı embriyoyu koruyan, besleyen, büyümesine ve gelişmesine olanak sağlayan amfibi yumurta jel yapısının, aday bir biyomalzeme olarak da güçlü biyolojik aktiviteye sahip olabileceği bu tez çalışması kapsamında öngörülmüştür. Bu jel yapı, doğada özellikle kirli sucul ekosistemlerde embriyoyu koruyacak kadar güçlü bir bariyer görevi görüp aynı zamanda besleyici özelliğe de sahip olmasıyla birlikte görevini tamamladığında biyolojik olarak bozulup doğaya geri dönüşüme katılmaktadır. Bu tez çalışmasında, yumurtayı saran jelin doğada embriyoyu beslemesi ve özellikle ultraviyole (UV) ışınlarından embriyoyu koruması fonksiyonlarından esinlenerek, deri üzerine olumlu etkilerinin olabileceği hipotez edilmiştir (Bakos vd., 1990; Häkkinen vd., 2001; Blaustein ve Belden, 2003).

Yüksek metastatik indeksi ile en agresif cilt kanseri olan melanom, cilt kanseri ölümlerinin yaklaşık %90'ına neden olmaktadır. Kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi halihazırda mevcut olan konservatif tedavilerin, metastatik melanoma karşı çok az etki gösterdiği ve hastalarda kötü prognoza yol açtığı bilinmektedir (Wang vd., 2020). Bu nedenle, söz konusu kanser türüne karşı tedavide verimli bir terapotik stratejinin eksikliği açıkça görülmektedir. Bu eksikliği gidermesini öngördüğümüz aday biyomalzeme ile yaptığımız çalışmalarda, doğada değişen ortam şartlarına rağmen embriyoyu koruyan, besleyen jel yapının melanom kanser hücrelerini (A-375) inhibe ederken sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerine ise toksik bir etkisinin olmadığı MTT analiz sonuçları ile ortaya konmuştur. İlk kez bu tez çalışması kapsamında deri kanseri tedavisi için eş zamanlı ölçüm imkânı sunan xCELLigence cihazı ile kanserli deri hücreleri ve sağlıklı deri fibroblast hücreleri üzerine test edilmiş ve etkin doz belirlenmiştir.

Yine ilk kez bu tez çalışması kapsamında deri kanseri üzerine etkinlik gösteren (Şekil 1.1) ve glikoprotein yapıda olduğu öngörülen kurbağa yumurta jelinin Bradford ve Dobi yöntemi ile karbohidrat ve protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu çalışmalara ilaveten yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi ile karbohidrat içeriği, sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) analizi ile protein içeriği belirlenmiştir. Daha önce literatürde açıklanmamış olan yumurta jelinin kimyasal yapısı, fizikokimyasal analizler; fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR), termogravimetrik analiz (TGA), X-ışını kırınım difraksiyonu (XRD), elementel analiz ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile ilk kez bu tez çalışması kapsamında detaylı olarak açıklanmıştır.



Şekil 1.1. Tez çalışmasında elde edilen *P. ridibundus* aktif melanoma ve sağlıklı insan deri fibroblastı üzerine etkisinin şematik gösterimi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Amfibiler, sucul yaşam ile karasal yaşam arasında bir köprü görevi gören Anura, Urodela ve Apoda olmak üzere 3 takıma ayrılan ve dünyada 8000'den fazla türe sahip olan soğukkanlı omurgalı canlılardır (Baran vd., 2012). Amfibiler; kozmopolit olmaları, kolay kültüre edilebilmeleri, çift yaşamlı olmaları ve potansiyel klinik uygulamaları sayesinde birçok çalışmaya konu olmuştur (Barra ve Simmaco, 1995; Simmaco vd., 1998; Mashreghi vd., 2013). Çoğu hayvan türünün olgun yumurtaları, vitellin zar, jel ve zona pellucida gibi hücre dışı katmanlar veya yapılarla çevrilidir (Shimoda vd., 1994). Amfibi yumurtaları bu yapılardan bir vitellin zarf ile yapısal ve kimyasal olarak farklı birkaç jel tabakayla çevrilidir. Bu jel tabaka, amfibi yumurtalarının karakteristik bir özelliğidir. Suda çözünmeyen jelatinimsi bir matris olarak tanımlanmaktadır. Jel tabakalar, yumurta kanalını kaplayan tübüler bez hücrelerinin salgı ürünüdür ve yumurtalıktan salındıktan sonra yumurta kanalını geçerken yumurtaların etrafında biriktirilmektedir (Lee, 1967). Amfibi yumurtalarında jel tabakanın katman sayısının türlere göre farklılık gösterebileceği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Örneğin, *Bufo japonicus*'un yumurta jeli dört tabakaya sahipken (Katagiri, 1987), *Rana pipiens* türünün iki katmana sahip olduğu gösterilmiştir (Wright ve Wright, 2019). Optik mikroskop çalışmaları ile belirlendiği üzere, jel kaplamalar morfolojik olarak basittir ve herhangi bir ayırt edici özelliği yoktur. Biyokimyasal analizler, yumurta jel yapısının küre şeklinde birbirine bağlanan ve iskelet görevi gören lifli bir glikoprotein yapısına sahip olduğunu göstermektedir (Bonnell ve Chandler, 1996). Birkaç amfibi yumurta jel kabuğunun histokimyasal çalışmaları ve kimyasal analizleri, protein ve karbohidratın varlığını kesin olarak gösterse de içeriği bu zamana kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. İçeriği tam olarak belirlenememiş glikoprotein yapıdaki bu jel tabakanın; 1) yumurta için mekanik destek sağlaması, 2) kirleticilerden yumurtayı koruması 3) yırtıcılardan, patojenlerden, sıcaklık ve UV ışığı gibi çevresel stres faktörlerinden koruması gibi çeşitli rollerinin olduğu bilinmektedir (Marquis vd., 2006; Altig ve McDiarmid, 2007). Amfibi jeli üzerine literatürde üreme, immünobiolojik, toksisite, ekotoksikoloji, basit düzeyde fiziko-kimyasal araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, jelin fizikokimyasal olarak karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılması üzerine eksikliğin olduğu açıkça görülmektedir (Shaver, 1966; Freeman, 1968; Beattie, 1980; Omata, 1993; Marquis vd., 2006).

2.1 Amfibi

Amfibiler kesinlikle tüm karasal omurgalılar arasında en çeşitli ve en az bilinen yaşam öykülerine sahiptir. Bir kısmı suda bir kısmı da karada yaşadıklarından dolayı amfibiler, adını Yunanca çift yaşamlı anlamında gelen “Amfibia” dan almaktadır. Karada yaşayan amfibilerde yumurtalarını genellikle suya bırakırlar ve amfibilerin larva evreleri suda gerçekleşir. Amfibiler, solungaçlar yerine akciğerler ve yüzgeçler yerine bacaklar gibi değişiklikler geçirmeleri sayesinde karada yaşayabilmektedirler. Karada yaşayan amfibilerin derilerinde kıl, tüy ve pul gibi yapılar yoktur, yani derileri çıplaktır. Bu özelliklerine ek olarak derilerinde, deriyi sürekli ıslak tutmaya yarayan ve bazıları zehirli olan salgı bezleri vardır. Amfibiler; böcek, solucan ve salyangoz gibi diğer hayvan türlerini yiyerek beslenirler. Amfibilerin gelişmeleri larva evresi içerir, yani metamorfoz geçirirler. Larva evresinin süresi, türe, sıcaklık derecesine ve dış şartlara bağlı olmak üzere değişkenlik göstermektedir. Amfibiler kuraklık ve tuzluluk gibi iki faktöre karşı dirençsizdirler. Bu yüzden tuzlu sularda yaşayamazlar (Baran ve Atatür, 1998).

Sudan karaya geçişleri sırasında amfibilerin yapılarında yeni yaşamsal özellikler oluşmuştur. Amfibiler, sahip oldukları gelişmiş mekanizmaları sayesinde farklı çevre koşullarında yaşayabilmektedirler (Ferreira ve Jesus, 1973). Anatomik ve fizyolojik özelliklerinden dolayı balıklar ve sürüngenler arasında yer alan amfibiler omurgalı sınıfındandır. Amfibileri balıklardan ayıran başlıca özellikler: karada ve suda yaşayabilmeleri, akciğer varlığı, duyu organlarının kara yaşamına uyum göstermesi, ağız ile bağlantılı olan burun deliklerine sahip olmalarıdır. Amfibilerin kara hayatında yaşayabilmeleri hareketli göz kapaklarının oluşmasına olanak sağlamıştır ve gelişmiş görme duyularına sahiptirler. Bununla birlikte amfibiler suya karşı geçirgen olan derilere sahip olmaları sayesinde suyu deri üzerinden temin etmektedirler (Viborg ve Rosenkilde, 2001). Tüm omurgalılarda olduğu gibi derileri, dermis ve epidermis tabakalarından oluşmaktadır. Ayrıca deriyi sürekli ıslak ve kaygan tutmaya yarayan ve bazıları zehirli olan salgı bezleri vardır. Amfibilerin farklı renk ve desenlerine sahip olmaları dikkat çeken bir diğer özellikleridir. Tropik bölgelerde yaşamlarını sürdüren farklı renklere sahip amfibiler zehirlidir. Bu yüzden, amfibilerin çok renkli olmaları ve renklerinin parlaklığı bilim adamlarına göre uyarı olarak kabul edilir. Zehirli amfibiler korunma noktasında şanslı olsalar da bu durum onları tehlikeden tamamen

kurtarmaz. Amfibiler, büyük tatlı su balıkları, su kaplumbağaları, yılanlar, balıkçıl veya bazı yırtıcı kuşlar tarafından avlanırlar. Larvaları için sucul hayvanlar her zaman tehdit oluşturlar (Kuru, 1999).

Yumurtaları küre şeklinde jelimsi bir kıvamda olan amfibiler embriyolarının çıplak olması yani amniyon zarının bulunmaması sebebiyle balıklar ile birlikte omurgalılarda amniyon zarı bulunmayanlar (Anamnia) grubunu oluşturlar. Amfibilerin yumurta gelişimleri ve larva evreleri genellikle suda geçer, karada yaşayan amfibilerin büyük bir çoğunluğu da üreme süreçlerinde suya girerler. Bu bağlamda amfibilerin yaşam tarzları yüzgeçler yerine bacakların, solungaçlar yerine akciğerlerin oluşması gibi birçok önemli morfolojik ve anatomik değişikliklere sebep olmuştur. Larva evrelerinde solungaç solunumu yaparlar, bu evrede sucul karakterler baskındır (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Amfibilerin kural olarak yumurta bıraksalar da yarı gelişmiş yavru ve canlı yavru doğurma gibi durumlarına da rastlanmaktadır. Amfibilerde yumurta bırakma işlemi türe göre değişkenlik göstermektedir. Amfibiler yumurtalarını tek tek, kümeler halinde veya boncuk dizileri şeklinde bırakırlar. Amfibi yumurtaları gelişmelerini larva evresinde gerçekleştirirler, larva evreleri birkaç ay sürebilmektedir. Larvanın türü ve bulunduğu ortama göre metamorfoz süresi değişkenlik gösterebilmektedir. Metamorfoz süresini etkileyen en önemli dış faktörlerden birisi sıcaklıktır. Literatürde aynı tür amfibilerin sıcak bölgelerde yaşayan popülasyonlarının metamorfoz süresinin bir üreme zamanında tamamlandığı, soğuk bölgelerde yaşayan popülasyonların metamorfoz süresinin ise bir yıl hatta daha fazla sürebileceği ifade edilmiştir (Kuru, 1999). Metamorfoz sonrası amfibiler belli bir süre geçtikten sonra eşeyssel olgunluğa erişebilmektedirler. Bu süre, belirli bir yaş ile birlikte belirli bir vücut büyüklüğüne ulaşabilmesiyle ilişkilidir. Bu süre türlere göre bir yıl ya da birkaç yıl da sürebilmektedir. Cinsel olgunluk sonrasında da amfibiler büyümeye devam edebilirler, amfibi türünün boyu erişebileceği noktaya kadar her yıl artış gösterebilmektedir (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Bacaksız amfibiler (Apoda), kuyruklu amfibiler (Urodela) ve kuyruksuz amfibiler (Anura) olmak üzere dünyada yaşayan çift yaşamlılar 3 ayrı grupta toplanırlar Apoda hariç, Anura ve Urodela takımı ön ve arka ayaklara sahiptir, derileri kıl, tüy ve pul gibi yapılar içermez, yani çıplaktır ve nemlidir. Göğüs kemikleri kaburgalarla

bağlanmamış olup vücut sıcaklıkları ortama göre değişkenlik göstermektedir. Kuraklık ve tuzluluğa direnç gösteremeyen amfibiler yalnızca tatlı sularda yaşarlar (Baran vd., 2012). Hem karada hem de suda yaşayabilen çift yaşamlılar, aslında tamamen karasal yaşama uyum sağlayamamışlardır ve tatlı sulardan da tamamıyla kopamamışlardır. Su ve nemli bölgelerde üreme gerçekleştirirler.

Apoda, silindir şeklinde vücuda, düz ve halkalara ayrılmış deriye sahip olan ülkemizde türü bulunmayan amfibi grubudur. Yılan ve solucanlara benzeyen Apoda'ların zehir bezleri bulunmaktadır. Apoda'ların derilerinde dermis kökenli kalkerli pullar bulunabilmektedir. Kuyrukları ise ya yoktur ya da çok kısadır. Apoda'ların bir kısmı yumurta bırakarak çoğalsa da birçoğu canlı yavruyu vücutları içerisinde geliştikten sonra dışarıya çıkarırlar (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Urodela, genelde 8-20 cm aralığında boya sahip olan, bazılarının boyları 1 m'yi aşan amfibi grubudur. Larva evresinde dahi kuyrukları vardır ve neredeyse birbirine eşit ön arka bacaklar bulunur. Kertenkeleye benzeyen Urodela'lar, derilerinin çıplak olmaları sayesinde ayırt edilirler. Bazı Urodela'larda harici döllenme görülür ancak çoğunda larva evresi vardır. Larvaları genel olarak erginlerine benzemektedir. Sadece larvada farklı olarak dış solungaçlar bulunmaktadır (Budak ve Göçmen, 2005).

Anura, dünyanın her yerinde bulunabilen kozmopolit amfibi grubudur. Geniş vücuda sahip olan Anura'ların boyun kısımları yoktur. Omur sayıları az olan Anura'lar, arka bacaklarının ön bacaklarından daha uzun olması sayesinde iyi sıçrayabilirler. Anura'ların üremeleri, dış döllenme ile gerçekleşir (Budak ve Göçmen, 2005). Yumurtalarını suya bırakırlar ve yumurtalar erkek tarafından döllenir. Larva dönemlerinde bulunan kuyruk erginlerinde bulunmaz. Anuralar, erginleşme sürecinde birçok kez metamorfoz geçirirler. Anuralar, omur şekillerine, diş durumlarına, kaburgalarının ve dillerinin olup olmamasına, ayak parmak uçlarına dikkat edilerek sınıflandırılmaktadır (Budak vd., 2002). Bu tez çalışması için, Anura takımının 7129 üyesinden biri olan *Pelophylax ridibundus* türü seçilmiştir. Bu tür kozmopolit olması, kolay kültür edilebilmesi ve literatürdeki bilgi eksikliği nedeniyle test organizma olarak belirlenmiştir.

2.1.1 *Pelophylax ridibundus*

Ova kurbağası olarak bilinen *Pelophylax ridibundus* (*P. ridibundus*), *Ranidae* (Gerçek su kurbağaları) familyasına ait bir amfibi türüdür ve boyları 15 cm civarlarında olup, sırt tarafı yeşilimsi gri, açık veya koyu kahverengi olabilir (Baran vd., 2012). Tez çalışması için seçilen bu türün beslenmesi, dağılımı, çevresel faktörlerden kaynaklanan derideki ağır metal birikimi, yükseltiye bağlı değişen vücut büyüklüğü ve yaş yapısı üzerine çalışmalar bulunmasına rağmen *P. ridibundus* jel yapısının karakterizasyonu üzerine hiçbir çalışma bulunmamaktadır (Balint vd., 2008; Gül vd., 2011; Leuenberger vd., 2014; Borković-Mitić vd., 2016). Şu ana kadar bu tür üzerine yapılan çalışmalara kısaca bakıldığında;

Gül vd. (2011) yaptıkları bir çalışmada, Dörtüol ve Karagöl olmak üzere iki farklı yükseklikte yaşayan *P. ridibundus* popülasyonu, vücut büyüklüğü ve yaş ölçütleri bakımından karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir (Gül vd., 2011).

Yapılan başka bir çalışmada ise ova kurbağası olan *P. ridibundus*'un yaşadığı ortamdan kaynaklanan 18 adet ağır metalin dokularda (karaciğer, deri ve kas) birikme miktarını ölçmek amacıyla, bu türün enzimlerindeki oksidatif stres seviyesinde gerçekleşen değişiklikleri belirlemişler ve ova kurbağalarının cildindeki metal birikiminin analizi ile birlikte metal kirliliğinin değerlendirilmesi için güçlü bir alternatif olduğunu ortaya koymuşlardır (Borković-Mitić vd., 2016).

Diğer bir çalışmada ise Kafkas bölgesinin Kolkhida Kanyonu'nda yaşayan bir amfibi türü olan *P. ridibundus*'un deri sekresyonundan izole edilen peptitlerin 29 çeşidi tanımlanarak, bu peptitlerin oto-immuniteden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur (Samgina vd., 2008).

Amfibi deri altı bezi salgıları üzerine yapılan başka bir çalışmada bu salgıların 100.000'den fazla biyoaktif bileşikten oluştuğu ve bu biyoaktif bileşiklerin analjezik, antibiyotik, antiviral, yara iyileşmesi, antidiyabetik, antikanser özellikleri ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yüksek potansiyele sahip olan doğal bir kaynak olabileceği rapor edilmiştir (Xu ve Lai, 2015).

Literatürdeki yapılan bir diğer çalışmada, amfibi salgılarının yara iyileşmesi üzerine olumlu etkisini göstermek amacıyla, *P. ridibundus* deri altı bezlerinden elde edilen bu

salgıların fareler üzerinde in-vivo denemesi yapılmıştır. Deney grubu ve kontrol grubunda bulunan farelerde çeşitli parametrelerin (enflamatuar hücre sayısı, fibroblast hücre sayısı, hücrelerdeki kollajen liflerinin miktarı, neovaskülarizasyon, histolojik parametreler vb.) kıyaslanması sonucu deney grubunun yara iyileşme hızının daha iyi sonuçlar verdiği açık bir şekilde ortaya konmuştur (Mashreghi vd., 2013).

Bu tez çalışması için, Anura takımının 7129 üyesinden biri olan *P. ridibundus* türü seçilmiştir. Bu türün kozmopolit olması, kolay kültür edilebilmesi ve literatürdeki bilgi eksikliği test organizması olarak belirlenmesine sebep olmuştur. Literatürde yer alan *P. ridibundus* üzerine yapılan çalışmalar detaylı şekilde incelendiğinde bu türün beslenmesi, vücut büyüklüğü, yaşı, deri salgılarının peptit içeriği ve potansiyel uygulama alanları üzerine çok miktarda çalışma yapıldığı görülmektedir. Ancak *P. ridibundus* türünün, hatta ait olduğu amfibi sınıfındaki canlıların yumurta jel yapılarının ve karakterizasyonunun ihmal edildiği anlaşılmaktadır. Deri kanseri tedavisi amaçlı kullanılabileceğini ön gördüğümüz kurbağa jeli biyomalzemesinin literatürde ilk defa bu tez kapsamında çalışılacak olması nedeniyle malzemenin karakterizasyonuna dair bilgi bulunmamaktadır.

2.2 Amfibi Yumurta Jelleri

Amfibi yumurtalarının karakteristik bir özelliği, yumurtayı çevreleyen ve genellikle birkaç farklı katmandan oluşan, jel tabakası olarak adlandırılan ve suda çözünmeyen jelatinli bir matrisin varlığıdır. Jel tabakalar, yumurta kanalını kaplayan tübüler bez hücrelerinin salgı ürünüdür ve yumurtalıktan salındıktan sonra yumurta kanalını geçerken yumurtaların etrafında biriktirilmektedir (Yurewicz vd., 1975). Amfibi yumurtalarında jel tabakanın katman sayısının türlere göre farklılık gösterebileceği yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Biyokimyasal analizler, yumurta jel yapısının küre şeklinde birbirine bağlanan ve iskelet görevi gören lifli bir glikoprotein yapısına sahip olduğunu göstermektedir (Olson ve Chandler, 1999).

Yapılan bazı çalışmalar, yumurta jelini morfolojik açıdan incelemiş ve katman sayıları hakkında araştırmalarda bulunmuştur. Salthe, 72 amfibi türünün jel zarflarının morfolojisini karşılaştırmalı olarak sitokimyasal tekniklerle incelemiştir. Yapılan incelemelerde bu katmanların karmaşık katmanlar halinde yumurta kanalı tarafından salgılanan mukoid bir materyal olduğu rapor edilmiştir (Salthe, 1963). Başka bir

çalışmada Steinke ve Benson, benzer şekilde *Rana pipiens* yumurtalarının jel zarflarının yapısı ve polisakkarit sitokimyası üzerine detaylı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Beş ayrı jel katman tespit edilen çalışmada yapının yine mukopolisakkaritlerden oluştuğu rapor edilmiştir. Bunlara ek olarak jel zarflarının yapısal ve kimyasal doğalarının aydınlatılmasının, fonksiyonel rollerinin belirlenmesinde oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır (Steinke ve Benson Jr, 1970). Altig ve McDiarmid, amfibi yumurtalarının çeşitliliği ve evrimi üzerine yaptıkları çalışmada bu zamana kadar yapılan çalışmalarda yumurtayı kaplayan jel yapısı ve içerik bilgisinin net olarak ortaya konamamasını farklı gözlem tekniklerine dayandırmışlardır. Farklı tekniklerin farklı sonuçlara yol açması nedeniyle jel yapıdaki katman sayısı kadar gözlenmesi kolay olan özelliklerin bile tam olarak aydınlatılamadığını rapor etmişlerdir (Altig ve McDiarmid, 2007).

Literatürdeki amfibi yumurta jelleri üzerine yapılan çalışmalar genellikle jel katman sayısı, jelin dölleme üzerine etkisi gibi benzer konular üzerine yoğunlaşmıştır. Jelin içeriği ve glikoproteinlerin tanımlanması üzerine az sayıda çalışma yapılmıştır. Örneğin; Peavy vd. yumurta jelinin içeriğindeki glikoproteinler üzerine detaylı bir çalışma yapmışlardır. Jel kaplama katmanlarının, yumurta ile spermin ilk etkileşimlerine aracılık ettiğini ve moleküler konfigürasyonları, sperm penetrasyonunu ve döllemeyi desteklediği belirtilmiştir. Bu jel katmanların proteinler için iskele oluşturan büyük fibriler glikokonjugatlardan oluştuğu belirtilmiştir. Jel katmanı oluşturan glikoproteinlerin moleküler kimliğinin ortaya çıkarılmasının, yumurta jel katmanlarının yapısının ve işlevinin anlaşılması için çok önemlidir. Bugüne kadar birkaç jel makromolekülü karakterize edilmiştir (Peavy vd., 2003). Yurewicz vd. *Xenopus laevis* yumurta jel kaplamasının makromoleküler bileşimi üzerine detaylı bir araştırma yapmışlardır. Oldukça kapsamlı olan bu çalışmada, *Xenopus laevis* yumurtasını kaplayan jel tabakanın üç katmandan oluştuğu ve bu katmanların bileşiminin yaklaşık olarak %37-48 oranında protein ve %52-63 oranında karbohidrat içerdiği rapor edilmiştir. Jel katmanın 8-9 farklı makromolekülden oluştuğu ifade edilen çalışmada önemli bir ilerleme kaydedilmiş olsa da moleküler bileşim net olarak ortaya konulamamıştır (Yurewicz vd., 1975). Folkes vd. yaptıkları bir çalışmada kurbağa yumurta jelini musin (protein polisakkarit kompleks) olarak adlandırmışlardır. Musin analizinde, amino asitlerin ve şekerlerin kantitatif tayini için uygun yöntemlerin olmaması nedeniyle geciktiğini belirtmişlerdir. Yeni yöntemlerin geliştirilmesi,

şekerlerin ayrılmasını kolaylaştırmıştır ve mevcut çalışmada, kurbağa yumurtası musinin hidrolizinde üretilen şekerlerin ve amino asitlerin incelenmesinin sonuçlarını rapor etmişlerdir. Protein kısmın içerdiği amino asitleri tanımlamanın yanı sıra karbohidrat kısım için %42'lik bir oran saptadıklarını rapor etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçların yetersiz olduğu ve musinin yapısını aydınlatmak için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulacağını belirtmişlerdir (Folkes vd., 1950). Bir diğer çalışmada Carroll Jr. vd. bir anura türü olan *Lepidobatrachus laevis*'in yumurta ve embriyo jel kaplamalarının yapısı ve makromoleküler bileşimi üzerine araştırma yapmışlar ve %19 karbohidrat ile ortalama 150 pg protein/embriyo içeriği belirlemişlerdir (Carroll Jr vd., 1991).

Amfibi yumurta jeli içeriği üzerine yapılan çalışmalarda dikkat çeken bir diğer buluş lektindir. Lektinler, eritrositleri, diğer normal ve kanser hücrelerini ve mikroorganizmaları aglütine etme yeteneğine sahip çok değerli karbohidrat bağlayıcı proteinlerdir ve yapılan çalışmalar amfibi yumurta jellerinde tespit edilmiştir (Titani vd., 1987). Yapılan güncel bir çalışmada Chesnel vd., amfibi (urodela) yumurta jelinde mikroorganizmaların lektin kaynaklı aglütinasyonu üzerine yoğunlaşmışlardır. Lektinler için öngörülen birçok fizyolojik rol arasında, patojenik mikroorganizmalara karşı korunmanın da yer aldığı belirtilen çalışmada iki farklı amfibi (*Pleurodeles waltl* ve *Ambystoma mexicanum*) yumurta jelinde bulunan lektinin, in-vitro ve in situ koşullar altında mikroorganizmaları aglutine edebildiği rapor edilmiştir (Chesnel vd., 2019). Bir diğer çalışmada Titani vd. *Rana catesbeiana* yumurta jelindeki sialik asit bağlayıcı lektin proteinleri üzerine yoğunlaşmışlardır. Yapılan çalışmada kurbağa yumurtasındaki sialik asit bağlayıcı lektinlerin, kurbağa embriyosunda döllenme ve gelişmede rol oynayabileceği ancak bu yönde herhangi bir çalışmanın yapılmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada açıklanan sialik asit bağlayıcı lektinin, tümör hücrelerine yönelik bir makrofaj sistemi aracılığıyla in-vivo olarak tümör büyümesini inhibe edebileceği öngörülmüştür (Titani vd., 1987). Benzer şekilde Nakajima vd., lektinin in-vitro makrofaj aktivasyonunu indüklediğini ve sonuç olarak tümör hücresi büyümesinin in-vitro inhibe edildiğini rapor etmiştir (Nakajima vd., 1986).

Amfibi yumurta jel katmanı ve makromoleküler bileşimi yapının karmaşıklığı nedeniyle bu zamana kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle de hem üç

boyutlu yapı hem de biyolojik işlev ile biyokimyasal bileşim arasındaki ilişkiler de tam olarak anlaşılamamıştır. Tüm bu çalışmalar da amfibi yumurta jellerinden bazı glikoproteinler tanımlansa da halen yetersiz olduğu, belirlenen glikoproteinlerin ise rollerinin açık olmadığı ve yumurta jellerinin işlevlerinin belirlenmesi için tanımlanmaları üzerine çalışmaların devam ettirilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Yapılan birçok çalışma yumurta jelinin fertilizasyon başarısına etkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Turani vd. yaptıkları güncel bir çalışmada yumurta jelinin, su kurbağası *Pelophylax shqipericus*'un in-vitro fertilizasyon başarısına etkisini araştırmışlardır. Jel katmanından yoksun yumurtaların döllenemediği bu nedenle amfibi yumurtası ve onu kaplayan jel yapısının, başarılı döllenme ve gelişmede önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Turani vd., 2020). Benzer şekilde Olson vd. gerçekleştirdikleri çalışmada *Xenopus laevis* yumurta jelinin döllenme üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, jelin döllenme için gerekli bazı proteinleri içerdiğini tespit etmişlerdir (Olson ve Chandler, 1999). Humphries ve Hughes, bir amfibi türü olan *Triturus viridescens*'in yumurta kanalına uygulanan bazı histokimyasal teknikler ışığında döllenme üzerine birebir etkisi olduğu öngörülen yumurta jelinin mayoz bölünme üzerinde de etkin bir rol oynadığını rapor etmişlerdir (Humphries Jr ve Hughes, 1959). Bir diğer çalışmada Lee, *Rana pipiens*'in yumurta kanalından salgılanan jeli histokimyasal ve biyokimyasal olarak analiz etmiştir. Bu jel katman olmadan yumurtaların döllenemeyeceği belirtilen çalışmada, jel katmanın protein ve kayda değer miktarda karbohidrat içerdiği rapor edilmiştir (Lee, 1967). Bir diğer önemli çalışmada Freeman, *Xenopus laevis* yumurtasının etrafını saran jel zarfları üzerine gerçekleştirdiği çalışmada jel ana bileşenlerinin karbohidrat ve proteinden oluştuğunu belirtmiştir. Bu yapının başarılı bir döllenme için gerekli olduğunu ve ileriki çalışmalarda jelin makromoleküllerinin karakterize edilmesi ve jelin yapısı ile işlevine ilişkin tüm araştırmalarda katmanlar arasındaki farklılıkların dikkate alınması gerektiği önerilmiştir (Freeman, 1968). Yapılan bu çalışmaları göz önüne aldığında, bilim insanları amfibi yumurtalarının başarılı bir şekilde döllenmesi için jelin gerekli olduğu konusunda hem fikir olmuşlardır.

Amfibi yumurtası jelinin antijenik bileşenleri, Shaver vd., tarafından çift difüzyon tekniği ile analiz edilmiştir. *R. pipiens* türü yumurta jeli antijenleri ile bunların homolog antiserumları arasındaki etkileşimler analiz edilmiş ve yumurta jel kaynağı

olan yumurta kanalı dışında başka bir bölge ile reaksiyon gözlenmemiştir. Bu durum jel malzemenin dokuya özgülüğünü ortaya konmuştur (Shaver ve Barch, 1960; Shaver vd., 1962). Benzer şekilde kurbağaların yumurta jeline antiserum ile muamele edildiğinde de jel katman çevresinde çökelmeler gözlenmiştir (Perlmann ve Perlmann, 1957). Yapılan bir diğer çalışmada yumurta jeli antiserumunun döllenmeyi engelleyebildiği ortaya konulmuştur (Tyler, 1959). Çalışmada denizkestanesi yumurtalarına uygulanan yumurta jeli kaplama malzemesine karşı üretilen antikorların uygulanması sonucunda döllenme üzerine inhibitör etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu etkinin, antikorların jel katmanda bulunan antijenik bileşenlerle reaksiyona girerek jel malzemenin sperm hücresinin yüzeyindeki tamamlayıcı bölgelerle etkileşimini engelleyen kompleksler üretmesi kaynaklı olduğu öngörülmektedir. Benzer şekilde Shaver ve Barch, hem spermatozoa hem de amfibi yumurtalarının döllenmeden önce yumurta jellerine yönelik antikorlarla muamele edilmesinin döllenme oranında önemli düşüşler sağladığını rapor etmişlerdir (Shaver ve Barch, 1960). Bu çalışmalar yumurtayı kaplayan jel tabakanın yalnızca sperm ve yumurta jeli arasındaki etkileşimin varlığını değil, aynı zamanda yumurta kanalının jel sağlayan hücreleri tarafından türe özgü molekül türlerinin varlığının da doğrudan kanıtıdır.

2.3 Biyomalzemelerin Kanser Uygulamaları

Her yıl artan ölüm oranı ile yıkıcı bir hastalık olan kanser, tüm dünyada insan sağlığı açısından en büyük tehditlerden biridir (Bray vd., 2018). Kanser, DNA'daki genetik mutasyonların neden olduğu doğal bir hücrenin deformasyonu ile başlar. Bu anormal hücre, eşeysiz üreme ile anormal şekilde çoğalır, yani çevresindeki hücre büyümesinin düzenlenmesi ile ilgili sinyalleri dikkate almaz ve invazyon özelliği kazanarak çevre dokularda değişikliklere neden olur (Brunner, 2010). Kanser, gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, dünya çapında 14 milyon insan kanserden muzdariptir ve 8 milyon insan kanserden ölmektedir (Kumar vd., 2014). Kanserlerin neden olduğu ölümler tüm dünyada artmakta olup, 2030 yılına kadar dünya genelinde kanser nedeniyle 13,1 milyondan fazla ölümün gerçekleşeceği tahmin edilmektedir (Mousavi vd., 2009).

Kanseri iyileştirmenin önündeki ana engellerden biri, kanser vakalarında yaşamı en çok tehdit eden olay ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olan metastazdır (Akhtar vd., 2019). Metastaz, kanser hücrelerinin vücutta

dolaştığı ve makrometastaz olarak da bilinen sekonder tümörleri oluşturan farklı organları istila ettiği karmaşık ve çok adımlı bir süreçtir (Suhail vd., 2019). Metastatik hücreler agresif ve dirençlidir. Kanserin neden olduğu ölümlerin %90'ından sorumlu olan metastatik aşamadaki kanserin tedavisi için etkili bir tedavi yoktur (Zeeshan ve Mutahir, 2017).

Kanser tedavisinin temel dayanak noktası, 1975'ten önce geliştirilen cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi olmuştur. Ameliyatlar genellikle metastatik tümörlerin tedavisinde etkili değildir ve lokalize tümörlerde bile cerrahi sınırlar içinde kanseri temizlemede başarılı olamayarak hastanın yeniden ameliyat olmasına neden olabilmektedir. Radyoterapi çoğu hasta tarafından genellikle iyi tolere edilir, ancak bazı durumlarda hastalarda yorgunluk, doku zedelenmesi, iltihaplanma, şişme, ödem ve ağrı gibi yan etkiler görülebilmektedir (Begg vd., 2011). Radyoterapi tümörleri azaltıp yok ederek remisyona yol açabilse de ne yazık ki X-ışınlarının mutajenik etkileri, tedavinin bitiminden yıllar sonra yeni tümörlerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Lokal ve metastatik olmayan kanserler için cerrahi ve radyoterapi birincil tedaviler iken, kemoterapi, hormon ve biyolojik tedaviler gibi anti-kanser ilaçları metastatik hastalıklar için tercih edilen tedavi yöntemi olmuştur. Kemoterapi, hücre döngüsünü bozabilen ve hücre ölümüne neden olabilen kanser karşıtı ilaçların uygulanmasına dayanır (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015). Spesifik tümör tiplerinde kemoterapiden fayda gören hasta oranının % 20'ye kadar düşebileceği tahmin edilmektedir. Önemli sayıda hasta, kemoterapiden sonra tümör tepkisi yaşayarak yorgunluk, kardiyovasküler ve nörokognitif hastalıklar, doğurganlık kaybı ve ikinci kanserlerin gelişimi gibi yan etkilerle karşılaşmaktadır (Ahmad vd., 2016). Kemoterapötik ajanların tedavi edici dozları ile yaşamı tehdit eden toksisite veren dozları arasındaki fark çok azdır ve üç veya daha fazla ajanın birlikte kullanımı sıklıkla periferik nöropati, kemik iliği baskılanması ve böbrek dahil olmak üzere karaciğerde, kardiyakta yüksek sistemik toksisiteye yol açabilmektedir (Mondal vd., 2019; Zhang vd., 2019). Tedavilerde kullanılan bu sitotoksik ilaçların birçoğu, çoğalan hücrelerdeki süreçleri hedefler ve sağlıklı hücre ile kanser hücrelerini ayırt etmez. Sıklıkla en çok etkilenen hücreler, saç folikülleri, kemik iliği ve gastrointestinal sistem epiteli gibi yüksek proliferatif hıza sahip hücrelerdir ve bu durum hastalarda tedavi sırasında gözlenen yaygın yan etkileri açıklar (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015). Bu nedenle, potansiyel olarak yaşamı tehdit eden yan etkiler riski olmadan kanser

kemoterapisinin tümör remisyonuna ulaşması pratik olarak imkansızdır. Geleneksel kanser tedavilerinin gösterdiği diğer dezavantajların yanı sıra, kanser hücreleri üzerinde spesifik etkinin olmaması, yüksek toksisite, metastatik hücreler üzerinde düşük etkinlik, birçok yeni tedavi stratejisinin ve hedefe yönelik terapiler olarak bilinen terapilerin geliştirilmesine yol açmıştır (de Oliveira vd., 2021). Bu anlamda, nanotıp terapileri ile ilaç taşıyıcı sistemler en çok karşılaşılan geleneksel kanser tedavilerine alternatif yeni tedavi yöntemleridir.

Kanser terapötiklerinin geliştirilmesi için sentetik polimerler, proteinler, lipitler ve organik ve inorganik parçacıklara dayalı çok çeşitli nano ölçekli bileşikler kullanılmıştır. Kemo ilaçların doğrudan uygulanmasıyla karşılaştırıldığında, bir taşıyıcı içinde ilaç kapsülleme, kan dolaşımındaki bozulmaya karşı koruma, daha iyi ilaç çözünürlüğü, gelişmiş ilaç stabilitesi, hedefe yönelik ilaç dağıtımı, azalmış toksik yan etkiler ve geliştirilmiş farmakokinetik gibi bir dizi avantaj sunar (Senapati vd., 2018). Bu zamana kadar inorganik-organik nano taşıyıcılar, protein bazlı nano taşıyıcılar, ilaç taşıyıcısı olarak miseller, kontrollü ilaç salımı için hibrit malzemeler, supramoleküller, hidrojeller gibi ilaç taşıma sistemleri deneysel olarak başarıyla uygulanmıştır (Gao vd., 2004; Cheng vd., 2010; Kaida vd., 2010; Zhao vd., 2010; Adeli vd., 2013; Wang vd., 2013; Yardley, 2013; Li vd., 2014; Xue vd., 2015; Gilbreth vd., 2016; Pandey vd., 2016; Wang vd., 2016; Kumari vd., 2017; Rasoulzadeh ve Namazi, 2017). Yeni ilaç dağıtım sistemleri, önümüzdeki on yılda kanser tedavisi için parlak bir gelecek vaat etmektedir. İlacın etki alanında kontrollü bir şekilde uygun lokalizasyonunu sağlayarak daha güvenli ve daha etkili tedavi fırsatı sunabilmektedir. Ancak çoğu kanserin tedavisinde mevcut ilaç salınım sistemlerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiş olsa da kansere bağlı ölüm oranını izlemek için çok daha fazla zamana ve çalışmaya ihtiyaç olduğu açıktır. Bu taşıyıcıların çoğu, küçük hayvan modellerinde tasarlanmış ve test edilmiş, harika terapötik sonuçlar elde edilmiştir; ancak, hayvan sonuçlarının klinik başarıya dönüştürülmesi sınırlı olmuştur (Senapati vd., 2018). Bu araçların avantaj ve dezavantajlarını tam olarak anlamak için daha fazla klinik veriye ihtiyaç vardır.

Geleneksel kanser tedavilerinin dezavantajını ortadan kaldırmak için geliştirilmeye çalışılan antikanser ilaçların başında gelen bir diğer önemli konu ise bitkiler ve doğal ürünlerdir (Kashyap vd., 2021). Özellikle doğal ürünler, onlarca yıldır antikanser

ajanlar için öncü bileşikler olarak kullanılmaktadır ve şu anda klinik ortamlarda kullanılan kemoterapötik ilaçların yarısından fazlası ya doğal ürünler ya da bunların yarı sentetik türevleridir (Amawi vd., 2017; Kumar vd., 2017). Hücre kültürü çalışmalarına ve hayvan modeli sistemlerine dayanan kanıtlar, çeşitli doğal ürünlerden türetilen yapısal olarak farklı bileşiklerin, kemoterapötik aktivitelerinin yanı sıra kansere kemopreventif etki gösterebildiğini ortaya koymuştur (Cragg ve Pezzuto, 2016). Bu ajanlar, alkaloidler, terpenoidler, organosülfür bileşikleri ve polifenoller dâhil olmak üzere çeşitli yapısal sınıflara aittir (N Nwodo vd., 2016). Stilbenler, fenolik asitler ve flavonoidler en yaygın olarak bulunan doğal polifenollerdir. Ayrıca tüm polifenolik bileşiklerin yaklaşık üçte ikisini flavonoidler oluşturur (Tapiero vd., 2002). Bu ajanlar, meyveler ve sebzeler dâhil olmak üzere farklı bitki bazlı gıda maddelerinde bol miktarda bulunur ve insanlar tarafından günlük diyetlerinin bir parçası olarak düzenli olarak tüketilir. Bu bitki kaynaklı ajanlar, antioksidan, antiproliferatif, proapoptotik, antianjiyojenik, antimetastatik ve antiinflamatuvar aktiviteler sergilemektedir (Sak, 2014). Ayrıca, uzun süreli diyet tüketimleri nedeniyle, bu bileşiklerin güvenlik profili de oluşturulmuştur (Huang vd., 2012). Bitkisel kaynaklı ürünlerin kanser tedavisinde kullanılması gibi doğal terapiler, olumsuz yan etkileri azaltabilir. Şu anda, kanseri tedavi etmek için birkaç bitki ürünü kullanılmaktadır. Bununla birlikte, in-vitro çok umut verici anti-kanser özellikleri gösteren, ancak henüz insanlarda değerlendirilmesi gereken sayısız birçok bitki ürünü mevcuttur (Desai vd., 2008). Bu bitki ürünlerinin insanlardaki kanserlerin tedavisinde etkinliğini belirlemek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Bunlara ek olarak son yıllarda, yeni tıbbi ajanların kaynağı olarak deniz faunası ve florasının potansiyeline olan ilgi de önemli ölçüde artmıştır. Bu geniş doğal kaynağı kullanmayı amaçlayan önemli araştırmalar dünya çapında yürütülmektedir (Chinembiri vd., 2014). Deniz kaynaklarından keşfedilen ajanların yüksek anti-tümör potansiyeli, okyanusun olası bir anti-kanser ilaç kaynağı olarak yüksek potansiyelini yansıtmaktadır (Heinrich vd., 2017). Süngerlerden, alglerden ve deniz siyanobakterilerinden elde edilen özler, güçlü anti-kanser aktiviteleri göstermiştir (Valeriote vd., 2012; Costa vd., 2013; Fedorov vd., 2013). Laminaranlar, fukoidanlar ve alginik asitler deniz kaynaklarından izole edilen ve etkili anti-kanser aktivite sergilediği bulunan bileşiklerden bazılarıdır. Deniz hayvanlarından, bakterilerden ve mantarlardan elde edilen çeşitli polisakkaritler de anti-kanser aktivitesi açısından test

edilmiş ve bunlardan bazılarının daha fazla ilaç geliştirme için umut verici olduğu ortaya konmuştur (Fedorov vd., 2013). Deniz kökenli çeşitli anti-kanser bileşikleri in-vitro ve in-vivo olarak izole edilip test edilmiş ve klinik testlerin farklı aşamalarından geçmiş olmasına rağmen, günümüze kadar sadece dört deniz kökenli anti-kanser ilacı piyasada yerini alabilmiştir.

Bu başarılı sonuçlar göz önüne alındığında etkinliği daha yüksek ve yan etkileri daha düşük olan doğal kanser tedavi ürünlerinin mevcudiyeti arzu edilmekte ve konu ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında da, bu zamana kadar hiç araştırılmamış olan ve embriyoyu doğada özellikle UV ışınlarından koruyabilme fonksiyonlarından esinlenerek, melanom kanseri üzerine olumlu etkilerinin olabileceği ön görülen amfibi yumurta jelinin kanser tedavisinde kullanılabileme potansiyeli detaylıca araştırılarak ortaya konmuştur.

2.4 Melanom Kanseri

Melanom, cilt kanserinin en saldırgan ve en ölümcül biçimini temsil etmektedir. Melanosit adlı deri renk hücrelerinde başlayan ve malign melanom olarak adlandırılan bu kanser türünde hücrelerin bir kısmı melanin pigmenti üretmeye devam ettiği için kanserli bölge genellikle kahverengi veya siyah renkte kendini göstermektedir. Kanser, dünya çapında önemli bir ölüm nedeni olarak kabul edilirken, bu tür tümörlerin yaygın olduğu ülkelerde cilt kanseri insidansı giderek artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) cilt kanserinin en yaygın kanser türü olduğu tahmin edilirken, 1970 ile 2007 arasında, Kanada'da belgelenen tüm kanserler arasında, melanom ölüm oranının ikinci en yüksek artışa sahip olduğu rapor edilmektedir (Erb vd., 2005; Kachuri vd., 2013). UV radyasyona maruz kalma süresinin artmasıyla birlikte melanom kaynaklı ölüm oranlarının artmaya devam edeceği öngörülmektedir. Deri kanseri, epidermiste çok az apoptoza veya çok fazla hücre proliferasyonu ve hayatta kalmaya yönelik bir dengesizlik ile karakterize edilmektedir (Lippens vd., 2009). UV radyasyonu cilt kanserinin önde gelen nedeni olmasına rağmen, diğer nedensel ajanlar arasında virüsler, gıdalardaki mutajenler, kimyasallardaki mutajenler ve genetik yatkınlıkta yer almaktadır (Freedman ve Nierodzik, 2007; Madan vd., 2010). Cilt kanseri, bu nedensel ajanları kontrol ederek veya ortadan kaldırarak önlenebilir. Cilt kanseri, tümöre kan akışını engelleyerek (anti-anjiyogenez) etkili bir şekilde çıkarılabilir, bu da tümör büyümesini engeller ve hastanın hayatta kalmasını

artırır. Çoğu kanser hücresi, apoptozdan kaçmak için yollar geliştirir veya kusurlu apoptoz mekanizmaları sergiler, böylece kontrol edilemeyen hücre gelişimine izin verir (Erb vd., 2005). Apoptoz süreci bu nedenle kanser önleyici kemoterapötiklerin ana hedefidir. Günümüzde cilt kanseri, diğer tekniklerin yanı sıra cerrahi olarak çıkarılması, radyasyon tedavisi, kemoterapi, fotodinamik terapi, immünoterapi veya kriyocerrahi ile tedavi edilmektedir.

Kemoterapötik ajanlarla ilgili temel problemler, ciddi yan etkiler ve çoklu ilaç direnci oluşumudur. Kanser hücrelerinin terapilere dirençli hale geldiği yöntemlerden bazıları, ilaç akış sistemleri, ilaç hedeflerinin amplifikasyonu veya ilaç kinetiğindeki değişikliklerdir (Iyer vd., 2013; Kunjachan vd., 2013; Markman vd., 2013). İlaç direncinin üstesinden gelmek için nanopartiküller, lipozomlar ve misel ilaç dağıtım araçlarının kullanımı gibi çeşitli stratejiler denenmiş ve bazı başarılar elde edilmiştir (Markman vd., 2013). Kanser kemoterapisinin olumsuz etkileri semptomatik olarak tedavi edilebilir, ancak bazı durumlarda bu tür ikincil tedaviler, bazı kanser hastaları için kabul edilemez toksisite değerine sahip olabilir (Slevin vd., 1990; Alifrangis vd., 2011; Thornton vd., 2011).

Geleneksel kanser kemoterapilerin taşıdığı dezavantajlar ve doğal tedavi seçeneklerinin öngörülen avantajları nedeniyle tamamlayıcı ve alternatif ilaçların kullanımına olan ilgi artmaktadır (Molassiotis vd., 2005). Örneğin; bitki kökleri, soğanlar, kabuklar, yapraklar ve gövdeler gibi ekstraktlardan elde edilen fitokimyasal bileşikler, anti-kanser ilaçlar olarak veya yeni ilaçların sentezinde etken bileşikler olarak görev yapmak için umut verici bir potansiyel göstermiştir. Doğal ürünlerin ve geleneksel ilaçların dezavantajları, hazırlama yöntemlerindeki ve dolayısıyla kimyasal bileşimdeki, dozaj belirleme ve ayarlamadaki ve uygun uygulama yolundaki farklılıkları içerir. Yeni ilaç maddeleri üretmek için doğal kaynaklı bileşikler üzerine çok araştırma yapılmasına rağmen, amaçlanan uygulama yolu için dozajları optimize etmek ve en etkili dozaj formlarını tasarlamak için özellikle doğal olarak türetilmiş ilaçlara yönelik araştırmalar gerekli hale gelmiştir (Cragg ve Newman, 2013).

Yüksek ölüm oranı ile cilt kanserinin en agresif şekli olan melanom için mevcutta uygulanan tedavilerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için hem güvenli hem de etkili yeni bileşiklerin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin önemi açıktır. Bu tez çalışmasında ilk kez doğadan gelen bir mucize olan amfibi yumurta jeli melanom

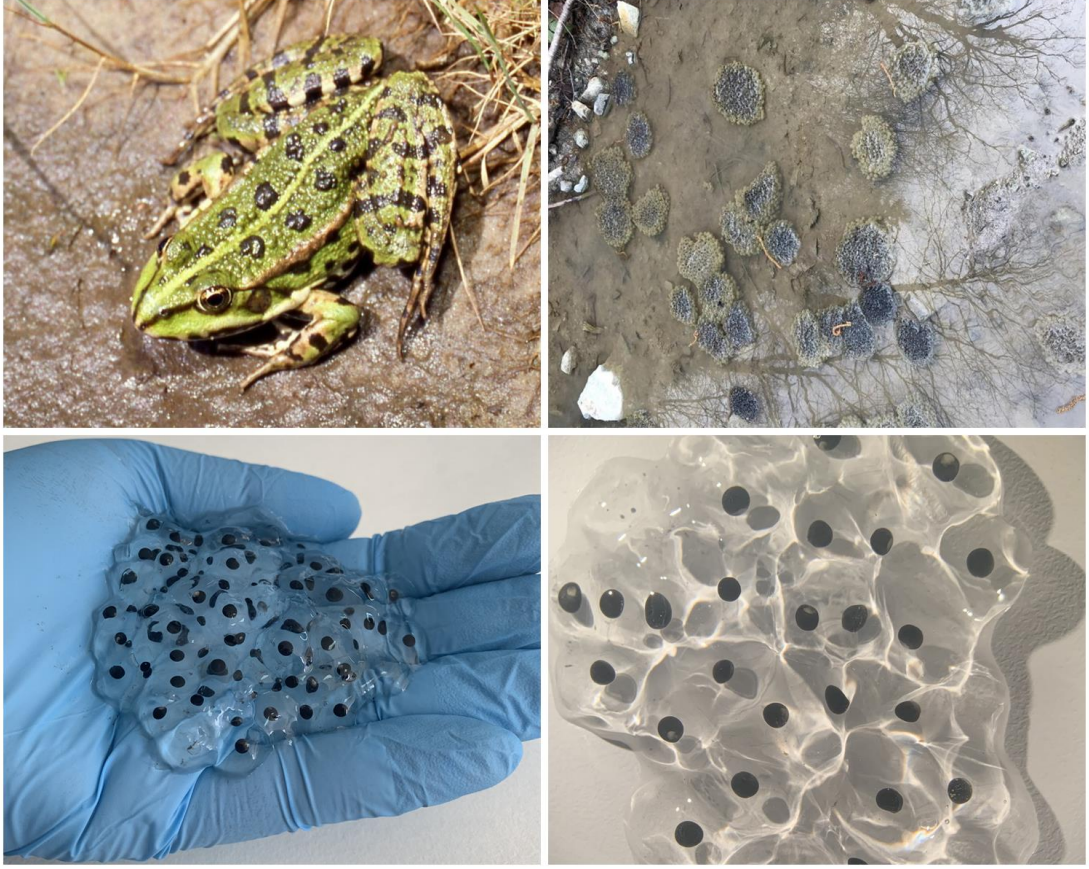
kanser üzerine denenerek etkin bir biyoaktivite sergilediği ve potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceği ortaya konmuştur.



3. MALZEME VE YÖNTEM

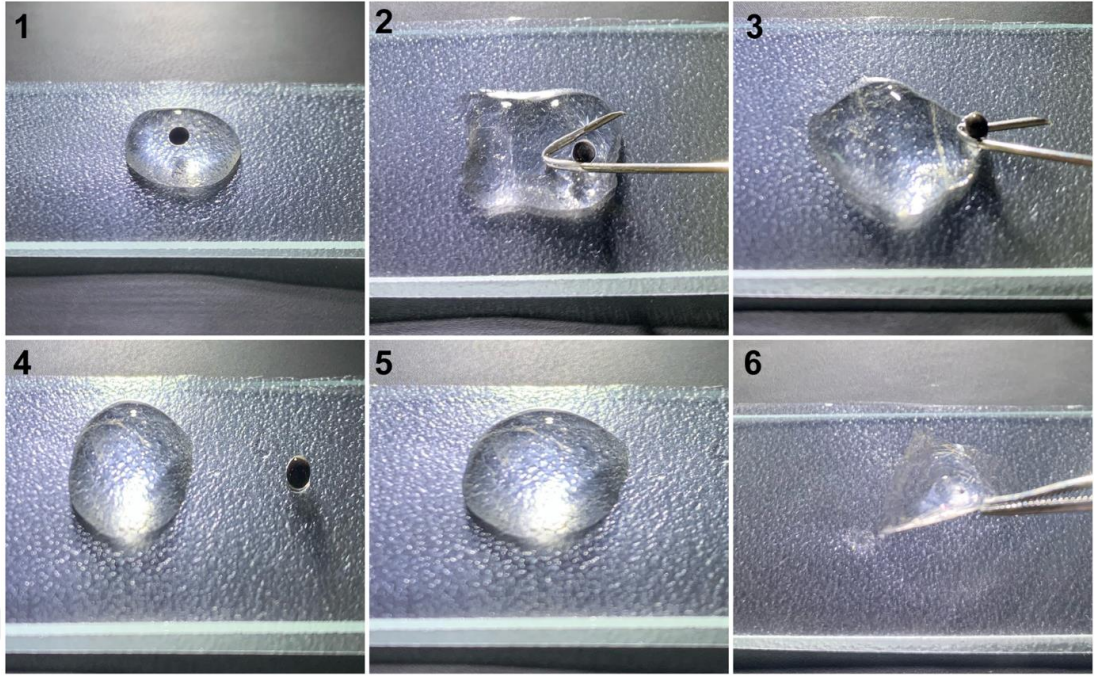
3.1 *P. ridibundus* Yumurtalarının Toplanması ve Hazırlanması

Rize ili ve çevresinden, yapılan arazi çalışmaları sonucunda *P. ridibundus* yumurta kümeleri toplanmış ve olası kontaminasyonlara karşı % 96'lık etil alkolde fikse edilerek tez çalışması için saklanmıştır. *P. ridibundus*, toplandığı dere yatağı, yumurta küreleri ve optik mikroskop görüntüsü Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *P. ridibundus*, türünün genel görünüşü, doğal ortamındaki yumurta kümeleri, embriyo ve jelin genel ve mikroskop altındaki görüntüsü.

Yumurta jel örnekleri önce distile su, sonrasında alkol ile yıkanarak üzerindeki olası toz ve kirlere arındırılmıştır. Şekil 3.2'de gösterilen basamaklar izlenerek jel örnekleri önce embriyosundan ayrıştırılmış ve sonrasında oda sıcaklığında kurutulmuştur.



Şekil 3.2. Amfibi yumurta jel örneklerinin embriyodan ayrılması ve kurutulma süreci.

3.2 Fizikokimyasal Karakterizasyon

3.2.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR)

Moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçerek fonksiyonel gruplarını belirlemek ve etkinliklerini incelemek için Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy analizi gerçekleştirildi. Amfibi jel örneklerinin IR spektrumları, 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında 8 cm^{-1} çözünürlükte, ATR cihazıyla donatılmış Perkin-Elmer Spektrum İki FT-IR spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Termogravimetrik analiz (TGA)

Termogravimetrik analiz bir numenin kütlesinin, sıcaklığa ve zamana göre ölçümüdür. Termogravimetrik analiz ile kurbağa jeli örneklerinin termal stabilitesi, yapılarındaki su ve kül içeriği Exstar-TG/DTA 7300 cihazı ile tespit edilmiştir. 5 mg jel örneği platin kefe yardımıyla cihaza yerleştirilmiştir. Jel örneklerinin TGA analizi, 30-1000 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkları arasında 10 $^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızında ve azot atmosferi altında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu malzemelerin yüzey morfolojilerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir cihazdır. SEM ile kurbağa jel örneklerinin yüzeylerinin ve iç katmanlarının üç boyutlu görüntüleri elde edilmiştir. SEM cihazında görüntüleme öncesinde, yapısı bozulmadan dondurularak elde edilen üç boyutlu jel örneklerinin yüzeyini iletken hale getirebilmek için, Cressington sputter coater 108 auto (Ted Pella, Inc.) cihazı kullanılarak yaklaşık 10 nm’lik altın/paladyum materyali ile kaplama yapılmıştır. SEM görüntüleri, Fei marka Quanta FEG 250 model cihazı kullanılarak 5 kV değerinde, 100X, 500X ve 1000X büyütme değerlerinde kaydedilmiştir.

3.2.4 Enerji dağılım spektrometresi (EDX)

Elektron tabancasından üretilen ve yüksek voltaj altında hızlandırılan elektronlar kurbağa jel örneğinin atomları ile etkileşimi sonrasında oluşan karakteristik X-ışınları EDX dedektöründe toplandığında enerji dağılımına göre bir spektrum oluşur. Böylece jel örneğinin hangi bileşenlerden oluştuğu kalitatif olarak belirlenmiş olur. Kurbağa jel örneğinin enerji dağılımlı X-ışını spektrumları SEM cihazı kullanılarak incelenmiştir. Analizlerde, Ametek Edax marka Octane Pro model EDX dedektörü kullanılmıştır.

3.2.5 X-ışını kırınım difraksiyonu (XRD)

Bilindiği üzere biyomalzemelerin kullanım alanlarını etkileyen en önemli parametrelerden biriside kristal yapısıdır. X-ışını kırınım difraksiyonu, kristal fazların kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak X-ışınları karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır. Bu analiz ile *P. ridibundus* jel örneklerine ait spektrumdaki pik değerleri belirlenmiştir. Ayrıca bu piklerin şiddetlerinden yararlanarak jel örneklerinin % kristalinitesi hesaplanmıştır. Jel örneklerinin X-ışını difraksiyon (Bruker AXS D8 Advace) analizleri 2θ da 5°-45° tarama açısı aralığında 40 kV ve 30 mA’da yapılmıştır. Denklem 3.1 dikkate alınarak kristalinite hesaplanmıştır.

$$CrI100 = [(I110 - I_{am})/I110] \times 100 \quad (3.1)$$

$CrI = \% \text{ kristalinite değeri}$, $I_{110} = 2\theta \text{ } 20^\circ \text{ deki maksimum şiddet değeri}$, $I_{am} = 2\theta \text{ } 13^\circ \text{ de amorf pikinin maksimum şiddet değeridir.}$

3.2.6 Elementel analiz

Kurbağa jel yapısında bulunan Karbon, Kükürt, Nitrojen, Oksijen ve Hidrojen elementlerinin içeriklerinin belirlenmesi için Thermo Scientific Flash 2000 elementel analiz cihazı kullanılmıştır. Yüksek sıcaklıklarda yakma tekniği ile çalışan elementel analiz cihazına, yaklaşık 2 mg tartılan jel örneği yerleştirilerek oksijen ortamında 950-1000 °C aralığında yakılmıştır. Bu sırada açığa çıkan gazlar kolonlarda tutulur ve tartılan jel örneğinin kütlesi ile kolonlarda tutulan elementlerin kütleleri arasındaki oran hesaplanarak element yüzdeleri yüksek hassasiyette belirlenmiş olur.

3.3 Karbohidrat Konsantrasyonunun ve Profilinin Belirlenmesi

3.3.1 Dubois yöntemi ile konsantrasyonun belirlenmesi

Fenol-sülfürik asit metoduna (Dubois) göre yapılmıştır (DuBois vd., 1956). Kurbağa jelinden 1 mL alınarak üzerine % 80'lik fenol (25 µL) ve H₂SO₄ (2,5 mL) eklenen numune, su banyosunda (30 °C) 15 dakika bekletilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerin, UV spektrofotometre kullanılarak 490 nm dalga boyunda ölçümleri alınmıştır. Jel örneklerinin, oluşan gradyant sarı rengine (açıktan koyuya doğru) bakılarak karbohidrat yoğunluğu gözlenmiştir.

3.3.2 HPLC analizi ile karbohidrat profilinin belirlenmesi

Karbohidrat profil analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC, Agilent 1260, Midland, ONT, Kanada) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0,1 g kuru kurbağa jeli metanol (HPLC dereceli) içinde homojen olacak şekilde Vortex yardımı ile çözdürülmüş ve 0,45 µm membran filtreden (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Almanya) süzölmüştür. Glukoz analizi için jel örneği RID (kırılma indeksi dedektörü) ile tespit edilmiştir. Tarama için bir Hi-plex H kolonu (8 µm, 4x250 mm, Agilent, ABD) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacimleri 10 µL ve ekstrakt konsantrasyonları 100 mg/mL olarak ayarlanmıştır ve analiz 30 °C sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Numuneler distile su içinde hazırlanmış ve enjeksiyon hacimleri 10 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hareketli faz olarak izokratik akışta su kullanılmıştır. Akış hızı 0,6

mL/dk'dır. Saf glukoz standardının 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 ve 1 mg/mL çözeltileri distile su ile hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ($R^2=0,9998$). Glukoz için LOQ değeri 0,015 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

N-asetil Galaktozamin ve N-asetil Glukozamin analizleri için jel örneği PDA 195-900 nm dedektörü kullanılarak 210 nm de ölçüm yapılarak tespit edilmiştir. Tarama için bir MetaCarb 87H kolonu (7,8x300 mm, Agilent, ABD) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak izokratik akışta 0,008N H₂SO₄ kullanılmıştır. Akış hızı 0,6 mL/dk'dır. Saf N-asetil Galaktozamin ve N-asetil Glukozamin standartlarının 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 ve 1 mg/mL çözeltileri distile su ile hazırlanarak kalibrasyon eğrileri oluşturuldu, bu değerler sırasıyla $R^2=0,9985$ ve $R^2=0,9977$ dir. N-asetil Galaktozamin ve N-asetil Glukozamin için LOQ değerleri sırasıyla 0,019 ve 0,017 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Galaktoz, Mannoz ve Ksiloz analizleri için jel örneği RID (kırılma indeksi dedektörü) ile tespit edilmiştir. Tarama için bir Hi-plex H kolonu (8 µm, 4x250 mm, Agilent, ABD) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak izokratik akışta su kullanılmıştır. Akış hızı 0,6 mL/dk'dır. Saf Galaktoz, Mannoz ve Ksiloz standartlarının 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 ve 1 mg/mL çözeltileri distile su ile hazırlanarak kalibrasyon eğrileri oluşturuldu, bu değerler sırasıyla $R^2=0,9975$, $R^2=0,9997$ ve $R^2=0,9987$ dir. Galaktoz, Mannnoz ve Ksiloz için LOQ değerleri sırasıyla 0,015, 0,018 ve 0,016 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

3.4 Protein ve Amino Asit Profilinin Belirlenmesi

3.4.1 Kjeldahl yöntemi ile ham protein belirlenmesi

Kurbağa yumurta jelinin ham protein değerini belirlemek için 1 g kuru malzemenin nitrojen içeriği belirlenmiştir (Bradstreet, 1954). Belirlenen % nitrojen değerini, % ham proteine dönüştürmek için 6,25'lik bir dönüştürme faktörü ile hesaplama yapılmıştır (Salo-väänänen ve Koivistoinen, 1996).

3.4.2 LC-MS/MS için kurbağa jeli örneklerinin hazırlanması

Kurbağa yumurta jeli örneklerinin protein içeriği ve peptid tanımlamaları Kocaeli Üniversitesi, Protein Araştırma ve Proteomik laboratuvarından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin HPLC çalışma şartlarına uygun olması açısından TCA-Aseton protokolü ile çöktürülmüştür.

3.4.3 Kurbağa jeli örneklerinin tca-aseton çöktürme yöntemi ile temizlenmesi

TCA örnekleri üzerine kurbağa jel örneğinin 1/4'ü eklenmiş ve yaklaşık 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Hazırlanan örnekler 14000 xg ve 5 dk şartlarında santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Çöken protein aseton (200 µL) ile yıkanarak tekrar aynı şartlarda santrifüj edilmiştir. Çökelen kısımda aseton kalmaması adına protein pellet 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Pellet 50 mM amonyum bikarbonat (AmBic) ve % 0,1 formik asit (FA) içerisinde çözülene kadar vorteks edilmiştir.

3.4.4 Kurbağa jeli proteininin konsantrasyon ölçümü

TCA-Aseton çöktürme yöntemi ile temizlenmiş protein konsantrasyonları Bradford Assay yöntemi ile ölçülmüştür (Bradford, 1976). 1 µL'lik yumurta jelinden elde edilen protein üzerine 19 µL distile su ile eklenerek seyreltilmiştir. Seyreltilen protein örneği üzerine 1mL Bradford Reagent (1X, Bio-Rad, ABD) eklenerek karıştırılmış ve karanlık ortamda 5 dk inkübe edilmiştir. Hazırlanan örneklerin 595 nm dalga boyunda Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak protein konsantrasyonlarının ölçümleri alınmıştır. Hesaplamalar, öncesinde 595 nm dalga boyuna göre hazırlanmış sığır serum albumin (BSA) standart eğrisi ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Her bir ölçüm 3 tekrarlı yapılmış olup, protein konsantrasyon sonuçları olarak, bu ölçümlerin ortalama değeri kaydedilmiştir.

Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) analizine geçmeden önce hazırlanan örneklerin genel profilleri sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen örnekler, genel profillerinin ve temizliklerinin ile incelenmesi için %12'lik SDS poliakrilamid jellerde yürütülmüştür. Örnekler artan konsantrasyonda yüklenerek gerçekleştirilen jeller Coomassie boyası ile boyanarak protein konsantrasyonlarının doğrulaması, bantların kalitesi ve örneğin temizliği bakımından değerlendirilmiştir.

3.4.5 SDS-PAGE protein jel elektroforezi

SDS-PAGE yöntemi ile proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrılmıştır. SDS jel, ayırma ve yükleme jeli olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. 50 mL'lik ayırma jeli hazırlandıktan sonra kendinden 1 mm aralıklı kalın ve ince camlar arasına dökülmüş ve üzerine 300 µL'lik izopropanol (IPA) eklenerek jelin yüzeyinin pürüzsüz hale

gelmesi sağlanmıştır. Polimerize olan ayırma jeli distile su ile yıkanarak IPA'dan arındırılmış ve kurutulmuştur. Polimerize olmuş ayırma jelin üstüne hazırlanan yükleme jeli dökülerek cam plakalara uygun 1 mm genişliğine sahip teflon tarak yerleştirilmiştir.

SDS jellerin yürütülmesi, Tetracell elektroforez (BioRad, USA) tanklarına cam plakalar yerleştirilerek gerçekleştirilmiştir. Yürümeye hazır hale gelebilmesi için elektroforez tanklarına 1X SDS-PAGE yürütme tamponu doldurulmuştur. Yüklenmek istenen protein özütlerinin üzerlerine, 6X yükleme tamponundan (0,5 M Tris-HCl (pH: 6,8), Gliserol (% 99,7), %10 SDS, β -Merkaptoetanol, % 0,5 (w/v), Bromphenol blue, dH₂O) 1X ayarlanıp eklenmiş ve su banyosunda 4 dk kaynatılarak (95 °C) proteinlerin ileri denatürasyonları sağlanmıştır. Daha sonra örnekler buz ortamına yerleştirilmiş ve santrifüj edilerek jel içerisindeki kuyucuklara yüklenmiştir. Jel, 180 V akım altında 60 dk boyunca yürütülmüştür. Sonrasında jel camlar arasından çıkarılarak %40 metanol ve %10 asetik asit fiksasyonu ardından Coomassie mavisi ile boyanmış ve görüntülenmiştir.

3.4.6 Kurbağa jeli protein numunelerinin kütle spektrometre analizine hazırlanması

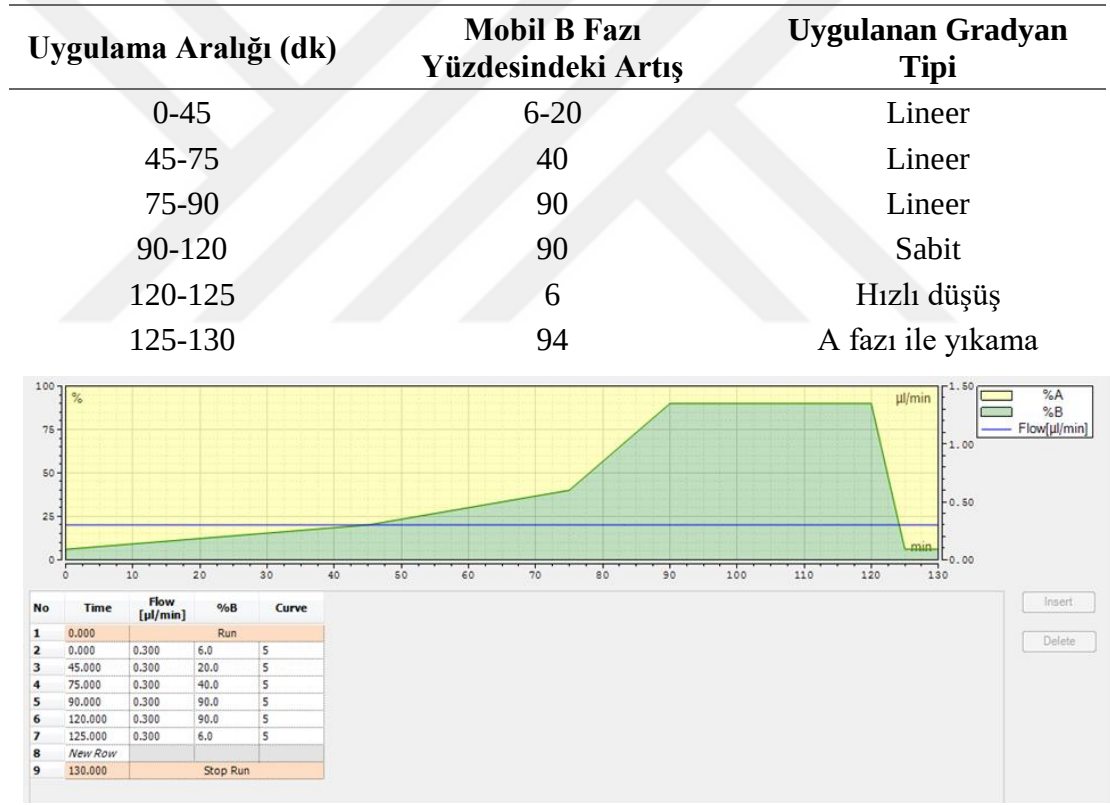
Yumurta jelinden elde edilen proteinlerin kütle spektrometresine hazırlanması için tripsin ile kesime tabi tutulmuştur. Bunun için sıvı içerisinde tripsin kesimi kiti (Insolution tryptic digestion kit, Thermo Fisher) kullanılmış ve kitin protokolü takip edilmiştir. Protokol, 95 °C'de DTT (dikloro difenil trikloroetan) ile 5 dk redüksiyon, karanlıkta oda sıcaklığında 20 dk iyodaasetamid ile alkalizasyon ve 37 °C'de 5 saat veya 30 °C'de gece boyu tripsin kesimi uygulanmasını içermektedir. Elde edilen peptitlerin konsantrasyonu Qubit 4.0 cihazı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.4.7 LC-parametreleri

Peptitlerin ayrımı Dionex Ultimate 3000 Series RSLC bir nano-pompa (Thermo Scientific, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Ultimate 3000 Series TC C-3000RS (Thermo Scientific, ABD) kolon kompartmanları ile donatılan bu pompa Dionex UltiMate 3000 Series RS (Thermo Scientific, ABD) oto-örnekleme ünitesine bağlıdır. Yazılım olarak Xcalibur 4.0 (Thermo Scientific, ABD) kullanılmaktadır. Örnekler, 5 mm × 300 μ m

i.d., 5 µm, 100 Å boyutlarındaki bir C18 materyali içeren yakalama kolonuna dakikada 5 µL hızla ve % 0,05 (v/v) trifloroasetik asit ve % 1 asetonitril içeren çözelti yardımı ile yüklenmiştir. Örnek yakalama kolonu sonrasında boyutları 15 cm × 75 µm olan ve 2 µm, 100 Å çapında C18 materyali ile paketlenmiş Acclaim PepMap RSLC (Thermo Scientific, ABD) analitik bir kolona aktarılmış ve peptit elüsyonu iki farklı mobil faz (A ve B) kullanılarak yapılmıştır. Mobil faz A HPLC kalitesinde su ile hazırlanmış % 0,1 (v/v)'lik formik asit içerirken mobil faz B HPLC kalitesinde su ile hazırlanmış % 0,1 (v/v)'lik asetonitril içermektedir. Peptitler 130 dk süreyle ve dakikada 0,3 µL akış hızıyla ayrıştırılarak kütle spektrometresine (Thermo Q-exactive) gönderilmiştir. Elüsyon için uygulanan gradyan adımları Çizelge 3.1'de verildiği gibidir.

Çizelge 3.1. nHPLC'de analitik kolona uygulanan mobil fazların gradiyentleri.



Her bir analizde sıcaklık 40 °C'de 2 µL enjeksiyon yapılmıştır. Isıtılmış bir elektrosprey iyonizasyon kaynağı ile peptitlerin pozitif yük okuma modunda iyonizasyonu sağlanmıştır. Kullanılan cihaz parametreleri, +2,3 kV, 300 °C kapiler sıcaklığı, sheet gaz ve auxiliary gaz akışı 50 ve 30 unite civarında tutulmuş ve S ve RF lens seviyeleri 50'ye ayarlanmıştır. Sürekli nano akış ile kolondan geçen örnekler,

iyonlaştırılıp LC-MS/MS analizine tabi tutulmuştur. Her bir parent iyon için TOP10 MS/MS analizi gerçekleştirilmiştir.

3.4.8 Peptid ve protein tanımlama

Proteom Discoverer 2.2 (Thermo Scientific, ABD) yazılımı kullanılarak, LC-MS/MS analizi ile elde edilen verilerin protein tanımlamaları yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan parametreler, peptid kütle tolerans değeri 10 ppm, MS/MS kütle tolerans değeri 0,2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, tolere edilen yanlış kesim 1, minimum peptid uzunluğu 6 amino asit, sabitlenmiş değişimler sisteminin karbamidometilasyonu, sabit olmayan değişimler metiyonin oksidasyonu ve asparajinin deaminasyonu olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir protein için tanımlanan minimum peptid sayısı 2 olarak kabul edilmiş ve veriler uniprot/swissprote veritabanında bulunan organizma özel verilere göre araştırılmıştır. Proteom Discoverer 2.2 uzantısı olan Gene Ontology verilerine göre proteinlerin fonksiyonel ve biyolojik gruplandırılması yapılmıştır.

3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

İnsan deri melanom kanser hücrelerinde türetilen A-375 hücre hattı (ATCC No. CRL-1619), % 10 FBS (Fetal Sığır Serum), % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM yüksek glukoz besiyerinde (Sigma, Katalog No. D6429) kültür edilmiştir. Sağlıklı insan deri fibroblast hücre hattı (PCS-201-012) Bullet Kit ile (Lonza, Katalog No. CC-3249) kültür edilmiştir. İki hücre hattı 37°C’de % 5 CO₂’li ortama sahip inkübatörde kültür edilmiştir.

3.5.1 MTT yöntemi

Hücre kültürü esasına dayanan bir yöntem olan MTT analizi, indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bu analiz, farklı kurbağa jeli konsantrasyonlarının hücre canlılık oranına etkisi ve IC₅₀ değerlerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Jel konsantrasyonları (10:1 mg/mL jel konsantrasyonunu, ardışık numaralar (2-7) ½’lik dilüsyonları) ile kanser ve normal hücre hattı literatür bilgilerine uyumlu olarak belirli sürelerde (24-72 saat) inkübe edildikten sonra, bu analizin protokolü uygulanmıştır. Buna göre, 96 kuyucuklu plakalara, iki hücre hattı için de 1×10^4 hücre ekimi 100 µL besiyeri içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün besiyeri uzaklaştırılarak ve hücreler belirlenen doz ve

zamanlarda jel ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri ortamdan alınarak, kuyucuklara 100 µL taze besiyeri eklenmiş ve üzerine 10 µL MTT (5 mg/mL) solüsyonundan eklenmiştir. Üç saat 37 °C’de inkübasyon sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve formazan kristallerinin çözünmesi için 100 µL DMSO eklenmiştir. Plaka okuyucuda 570 nm’de absorbans okunarak, yüzde canlılık Denklem 3.2’e göre hesaplanmıştır. Yalnızca besiyeri içeren kontrol gruplarındaki canlılık % 100 kabul edilmiş olup, hücresiz besiyeri karışımı ise blank olarak kullanılmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = ((A_{\text{örnek}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blank}})) \times 100 \quad (3.2)$$

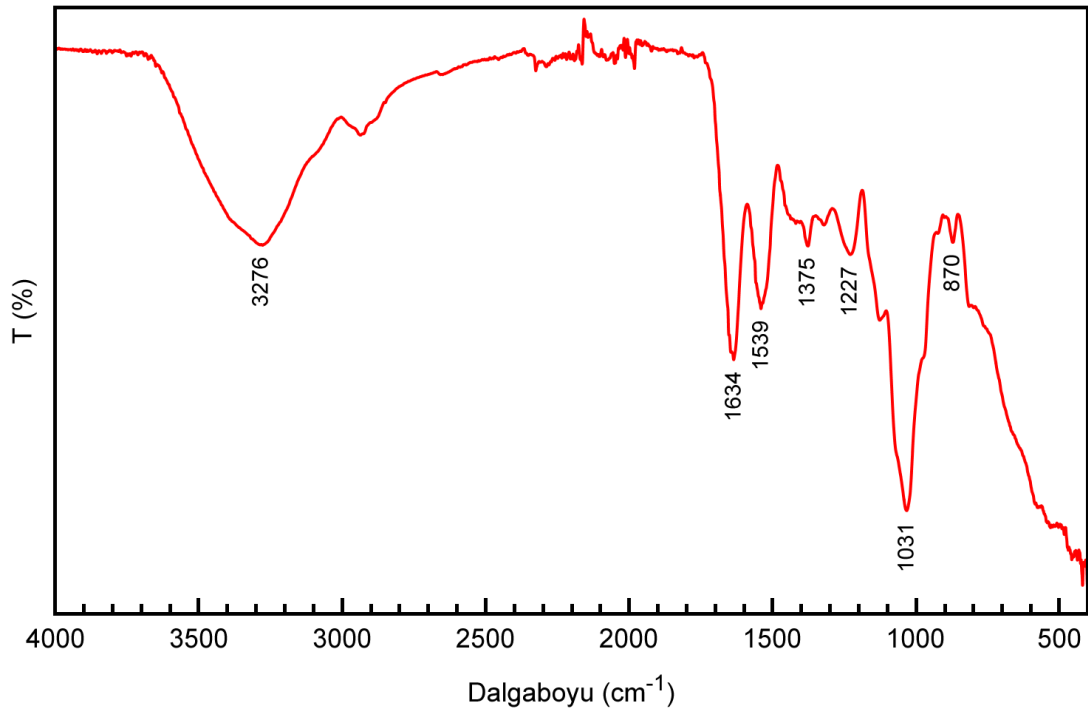
3.5.2 xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile hücre proliferasyonun belirlenmesi

A-375 ve sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri, kuyu başına belirlenen uygun konsantrasyonlarda (1×10^4) 100 µL’lik besiyeri olan plakalara (16 adet kuyu, ACEA Biosciences, San Diego, CA) ekilmiş ve xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı ile izlenmiştir. Hücreler log fazına girdiği zaman kuyulara 10 mg/mL ve seri dilüsyonlarına ait konsantrasyonlarında kurbağa jeli eklenmiştir. Çalışmada uygulama materyali içermeyen kontrol grubu da kullanılmış ve bu gruba göre değerlendirilmiştir. Hücrelere 96 saat jel malzemesi ile muamele edilmiş ve 37 °C’de % 5 CO₂’li ortama sahip inkübatörde proliferasyonları 15 dk aralıklarla takip edilmiştir. IC₅₀ değerlerini ve zamanı hesaplamak için RTCA Software Lite yazılımı kullanılmıştır. Bu bağlamda, kurbağa jelinin melanoma hücre hattındaki anti-proliferatif etkisi ve insan deri fibroblast hücre hattındaki sitotoksitesisi label-free yöntemle değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 FT-IR

Moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçerek moleküldeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi elde etmek amacıyla kurbağa yumurta jeline FT-IR analizi uygulanmıştır. *P. ridibundus* yumurta jeli için kaydedilen FT-IR spektrumu Şekil 4.1’te gösterilmiştir. Proteinler için Amide absorpsiyon bantları karakteristiktir (Martínez vd., 2017). Amid pikleri, polipeptit omurgası kaynaklı kendini gösterir ve proteinin yapısına duyarlıdır. Bu pikler Amide I için $1600-1700\text{ cm}^{-1}$, Amide II için $1504-1582\text{ cm}^{-1}$ ve Amide III için $1200-1300\text{ cm}^{-1}$ dalga boylarında kendini göstermektedir (Martínez vd., 2017). *P. ridibundus* yumurta jeli için Amide I bandı 1634 cm^{-1} olarak kaydedilmiştir. C=O esnemesi kaynaklı bu Amide I piki aynı zamanda proteinlerin sekonder yapısını belirlemek için yol gösterici piklerdir (Jena vd., 2018). Yumurta jeli için Amide II bandı 1539 cm^{-1} olarak kaydedilmiştir. Burada kaydedilen pik N–H bükülme ve C–N gerilme titreşimleri kaynaklı kendini göstermektedir (Jena vd., 2018). Jel örneği için kaydedilen Amide III bandı ise 1227 cm^{-1} olarak kaydedilmiştir ve bu pik düzlem içi NH– bükülme titreşimi ile birleştirilmiş CN esneme titreşiminden kaynaklanmaktadır (Jena vd., 2018). Kaydedilen tüm bu bandlar kurbağa yumurta jel yapısının protein içerdiğini desteklemektedir. $1610-1640\text{ cm}^{-1}$ aralığında kaydedilen Amide I bandı antiparalel β -tabaka için karakteristiktir (Wilson vd., 2000; Teramoto ve Miyazawa, 2005; Hu vd., 2006; Martínez vd., 2017). 1634 cm^{-1} ’te kaydedilen Amide I bandı, kurbağa yumurta jelindeki proteinlerin sekonder yapısında β -tabaka varlığını destekler niteliktedir. β -tabaka yapısının malzemeye güçlü mekanik özellikler kazandırdığı daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Keten vd., 2010; Chan vd., 2020). Bu güçlü mekanik özellikler sayesinde kurbağa yumurta jelinin kirli sucul ekosistemde ve zorlu çevre koşullarında, yapısının bütünlüğü bozulmadan embriyoyu nasıl koruduğu anlaşılabilmektedir. Kaydedilen 1031 cm^{-1} piki yapıdaki polisakkarit halkalarını temsil etmektedir. Bu pik, glikozidik bağın gerilme titreşimleriyle örtüşen halka titreşimleri ve C–O–C bağına karşılık gelen pikler şeklinde yorumlanabilmektedir (Chylińska vd., 2016). Spektrumda 3276 cm^{-1} olarak kaydedilen geniş pik absorbe edilmiş suyun moleküller arası hidrojen bağı ile bağlı OH grubunun titreşimi ve N–H gerilmesinin üst üste binmesi kaynaklı olabilmektedir (Pourjavadi vd., 2006).

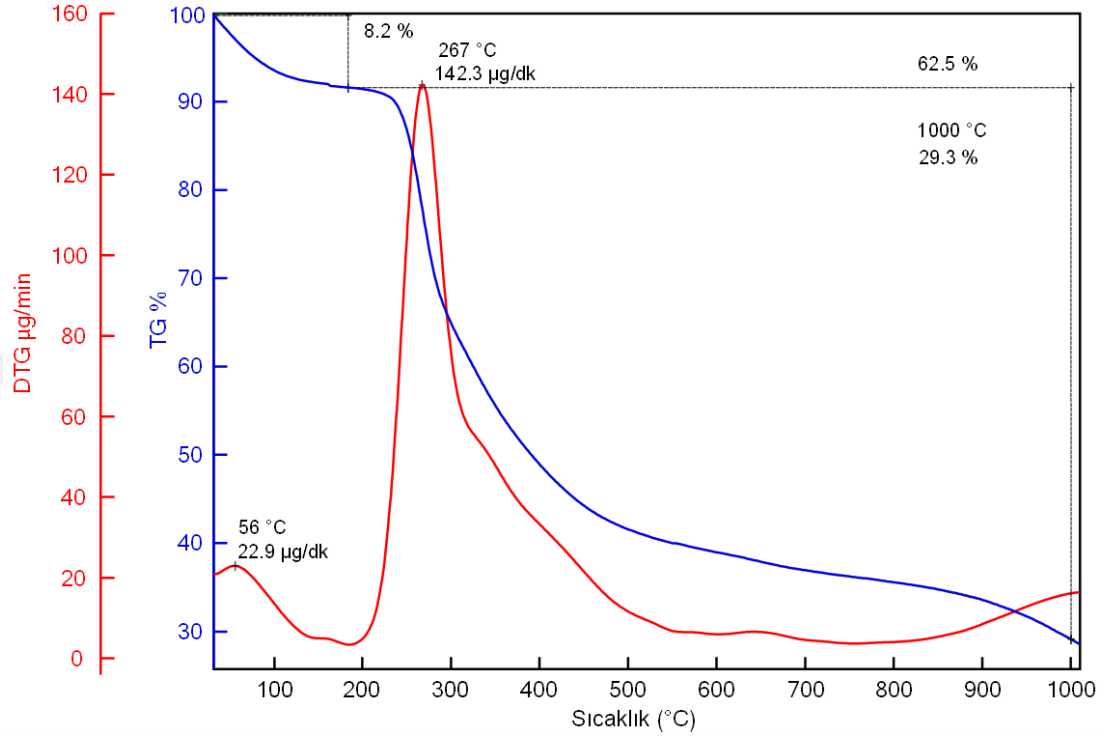


Şekil 4.1. Yumurta jel örneğine ait FT-IR analiz sonucu.

4.2 TGA

Kurbağa yumurta jelinin, termal stabilitesi ile yapısındaki su ve kül içeriğini analiz etmek için TGA analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz jel numunesinin kütlesinin, sıcaklığa ve zamana göre ölçülmüştür. *P. ridibundus* yumurtası jeline ait TG/DTG analiz sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Termogramda net olarak 2 bozunma piki gözlemlenmiştir. 0-150 °C arası kaydedilen ilk bozunma piki moleküller arası sıkışmış su moleküllerinin yapıdan uzaklaşmasını temsil etmektedir (Wiedemann ve Larnprechth, 1999). Burada DTG_{max} 56 °C’dir ve kütle kaybı % 8.2 olarak hesaplanmıştır. Gözlemlenen ikinci bozunma piki ise 200-1000 °C arasındır. Bu pike ait DTG_{max} değeri 267 °C’dir ve bu degradasyona bağlı kütle kaybı % 62.5 olarak hesaplanmıştır. Kaydedilen bu pik protein-polisakkarit degradasyonu kaynaklıdır. Kurbağa yumurta jeli için kaydedilen bu degradasyon aralığı literatürde kollajen, keratin ve fibroin gibi diğer yapısal proteinlerin bozunma sıcaklıkları ile benzer bulunmuştur (Kakkar vd., 2014; Mekonnen vd., 2017; Dadras Chomachayi vd., 2020). Kurbağa yumurta jelinin diğer yapısal proteinlere nispeten düşük DTG_{max} sergilemesinin yapıdaki karbohidrat kaynaklı olduğunu göstermektedir (Cui vd., 2013). Buradaki degradasyon peptit bağlarının bölünmesi ve amino asit kalıntılarının yan zincir gruplarının parçalanması olarak öngörülmektedir (Freddi vd., 1999; Miyake

vd., 2003; Kundu vd., 2008). Doğal bir malzeme olan kurbağa yumurta jeli için termal stabilite oldukça yüksektir. Bu yüksek termal stabilitenin, yumurta jelinin doğada zorlu sucul ortamda varlığını sürdürebilme başarısına büyük katkısı olduğu öngörülmektedir.

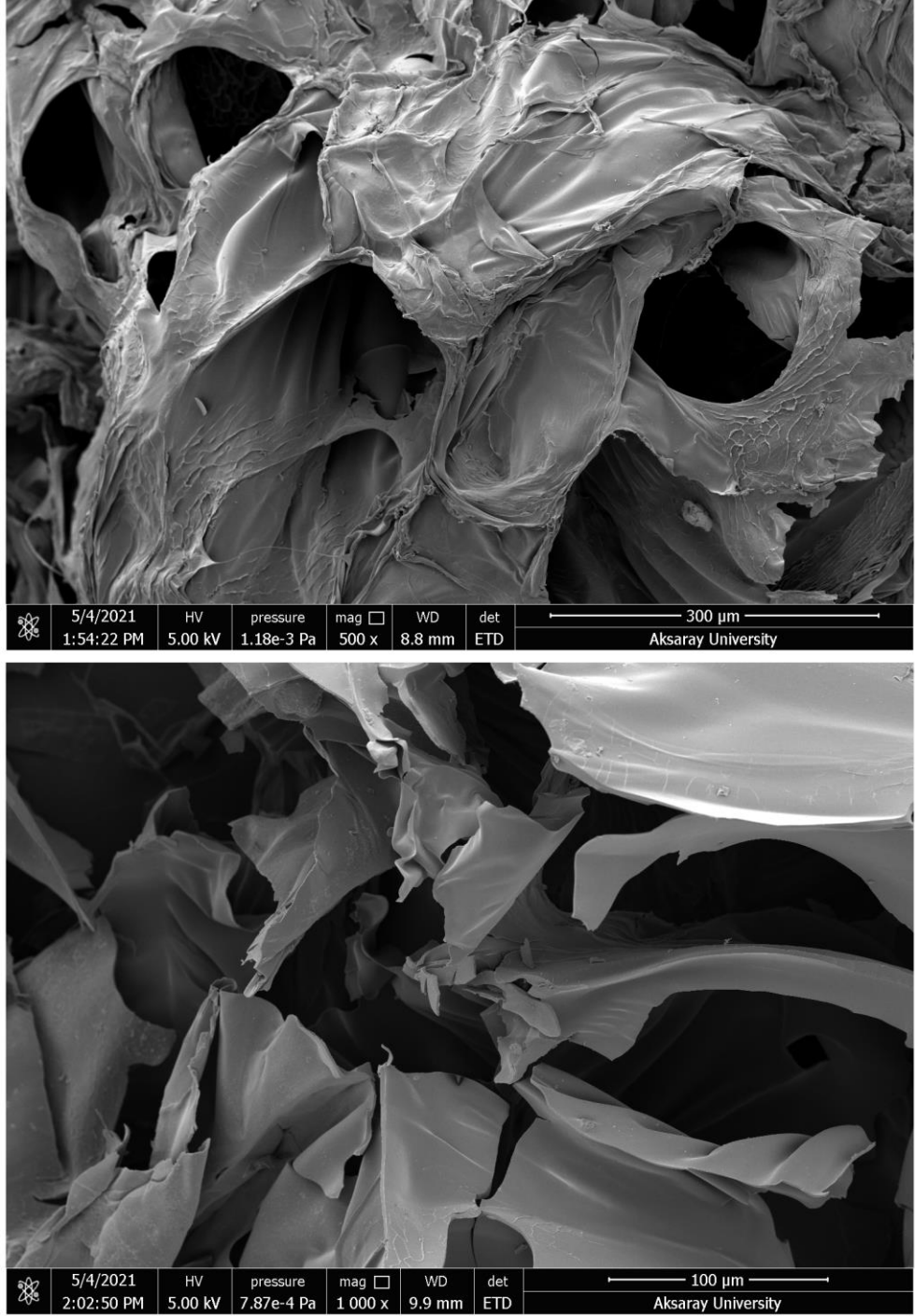


Şekil 4.2. Yumurta jel örneğine ait TGA analiz sonucu.

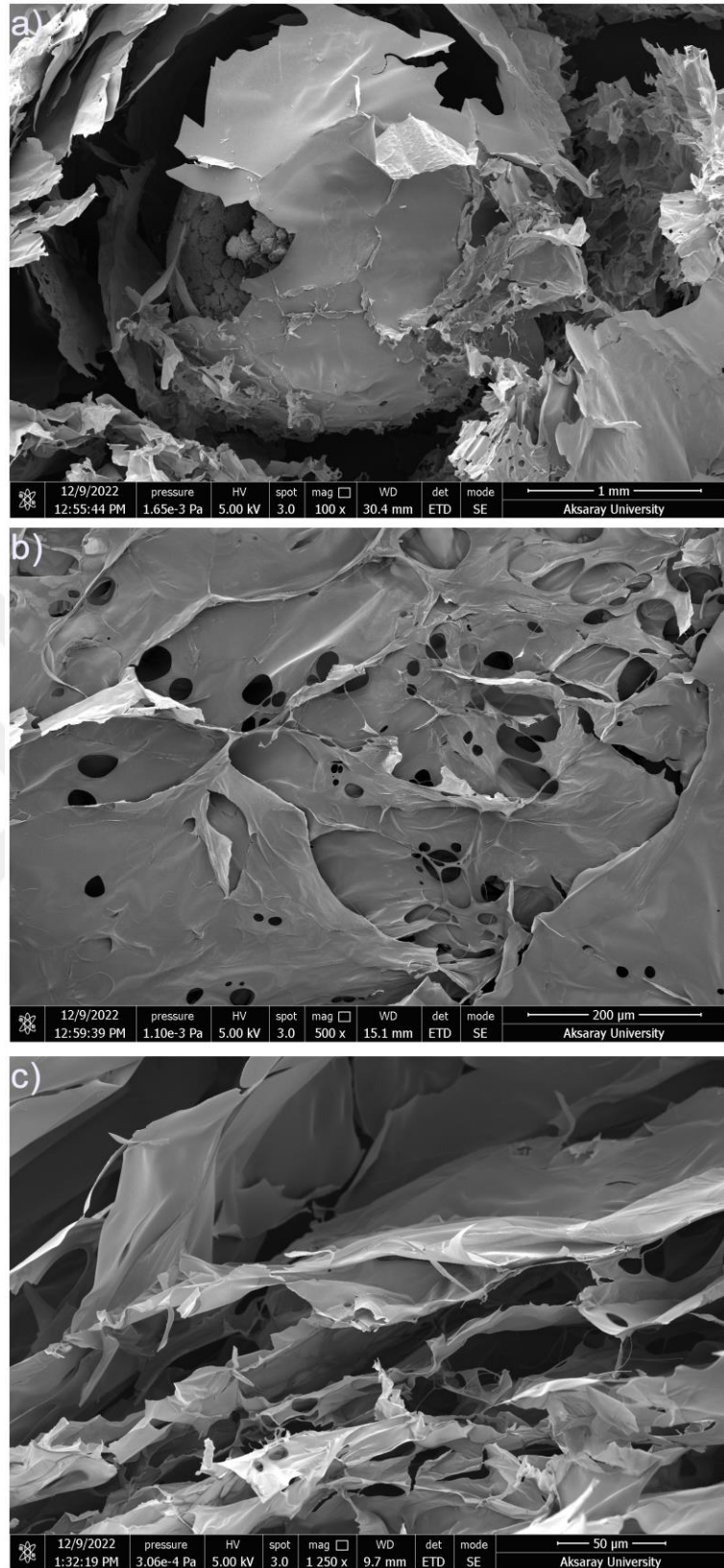
4.3 SEM

SEM analizi biyomalzemelerin yüzeylerinin üç boyutlu olarak görüntülenmesinde son derece kullanışlı bir yöntemdir. Gerçekleştirilen bu analiz ile kurbağa yumurta jel örneklerinin yüzey morfolojileri net olarak gözlemlenebilmiştir. Hem oda sıcaklığında kurutulan kompakt yapıdaki örnekler (Şekil 4.3) hem de liyofilizatör yardımıyla üç boyutlu yapı korunarak kurutulan örnekler (Şekil 4.4) SEM analizi ile incelemiştir. Her iki analizde de kaydedilen SEM görüntülerinde, *P. ridibundus* yumurta jelinin katmanlardan oluştuğu açıkça gözlenmektedir. Literatürde kurbağa yumurta jellerinin katmanlardan oluştuğu ve bu katmanların türden türe değiştiği önceki yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Yurewicz vd., 1975; Okimura vd., 2001). Bu çalışmalarda morfolojik olarak oldukça basit bir yapıda olduğu belirtilen kurbağa yumurta jellerinin hiçbir ayırt edici özelliği bulunmadığı rapor edilmiştir. *P. ridibundus* yumurta jeli için kaydedilen görüntülerde kurumuş jel katmanlarının

spesifik bir morfolojisinin olmadığı açıkça görülmektedir. Yapı oldukça düzdür ve katmanlar arası yer yer büyük gözenekler gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3. Oda sıcaklığında kurutulmuş yumurta jel örneğine ait SEM görüntüleri.

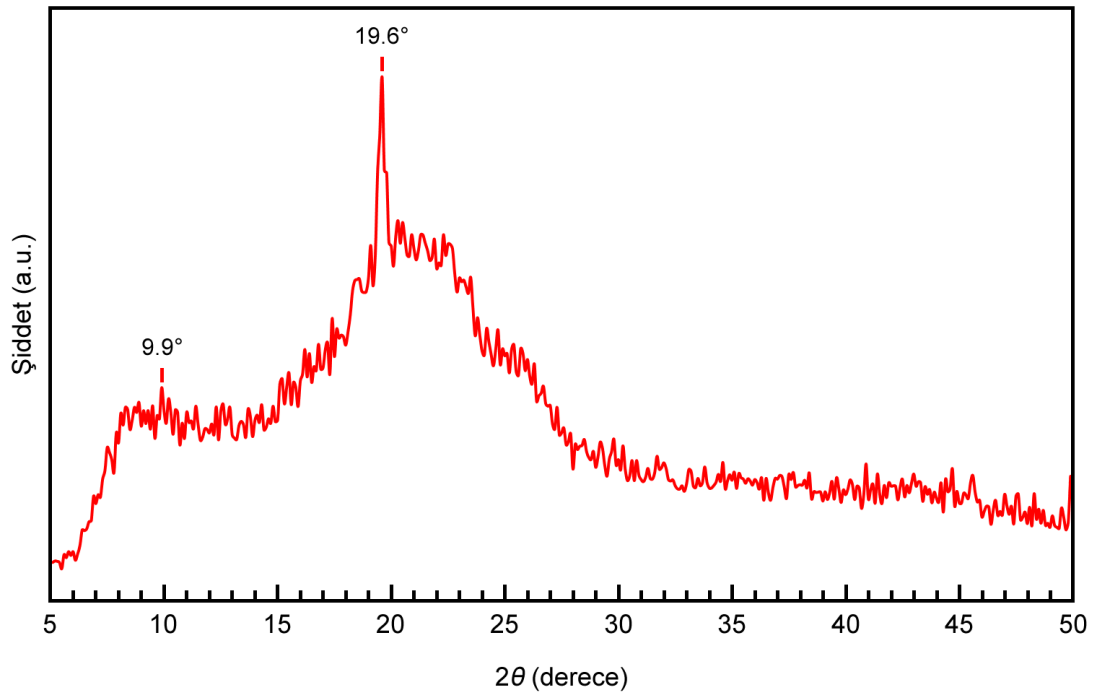


Şekil 4.4. Liyofilizatör ile kurutulmuş yumurta jel örneğine ait SEM görüntüleri: a) Yumurta jeli içerisindeki embriyo, b) Yumurta jelinin yüzey morfolojisi, c) Yumurta jelinin kesit görüntüsü.

Kurbağa yumurtalarının yumurta kanalı boyunca ilerlerken, jel katmanların yumurta etrafında biriktirilerek oluştuğu bilinmektedir (Yurewicz vd., 1975; Olson ve Chandler, 1999). Yaptığımız çalışmada liyofilizatör yardımıyla üç boyutlu yapı korunarak gerçekleştirilmiş kurutmanın ardından yumurta jel örneğindeki katmanların embriyo etrafını sardığı net olarak görüntülenebilmiştir (Şekil 4.4.a). Embriyo etrafını katmanlı olarak saran jel yapının literatürde rapor edildiği gibi fibril yapılar açısından oluştuğu da SEM görüntülerinde görülmektedir (Okimura vd., 2001). Üç boyutlu yapının korunduğu dondurarak kurutulmuş örneklerde, katmanların birbirleriyle gözenekler aracılığıyla bağlantılı olduğu yine kaydedilen SEM görüntüleri ile ortaya konmuştur (Şekil 4.4.b).

4.4 XRD

Her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine göre X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanan XRD analizi, biyomalzemelerin kristal yapısı hakkında bize bilgi vermektedir. Analiz sonucu elde edilen verilerle hesaplanan kristalinite malzemenin kullanım alanlarını etkileyen en önemli özelliklerden biridir. *P. ridibundus* yumurta jelinin kristal yapısı yapılan XRD analizi ile ortaya konmuş ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Analize göre net olarak iki keskin pik gözlemlenmiştir. Bu piklerden ilki $9,9^\circ$, diğeri ise $19,6^\circ$ olarak kaydedilmiştir. Literatürde kollajen, keratin ve ipek gibi diğer yapısal proteinler için kaydedilen piklerin $7,8-10,7^\circ$ ve $19,6-21,8^\circ$ aralığında olduğu rapor edilmiştir (Ki vd., 2007; Meng vd., 2012; Alashwal vd., 2019). Yapısının protein ve karbohidrattan oluştuğunu bildiğimiz kurbağa yumurta jeli pikleri literatürdeki yapısal proteinler için karakteristik olduğu belirtilen pikler ile uyumlu bulunmuştur. Bu iki pik protein için karakteristik iken 19° civarı kaydedilen pik aynı zamanda yapıdaki polisakkarite atfedilmektedir (Ji vd., 2018; Nuerxiati vd., 2019). Yapı tamamen protein ve polisakkaritten oluştuğu için $19,6^\circ$ piki oldukça şiddetlidir. *P. ridibundus* yumurta jeli için kristalinite % 70,23 olarak hesaplanmıştır. Bu değer doğal bir malzeme için oldukça yüksektir. Yüksek kristalinite değeri yapının mukavemeti ile orantılıdır. Yapının kristallliği arttıkça malzemenin kararlılığı artmaktadır (Van Soest ve Vliegenthart, 1997; Galeski, 2003). Bu sonuç kurbağa yumurta jelinin zorlu çevre şartları ve kirli sucul ekosistemde bütünlüğü bozulmadan embriyoyu koruyabilen güçlü bir biyomalzeme olduğunu destekler niteliktedir.



Şekil 4.5. Yumurta jel örneğine ait XRD analiz sonucu.

4.5 Elementel Analiz ve EDX

Kurbağa yumurta jel örneğinin element içeriği ve profilini belirlemek için elementel analiz gerçekleştirilmiştir. Elementel analizi desteklemek ve element profilini doğrulamak için kalitatif analiz imkânı sunan EDX analizi yapılmıştır. Her iki analizden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yumurta jel örneğinin Elementel ve EDX analiz sonuçları.

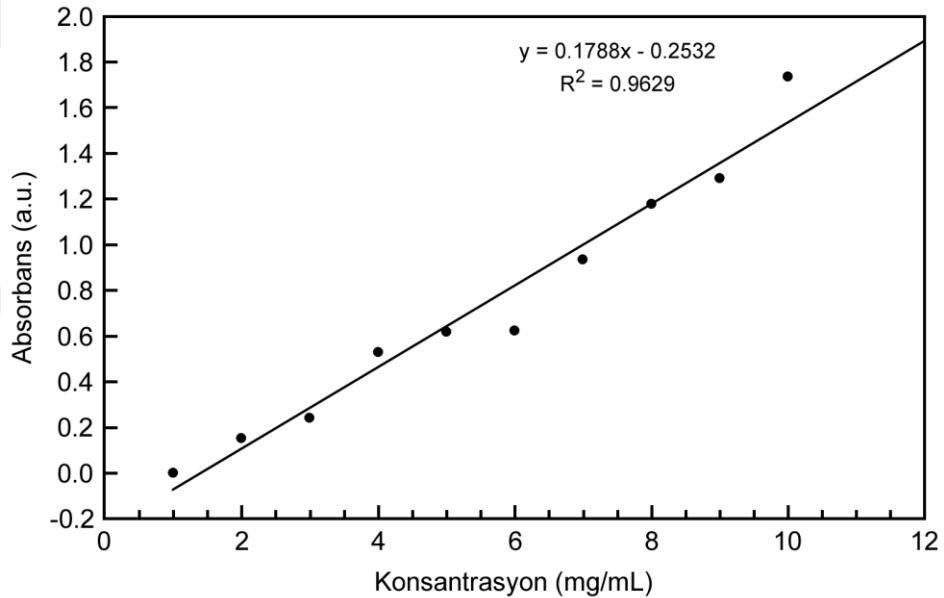
Elementel Analiz	% N	% C	% H	% S
	5,46	36,84	5,36	1,33
% Ağırlık				
EDX Analizi	C K	N K	O K	S K
	51,00	7,66	34,11	5,48

P. ridibundus yumurta jelinin elementel profilinin nitrojen, karbon, hidrojen ve sülfür den oluştuğu iki analiz ile de net olarak ortaya konmuştur. Analizlere göre yumurta jelinin element bileşimi % 5,46 nitrojen, % 36,84 karbon, % 5,36 hidrojen ve % 1,33 sülfür olarak belirlenmiştir. Bu elementlerin varlığı yapılan EDX analizinde EDAX dedektörü ile teyit edilmiştir. Profilde tespit edilen elementlerin miktarları literatürde

daha önce tanımlanmış yapısal proteinler olan serisin, fibroin ve yapısal bir karbohidrat olan kitosan ile yakın bulunmuştur (Chen vd., 2011; Wang vd., 2011; Bilican vd., 2020). C ve N yüzdelilerindeki farklılıklar proteinin konumuna ve kimyasal yapısına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Jena vd., 2018).

4.6 Karbohidrat Miktar Tayini ve Profili

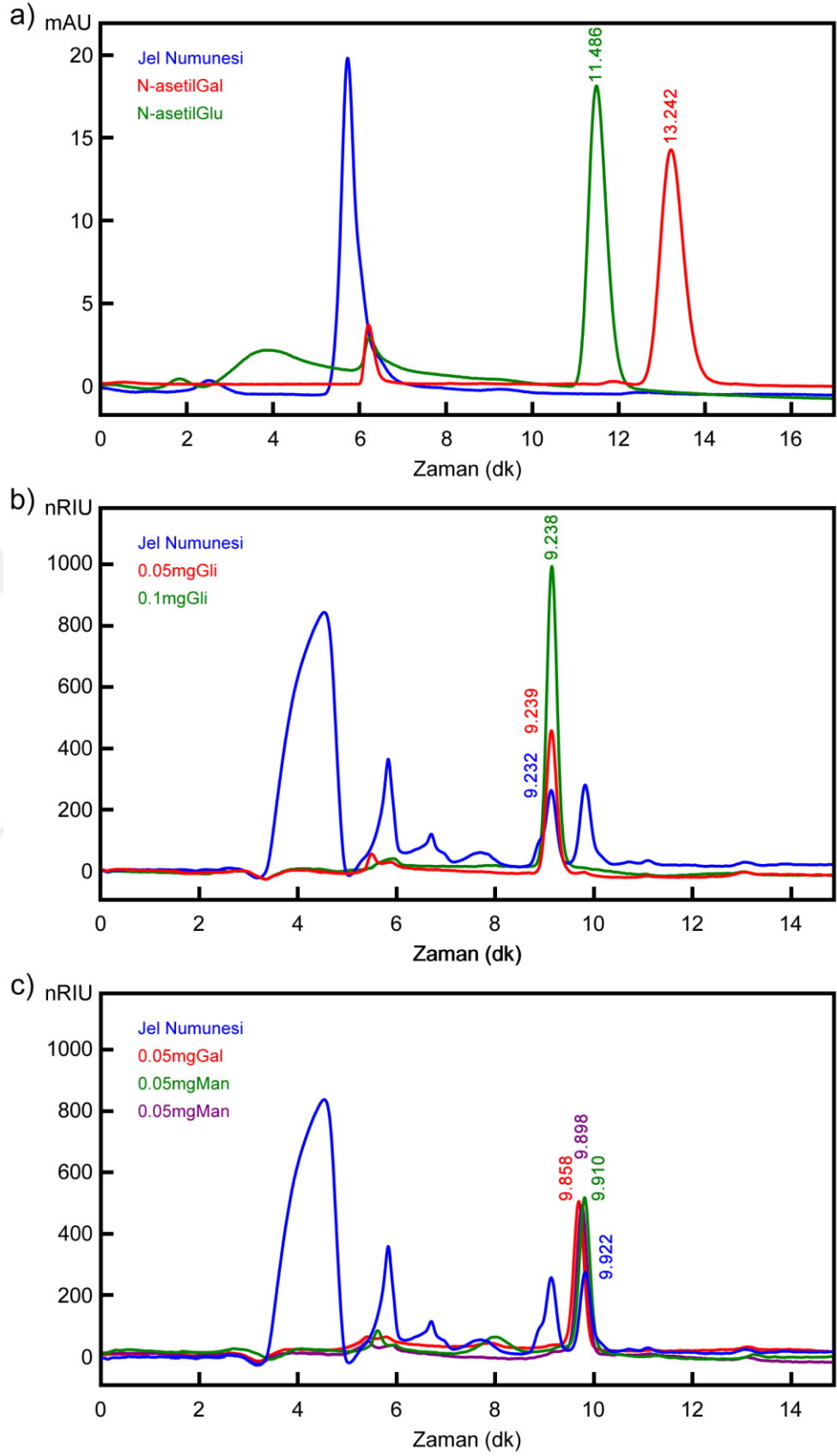
Standart glikozdan 0,5-10 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Numunelerin rengi içerdikleri karbohidrat miktarına bağlı olarak açık sarıdan koyu sarıya doğru değişmiştir. Çözeltiler, UV Spektrofotometre’de 490 nm dalga boyunda okunmuştur ve okunan absorbans değerlerine karşı standart kalibrasyon eğrisi çizilmiştir ve Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Absorbans değerlerine karşı elde edilen standart kalibrasyon eğrisi.

Dubois yöntemi ile yapılan deneyde elde edilen veriler ve standart grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak karbohidrat konsantrasyonu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçta *P. ridibundus* yumurta jelinin $96,43 \pm 0,024$ µg/mL karbohidrat konsantrasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen HPLC analizinde, literatürde belirtilen ve kurbağa yumurta jelinin içerdiği öngörülen Glukoz, Mannoz, Ksiloz, Fukoz, Galaktoz, Galaktozamin ve Glukozamin şekerlerinin varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.7).

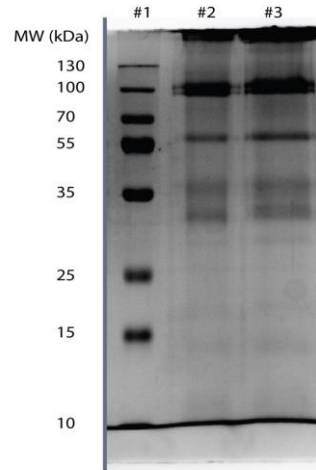


Şekil 4.7. Yumurta jel örneğinin HPLC spektrumu: a) N-asetil Galaktozamin ve N-asetil Glukozamin, b) Glikoz c) Galaktoz, Mannoz ve Ksiloz şeker standartları.

Elde edilen kromatogram da Glikoz, Galaktoz, Mannoz ve Ksiloz şekerlerinin varlığı tespit edilmiştir. Varlığı tespit edilen bu basit şekerlerin varlığı daha önce literatürde amfibi yumurta jelinde tespit edilen şekerler ile uyumlu bulunmuştur (Schulz ve Becker, 1935; Folkes vd., 1950; Lee, 1967). Bunlara ek olarak serbest glikoz miktarı da belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda *P. ridibundus* yumurta jelinin $0,28 \pm 0,01$ mg/mL serbest glikoz içerdiği ortaya konmuştur. Galaktoz, Mannoz ve Ksiloz şekerleri için sadece varlığı tespit edilme sebebi, Şekil 4.7c'den de görüldüğü üzere şekerler aynı alıkonma zamanında çıkmaktadır ve mevcut sistemde bu üç şekerin birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün olmamasıdır. Literatürde Galaktoz, Mannoz ve Ksiloz şekerlerinin varlığından bahsedilmektedir. Yumurta jel örneğinin alıkonma zamanının bu üç şekerle kesişmiş olması literatür bilgilerini desteklemektedir.

4.7 Protein Miktar Tayini ve Profili

Kjeldahl analizi ile % ham protein miktarı, analizle elde edilen % N miktarının 6.25'lik bir dönüşüm faktörü kullanılarak hesaplanması ile belirlenmektedir. Bu hesaplama göre analiz sonucunda *P. ridibundus*'un yumurta jelinin % 26.65 protein içerdiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak total protein konsantrasyonunu belirlemek için Bradford analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8).



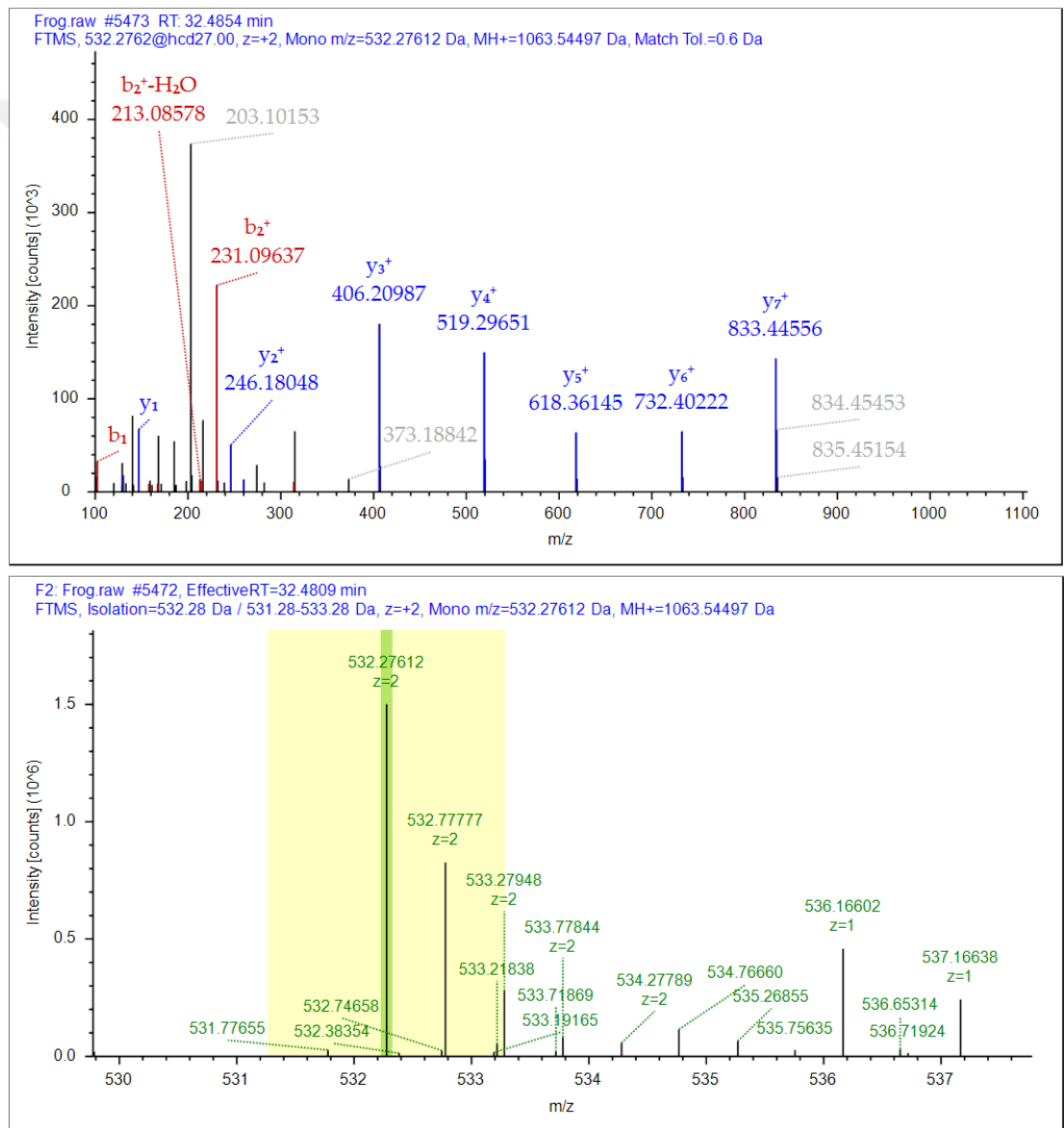
#1 Marker (PageRuler™ Plusg Prestained Protein Ladder 26619)
#2 20 µg protein
#3 40 µg protein

Şekil 4.8. Yumurta jel örneğinin SDS-PAGE analiz sonucu.

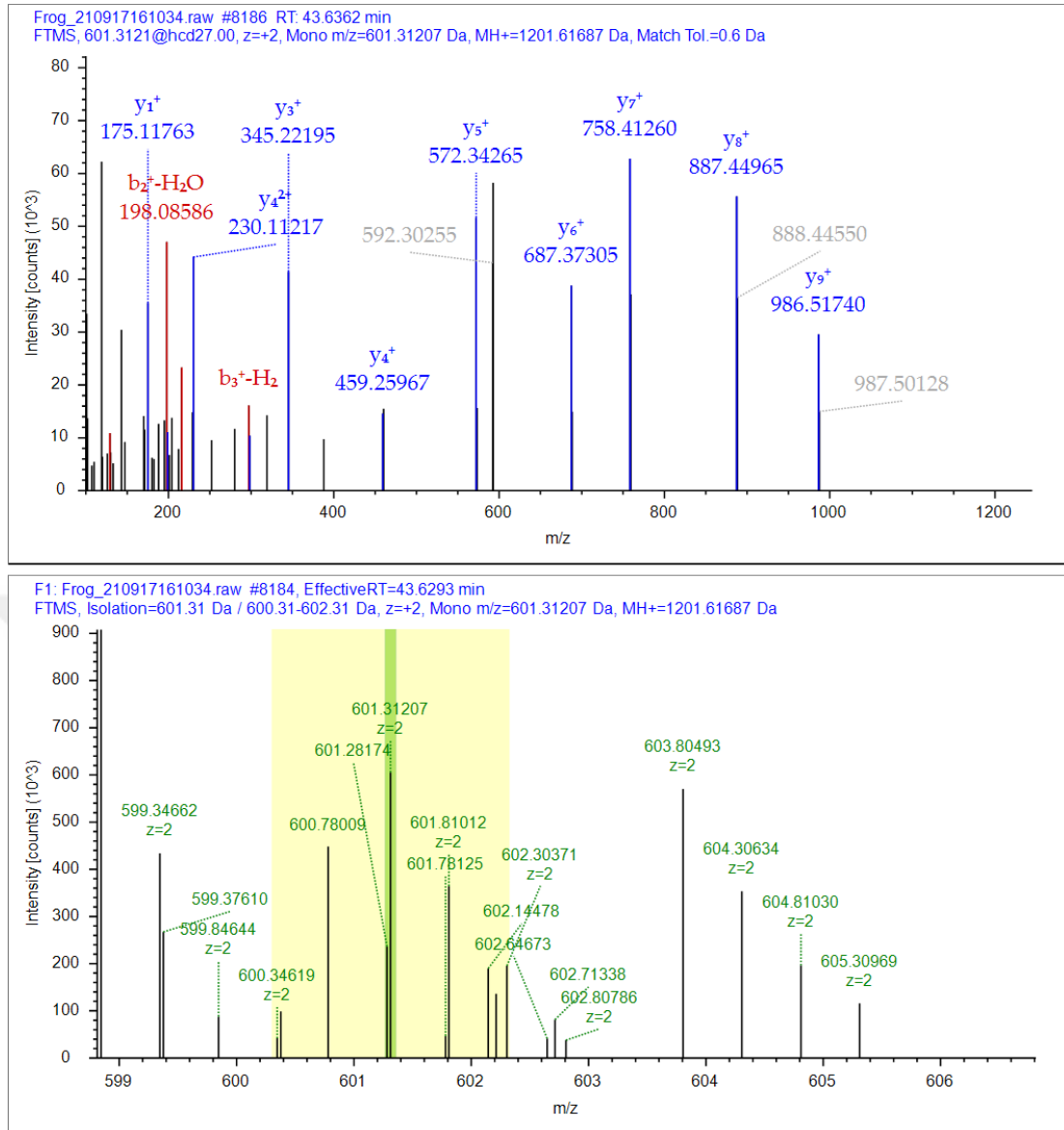
Gerçekleştirilen analiz sonucunda 1µL *P. ridibundus* yumurta jeli örneğinde total protein miktarı 2.4 µg olarak tespit edilmiştir. Burada izole edilen protein örneklerinin

genel profillerinin ve örnek temizliğinin incelenmesi için %12'lik SDS poliakrilamit jellerde yürütülmüştür (SDS-PAGE). Örnekler jelle artan konsantrasyonlarda yüklenmiş ve jeller Coomassie boyası ile boyanarak protein konsantrasyonlarının doğrulanması yapılmıştır. Elde edilen görüntüde bantların kalitesi ve izole edilen protein örneğinin temizliği net olarak gözlenmiştir.

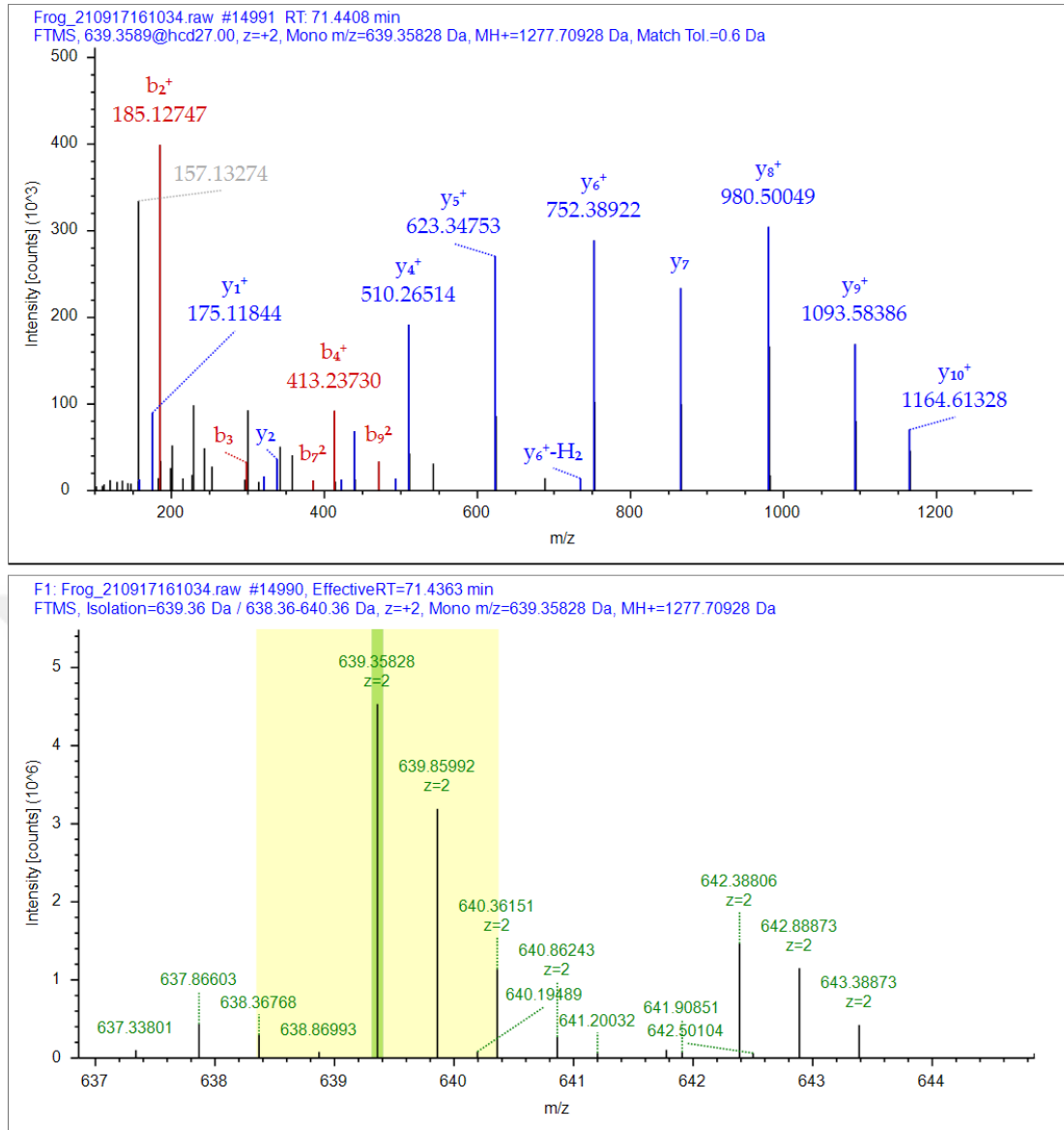
Buradan elde edilen örneklere LC-MS/MS analizi uygulanmıştır. Elde edilen verilerin spektrumları Şekil 4.9-Şekil 4.16'te gösterilmiştir. Veriler Uniprot/Swissprote veritabanı araştırılarak tanımlanan proteinler Çizelge 4.2'te verilmiştir.



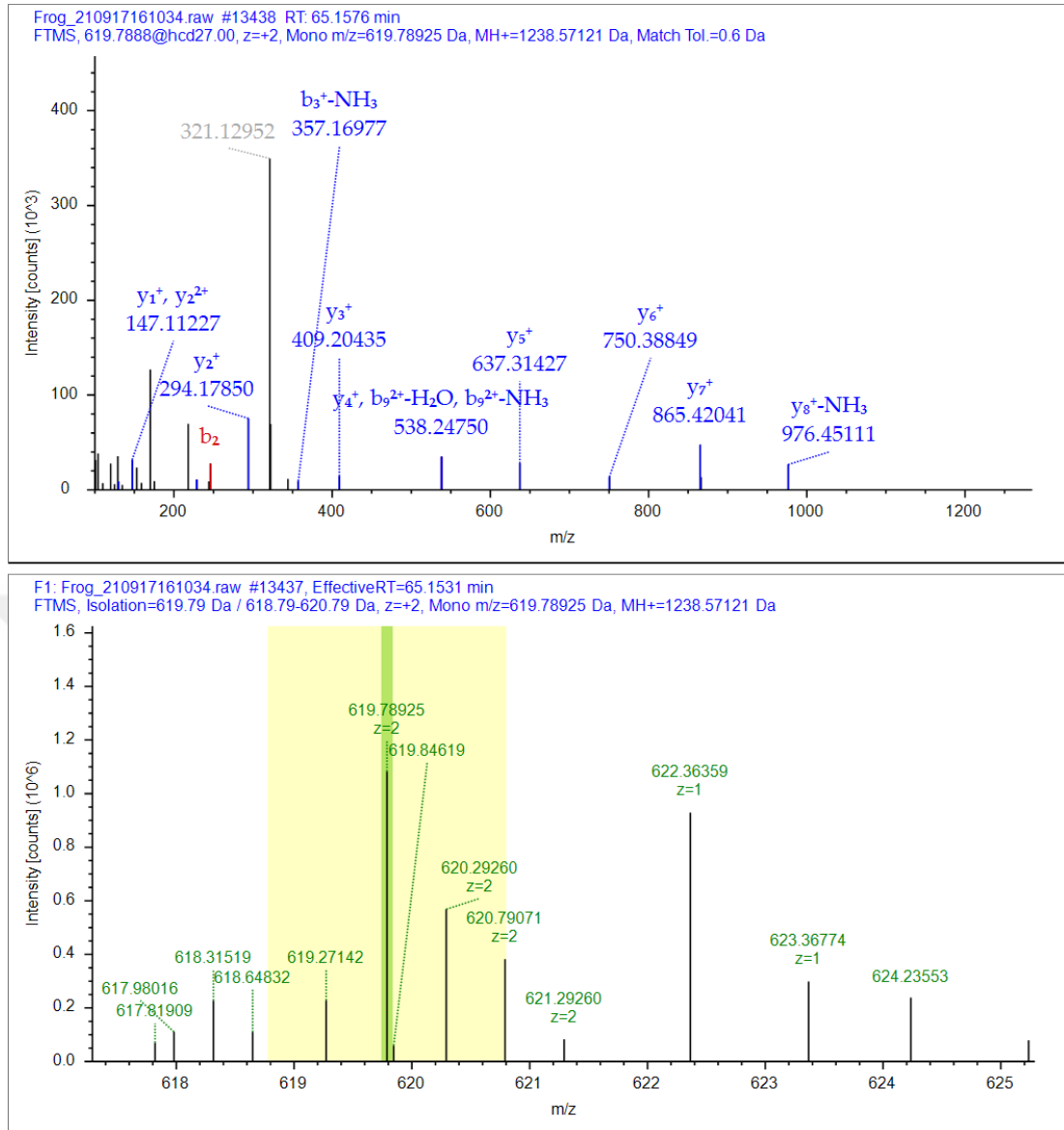
Şekil 4.9. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Sialik asit bağlayıcı lektin proteini.



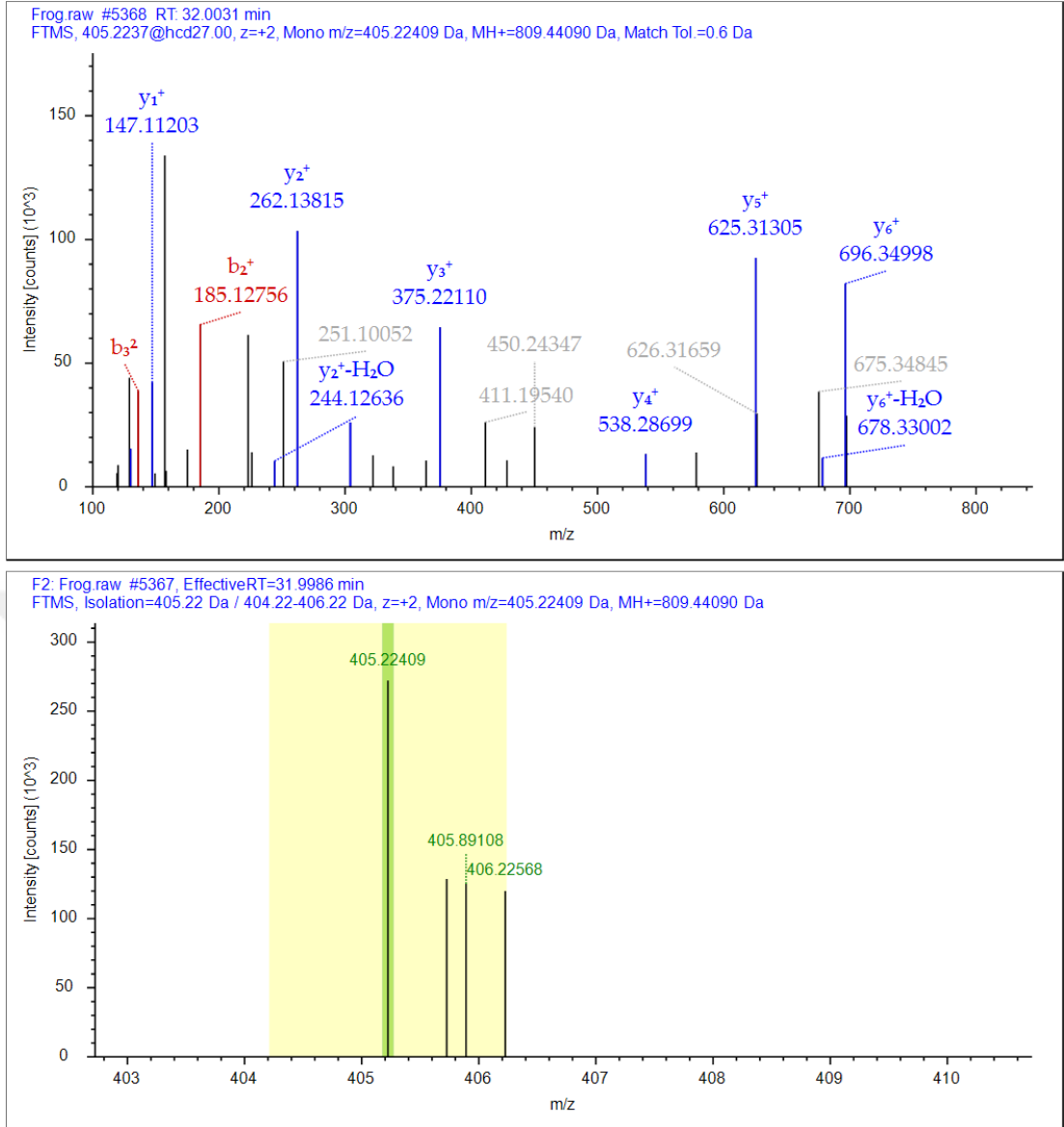
Şekil 4.10. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Keratin tip I proteini.



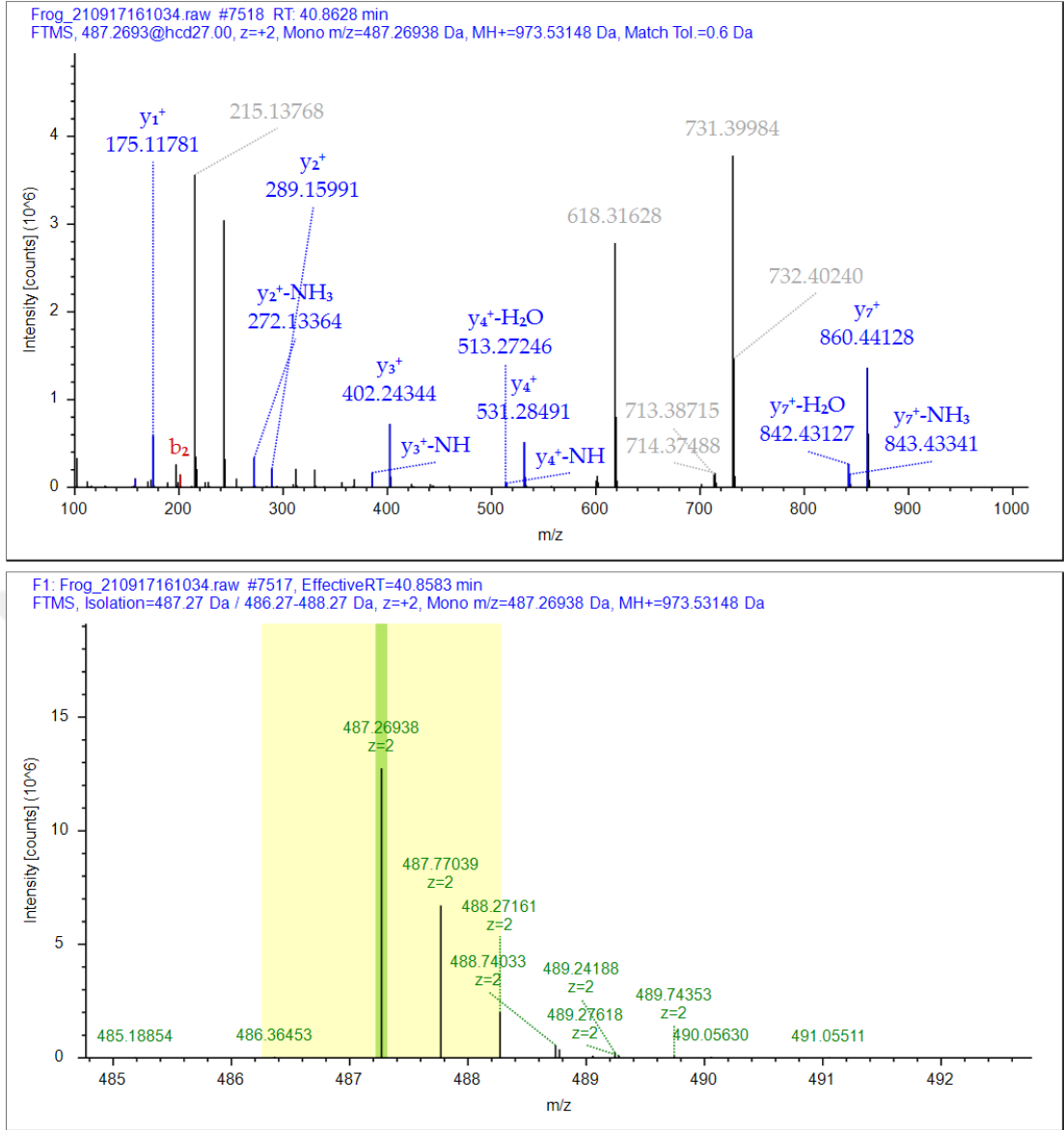
Şekil 4.11. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Keratin tip II proteini (SV:1).



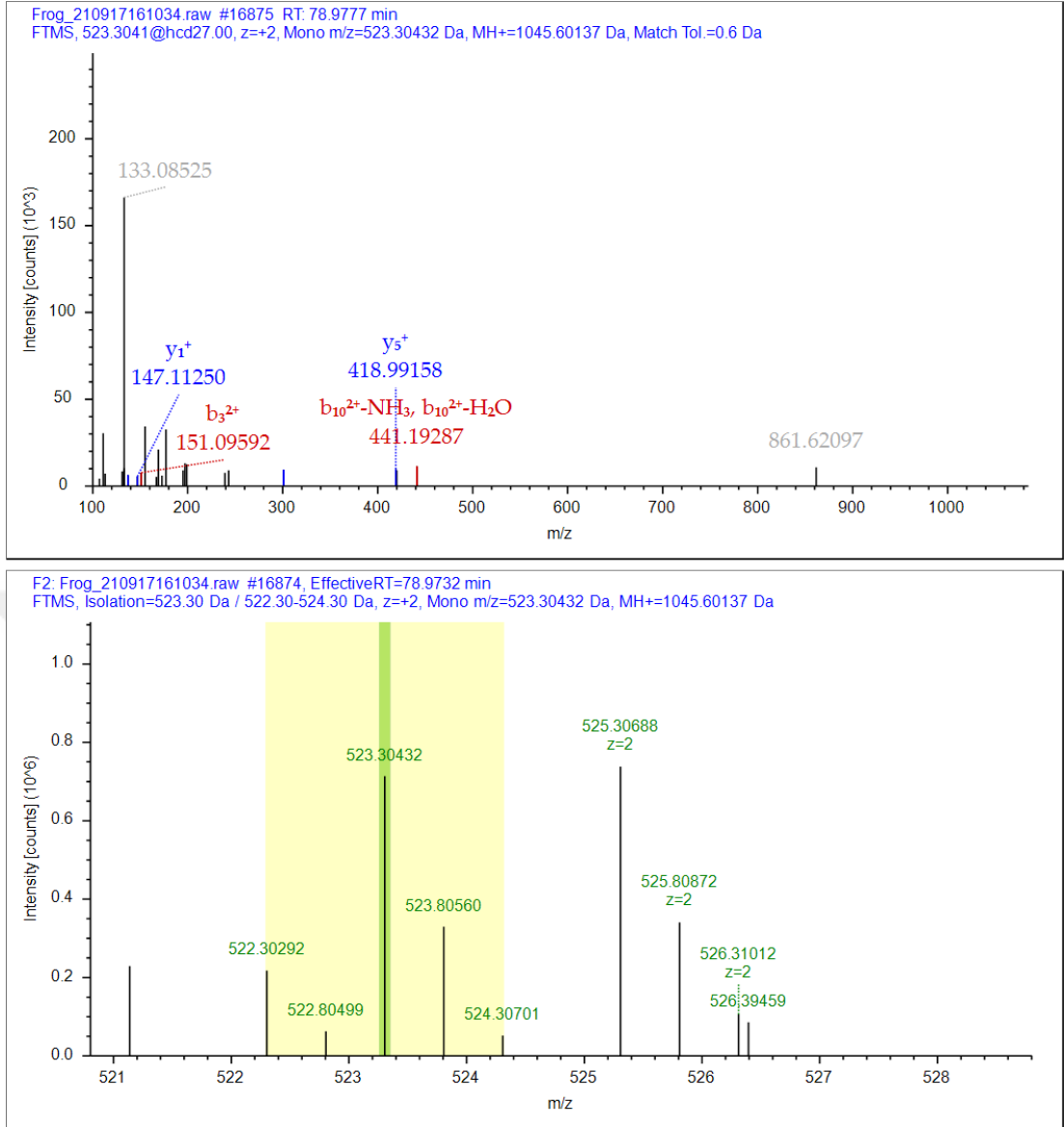
Şekil 4.12. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Keratin tip II proteini (SV:2).



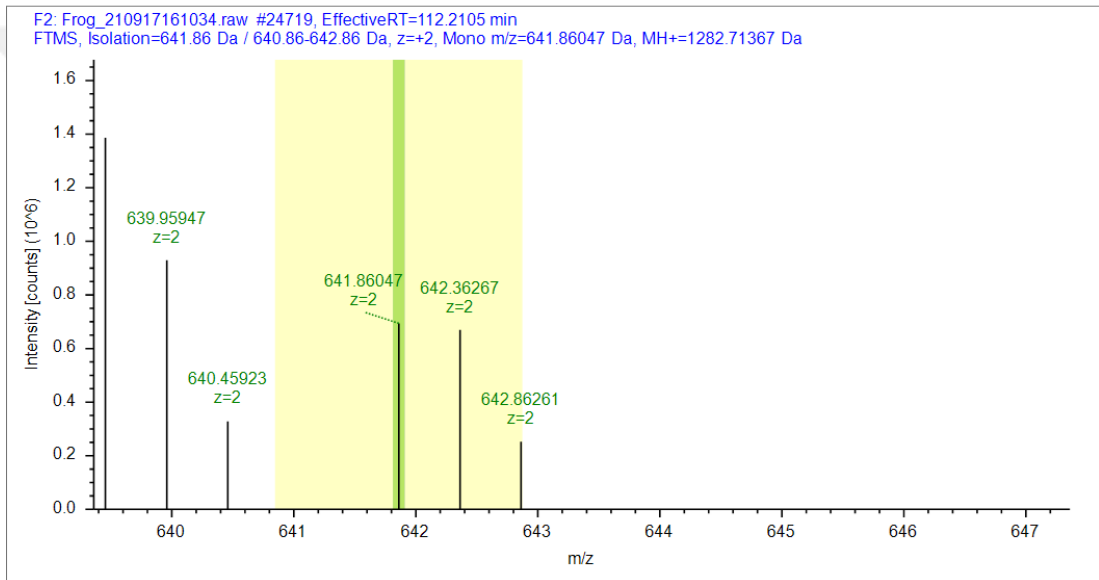
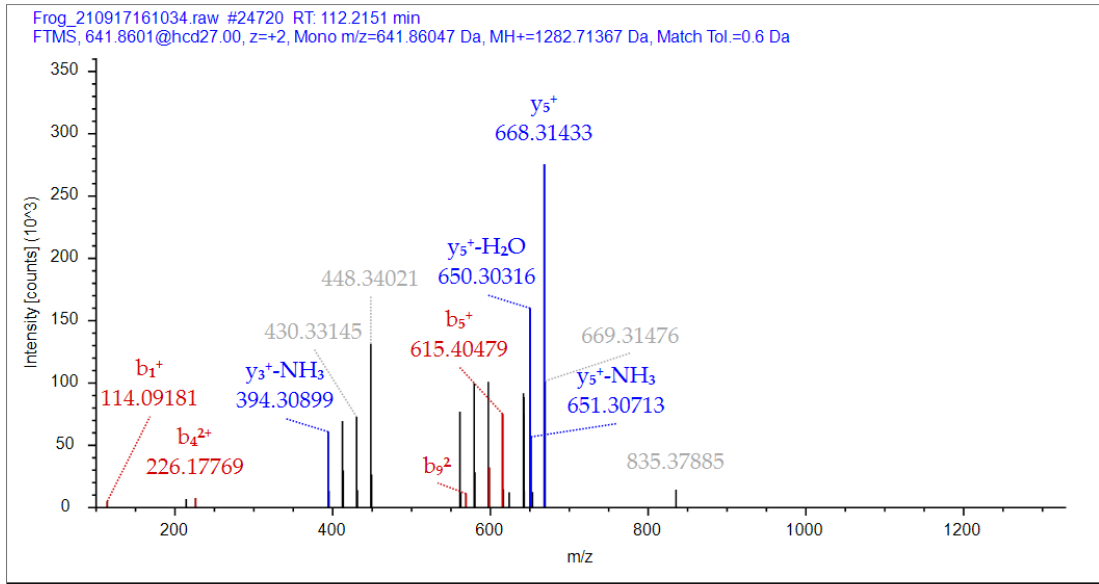
Şekil 4.13. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Keratin-3 tip I proteini.



Şekil 4.14. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Arpin proteini.



Şekil 4.15. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Uzama faktörü 1-alfa proteini.



Şekil 4.16. Yumurta jel örneğinin LC-MS/MS analizi spektrumu: Tudor alanı içeren protein.

Çizelge 4.2. Uniprot/Swissprote veritabanı araştırılarak tanımlanan proteinler.

Master	Erişim	Açıklama
Protein	P02537	Keratin-3, type I cytoskeletal 51 kDa OS=Xenopus laevis OX=8355 PE=2 SV=1
Protein	P05782	Keratin, type I cytoskeletal 47 kDa (Fragment) OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=xk81b1 PE=3 SV=2
Protein	P08776	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Xenopus laevis OX=8355 PE=2 SV=1
Protein	P13549	Elongation factor 1-alpha, somatic form OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=eef1as PE=2 SV=1
Protein	P16878	Keratin, type II cytoskeletal OS=Xenopus laevis OX=8355 PE=2 SV=2
Protein	P18839	Sialic acid-binding lectin OS=Rana japonica OX=8402 PE=1 SV=3
Protein	P21591	Bombesin OS=Bombina orientalis OX=8346 PE=2 SV=1
Protein	Q0IHW6	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1-like protein OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=kansl1l PE=2 SV=1
Protein	Q5EBD9	Elongator complex protein 2 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=elp2 PE=2 SV=1
Protein	Q5FW46	Protein FAM214A OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=fam214a PE=2 SV=1
Protein	Q5M7P8	Tudor a protein 7 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=tdrd7 PE=2 SV=1
Protein	Q66IV5	Arpin OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=arpin PE=2 SV=1

P. ridibundus yumurta jeli örneğinde tespit edilen proteinlerden biri olan keratinler epitel hücrelerinde en çok bulunan yapısal proteinleri temsil etmektedir (Coulombe ve Omary, 2002). Omurgalıların belirli epitel hücrelerinde üretilen bir grup çözünmeyen ve filament oluşturan proteinleri ifade eden keratinler ara filament proteinlerinin üst ailesine aittirler (Herrmann ve Aebi, 2004). Ara filament proteinleri, hücreler arası mekanik stabilitede ve bütünlüğü korumada önemli rol oynarlar. Buna ek olarak düzenleyici işlevlerde görev alan keratinler yara iyileşmesi gibi hücre içi sinyal yollarında da yer almaktadırlar. Burada özellikle tespit edilen keratin türü olan Keratin tip I proteinin (xk81b1), yine bir amfibi türü olan *Xenopus laevis*'te tespit edilmiş ve

gen ekspresyonu üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Burada hücre iskeletinin önemli bir bileşeni olduğu belirtilen keratinin, özellikle gelişimin embriyonik ve iribaş aşamalarını kapsayan metamorfoz evresinde etkin görev aldığı belirtilmiştir (Jonas vd., 1985). Amfibi metamorfozu sırasında larvanın hemen hemen her doku ve organı yeniden şekillenmekte ve yetişkin kurbağada farklı bir işlev kazanmaktadır. Tüm bu aşamalarda keratinin etkin bir rol oynadığı yapılan çalışma ile ortaya net olarak konmuştur (Mathisen ve Miller, 1989).

P. ridibundus yumurta jeli örneğinde tespit edilen bir diğer protein Elongation factor 1-alpha'dır. Büyüme faktörünün seçici bir düzenleyicisi olan bu proteinler amfibilerin oositlerinde düşük seviyelerde bulunurken somatik hücrelerde aktif olarak eksprese edilmektedir (Abdallah vd., 1991; Deschamps vd., 1991). Tespit edilen bir diğer protein ise bombesindir. Bu protein daha önce amfibi derisinden saflaştırılan aktif bir peptittir (Anastasi vd., 1971). 14 amino asitli bir peptit olan bombesinin hipoterminin uyarılması, DNA replikasyonunun uyarılması ve birçok gastrointestinal hormonun salınması dahil olmak üzere çok sayıda etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Brown vd., 1978; Moody ve Pert, 1979; Taché ve Brown, 1982; Spindel, 1986). Bunlara ek olarak beslenmenin inhibisyonu, düz kas kasılması, ekzokrin ve endokrin salgılar, termoregülasyon, kan basıncı ve sükröz düzenlemeleri ile hücre büyümesinde yer almak gibi pek çok biyolojik aktiviteye aracılık ettiği literatürde rapor edilmiştir (Ohki-Hamazaki vd., 2003).

P. ridibundus yumurta jelinde tespit edilen diğer proteinlerden KAT8 regulatory NSL complex subunit 1-like proteini, düzenleyici asetiltransferaz aktivitesine sahip bir proteindir (Palfree vd., 2015), Elongator complex protein 2 proteini, yüksek düzeyde korunmuş uzama faktörü olan bir multiprotein kompleksidir (Dong vd., 2015). Protein FAM214A proteini, büyüme faktörü ilişkili protein ailesi üyesidir (Lin vd., 2018). Tudor domain-containing proteinler, epigenetikte, gen ekspresyonunda ve RNA'ların düzenlenmesinde önemli rol oynayan proteinlerdir (Lau vd., 2009). Arpin proteini ise hücre iskeletinin organizasyonu ve stabilizasyonunda yer alan önemli faktördür (Tedeschi vd., 2011).

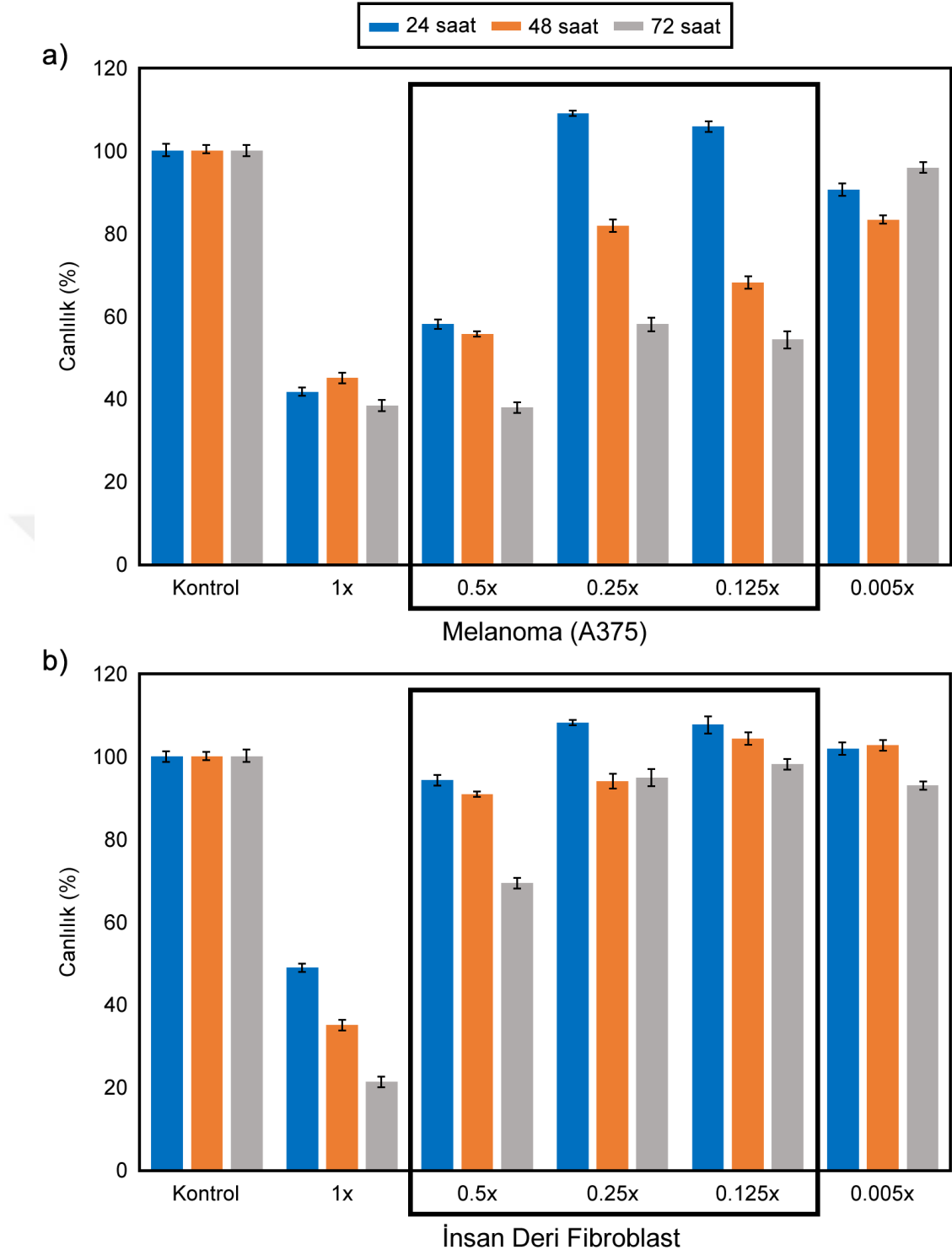
P. ridibundus yumurta jeli örneğinde tespit edilen önemli bir diğer protein sialik asit bağlayıcı lektindir. Lektinler, eritrosit vb. normal hücreleri, kanser hücrelerini ve mikroorganizmaları aglütine etme yeteneğine sahip çok değerlikli karbohidrat

bağlayıcı proteinlerdir (Titani vd., 1987). Yapılan bu çalışmada özellikle sialik glikoproteinine spesifik bir bağlanma sergileyen ve sialik asit bağlayıcı lektin olarak adlandırılan bu proteinin kanser hücrelerinin tercihlili aglütinasyonuna sebebiyet verdiği belirtilmiştir (Sakakibara vd., 1977). Ayrıca, sialik asit bağlayıcı lektin, tümör hücrelerine yönelik bir makrofaj sistemi yoluyla tümör büyümesini in vivo olarak inhibe edebilmektedir (Nakajima vd., 1986). Aktiviteleri arasında patojenik mikroorganizmalara karşı koruma da yer almaktadır (Krajhanzl, 1985). Bu çalışmalar göz önüne alındığında ilk kez bu tez kapsamında bir biyomalzeme olarak değerlendirilen *P. ridibundus* yumurta jelinin, bir kanser türü olan melanom üzerine biyolojik etkinliğinin, içeriğindeki proteinlerin güçlü aktivitesi kaynaklı olduğu öngörülmektedir.

4.8 Hücre Kültürü

4.8.1 MTT analiz sonuçları

P. ridibundus yumurta jelinin melanom kanser hücreleri üzerine biyolojik etkinliğinin belirlenmesi ve sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesinin değerlendirilmesi için ön çalışma olarak MTT testi yapılmıştır. Bu test tıbbi uygulamalarda kullanılacak biyomalzemelerin biyouyumluluğunu belirlemek için oldukça önemlidir (Assad ve Jackson, 2019). Yumurta jelinin melanom kanser hücrelerinin (A375) proliferasyonu üzerine etkisi ve sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesini değerlendirmek ve hayatta kalan hücre yüzdesini belirlemek için kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. Tetrazolyum tuzlarının, suda çözünmeyen formazan kristaline dönüştürülmesi esasına dayanan MTT testinde, DMSO ilave edildikten sonra formazan kristali çözülür ve elde edilen renk ELISA okuyucu ile ölçülmektedir. Absorbans, yaşayan hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Yapılan MTT testi sonuçlarında kurbağa jelinin melanom kanser hücreleri üzerine doz ve zamana bağlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği net olarak ortaya konmuştur. Buna ek olarak uygulanan kurbağa yumurta jelinin sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerine uygulanması sonucunda sağlıklı hücrelere sitotoksik etki göstermediği MTT analizi ile net olarak ortaya konmuştur. MTT analizine ait zaman, doz ve %canlılık sonuçları Şekil 4.17’te gösterilmiştir.



Şekil 4.17. MTT analizine % canlılık sonuçları: a) Melanoma (A375), b) İnsan deri fibroblastı.

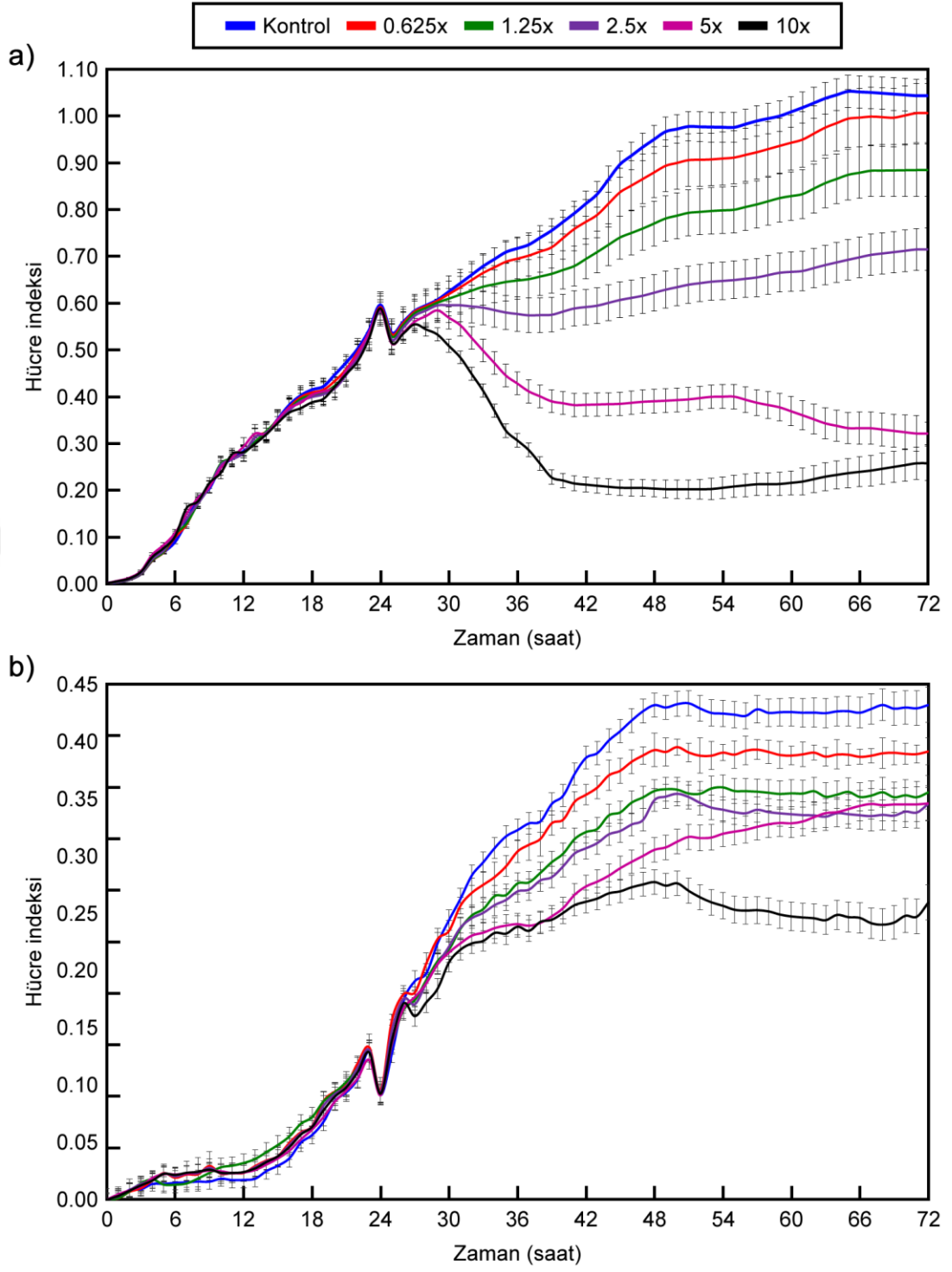
Kurbağa yumurta jeli 10:1 mg/mL jel konsantrasyonundan geri dilüsyonlar hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır. Analiz sonuçları göz önüne alındığında 5 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 1,25 mg/mL melanom kanser hücreleri için inhibe edici, sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için ise hücreye non-toksik etkili denilebilecek

düzeyde dozlar olarak belirlenmiştir. İlk kez bu tez çalışması kapsamında biyomalzeme olarak değerlendirilen kurbağa yumurta jelinin sağlıklı insan dermal fibroblast hattına toksisite göstermeyerek melanoma kanseri hücrelerine selektif inhibisyon gerçekleştirdiği açıkça görülmektedir.

4.8.2 xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları

P. ridibundus yumurta jelinin melanom kanser hücrelerinin (A375) proliferasyonu üzerine etkisi ve sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesini değerlendirmek ve hayatta kalan hücre yüzdesini belirlemek için ön çalışma olarak MTT testi gerçekleştirilmiştir. xCELLigence sistemi, e-plakanın elektrik empedansı olarak gerçek zamanlı koşullar altında hücresel değişiklikleri ölçmektedir. Doz ve zamana bağlı MTT analiz sonuçları ışığında belirlenen dozlar (1,25-2,5 ve 5 mg/mL) eş zamanlı ölçüm imkanı sunan xCELLigence sisteminde melanom kanser hücreleri ve sağlıklı deri fibroblast hücreleri üzerine test edilmiş ve selektif doz net olarak belirlenmiştir. xCELLigence analizine ait zaman, doz ve %canlılık sonuçları Şekil 4.18’te gösterilmiştir.

Sonuçlara göre; sağlıklı hücrelerde sitotoksitite göstermeyen (canlılık > %70) buna karşılık melanom kanser hattında (A375) antikanser özelliği ile dikkat çeken (canlılık < %30) 5 mg/mL kurbağa yumurta jeli uygulaması selektif doz olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ilk kez bu tez çalışması kapsamında melanom kanser tedavisi için biyomalzeme olarak değerlendirilen *P. ridibundus* yumurta jelinin biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalar için önemli bir potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.18. xCELLigence cihazı analizi hücre indeksi sonuçları: a) Melanoma (A375), b) İnsan deri fibroblastı.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Üç ayrı takım (Anura, Urodela, Apoda) ve 8000'den fazla türe sahip soğukkanlı omurgalı canlılar grubu olan amfibilerin yumurta yapıları, çoğu hayvan türünün aksine yalnızca bir vitellin zarf ve farklı birkaç jel katman yapı ile çevrilidir. Bu jel katman yumurta kanalında sentezlenir ve kümülatif olarak oosit etrafında biriktirilir. Bu jel tabaka, bileşim ve morfoloji bakımında türler arasında büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Lifli glikoprotein bir yapıya sahip olan bu yumurta için mekanik destek sağlama, kirleticilerden, yırtıcılardan ve patojenlerden koruma, sıcaklık ve UV ışığı gibi çevresel stres faktörlerine karşı yapı bütünlüğünü sağlama gibi çeşitli hayati rollerinin olduğu bilinmektedir. Doğada embriyoyu kirli sucul ekosistemde zorlu çevre şartlarına karşı koruyan bu jelin fizikokimyasal özellikleri bu zamana kadar ihmal edilmiş ve bu jel yapı biyoteknolojik olarak hiç değerlendirilmemiştir. İlk kez bu tez çalışması kapsamında model organizma olarak seçilmiş olan *P. ridibundus* yumurta jeli, malzeme bilimi bakış açısı ile fizikokimyasal olarak detaylı karakterize edilmiştir. Moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçerek moleküldeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi elde etmek amacıyla gerçekleştirilen FT-IR analizinde yapının tamamen protein ve karbohidrattan oluştuğu desteklenmiştir. Burada özellikle protein içeriğinde yapıya güçlü mekanik özellik kazandırdığı öngörülen β -tabaka yapısının varlığını işaret eden pikler, jel yapının doğada zorlu ortam şartlarında bütünlüğü bozulmadan embriyoyu nasıl koruyabildiğini destekler niteliktedir. Yumurta jel yapısının termal stabilitesini belirlemek ve yapıdaki su ve kül içeriğini analiz etmek için TGA analizi gerçekleştirilmiş ve degradasyonun 267 °C'de gerçekleştiği ortaya konmuştur. Burada kaydedilen degradasyon protein-polisakkarit kaynaklıdır ve bu denli yüksek termal stabilite yine yapının güçlü mukavemetini destekler niteliktedir. Biyomalzemelerin karakterize edilmesinde en önemli parametrelerden biriside kristal yapının belirlenmesidir. Amfibi yumurta jelinin kristal yapısının karakterizasyonu için XRD analizi gerçekleştirilmiş ve yapının glikoproteinden oluştuğunu destekler nitelikte pikler kaydedilmiştir. Burada kristalinite % 70,23 olarak hesaplanmıştır. Bu değer bir biyomalzeme için oldukça yüksektir ve yine yapının yüksek kararlılıkta olduğunu destekler niteliktedir. Elementel analiz ve EDX analiz ile belirlenen element profili, yapının C, N, H, O ve az miktarda S içerdiğini ortaya koymuştur. Yüzey morfolojisini belirlemek için dondurarak kurutulan örnekler SEM analizi ile incelenmiş ve jel yapının embriyoyu katmanlar halinde sardığı görülmüştür. % 99'dan

fazlası su olan jel materyali kurutulduğunda katmanlı yapı net olarak gözlemlenmiştir. *P. ridibundus* yumurta jelinin total karbohidrat konsantrasyonu Dubois yöntemi ile 96,43 µg/mL olarak belirlenmiştir. Karbohidrat profili HPLC analizi ile ortaya konmuş ve yapıda glikoz, galaktoz, mannoz ve ksiloz varlığı ortaya konmuştur. *P. ridibundus* yumurta jelinin total protein konsantrasyonu ise Bradford yöntemi ile 2,4 µg/µL olarak belirlenmiştir. Yapılan LC-MS/MS analizi ile 12 proteinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Burada tanımlanan proteinlerden özellikle sialik asit bağlayıcı lektin, daha önce belirlenmiş olan tümör hücrelerine yönelik bir makrofaj sistemi yoluyla tümör büyümesini in vivo olarak inhibe edebilme kabiliyeti sayesinde tez çalışmasının amacıyla birebir örtüşmektedir. Doğada sergilediği eşsiz görevler ve özellikle UV ışınlarına karşı koruma özelliği göz önüne alınarak potansiyel biyolojik aktivitesi öngörülmüş olan kurbağa yumurta jelinin, bu zararlı ışınlardan en çok etkilenen kanser türlerinden biri olan en agresif cilt kanseri melanom üzerine etkinliği test edilmiştir. Yapılan hücre çalışmaları sonucunda *P. ridibundus* yumurta jelinin 5 mg/mL selektif dozunun melanom kanser hattında (A375) antikanser aktivite sergilerken (canlılık < %30), sağlıklı hücrelerde sitotoksitite göstermediği (canlılık > %70) kanıtlanmıştır. Bu tez çalışmasında ilk kez doğadan gelen bir mucize olan amfibi yumurta jelinin melanom kanser hücreleri üzerinde etkin bir biyoaktivite sergilediği ve potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceği net olarak ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

- Abdallah, B., Hourdry, J., Krieg, P.A., Denis, H.ve Mazabraud, A., 1991. Germ cell-specific expression of a gene encoding eukaryotic translation elongation factor 1 alpha (eEF-1 alpha) and generation of eEF-1 alpha retropseudogenes in *Xenopus laevis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 20, 9277-9281.
- Adeli, M., Ashiri, M., Khodadadi Chegeni, B.ve Sasanpour, P., 2013. Tumor-targeted drug delivery systems based on supramolecular interactions between iron oxide-carbon nanotubes PAMAM-PEG-PAMAM linear-dendritic copolymers, *Journal of the Iranian Chemical Society*, 10, 701-708.
- Adler, K.ve Halliday, T., 2002. *The New Encyclopedia of Reptiles and Amphibians*, Oxford University Press.
- Ahmad, S.S., Reinius, M.A., Hatcher, H.M.ve Ajithkumar, T.V., 2016. Anticancer chemotherapy in teenagers and young adults: managing long term side effects, *Bmj*, 354.
- Akhtar, M., Haider, A., Rashid, S.ve Al-Nabet, A.D.M., 2019. Paget's "seed and soil" theory of cancer metastasis: an idea whose time has come, *Advances in anatomic pathology*, 26, 1, 69-74.
- Alashwal, B., Gupta, A.ve Husain, M., 2019. Characterization of dehydrated keratin protein extracted from chicken feather, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 012033.
- Alifrangis, C., Koizia, L., Rozario, A., Rodney, S., Harrington, M., Somerville, C., Peplow, T.ve Waxman, J., 2011. The experiences of cancer patients, *QJM: An International Journal of Medicine*, 104, 12, 1075-1081.
- Altig, R.ve McDiarmid, R.W., 2007. Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians, *Herpetological Monographs*, 21, 1, 1-32.
- Amawi, H., Ashby, C.R.ve Tiwari, A.K., 2017. Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting?, *Chinese journal of cancer*, 36, 1, 1-13.
- Anastasi, A., Erspamer, V.ve Bucci, M., 1971. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*, *Experientia*, 27, 2, 166-167.
- Assad, M.ve Jackson, N., 2019. Biocompatibility evaluation of orthopedic biomaterials and medical devices: A review of safety and efficacy models.
- Bakos, M.A., Kurosky, A.ve Hedrick, J.L., 1990. Physicochemical characterization of progressive changes in the *Xenopus laevis* egg envelope following oviductal transport and fertilization, *Biochemistry*, 29, 3, 609-615.

- Balint, N., Citrea, L., Memetea, A., Jurj, N.ve Condure, N., 2008. Feeding ecology of the *Pelophylax ridibundus* (Anura, Ranidae) in Dobromir, Romania, *Biharean Biologist*, 2, 27-37.
- Baran, İ.ve Atatür, M., 1998. Türkiye Herpetofaunası (Kurbağa ve Sürüngenler)[Turkish Herpetofauna (Amphibians and Reptiles)], TC Çevre Bakanlığı Yayını, Ankara, 209pp.
- Baran, İ., Ilgaz, Ç., Avcı, A., Kumlutaş, Y.ve Olgun, K., 2012. Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri [The Amphibians and Reptiles of Turkey], TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Ankara.
- Barra, D.ve Simmaco, M., 1995. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides, *Trends in biotechnology*, 13, 6, 205-209.
- Beattie, R., 1980. A physico-chemical investigation of the jelly capsules surrounding eggs of the Common frog (*Rana temporaria temporaria*), *Journal of Zoology*, 190, 1, 1-25.
- Begg, A.C., Stewart, F.A.ve Vens, C., 2011. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs, *Nature Reviews Cancer*, 11, 4, 239-253.
- Bilican, I., Pekdemir, S., Onses, M.S., Akyuz, L., Altuner, E.M., Koc-Bilican, B., Zang, L.-S., Mujtaba, M., Mulerčikas, P.ve Kaya, M., 2020. Chitosan loses innate beneficial properties after being dissolved in acetic acid: supported by detailed molecular modeling, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8, 49, 18083-18093.
- Blaustein, A.R.ve Belden, L.K., 2003. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation, *Evolution & development*, 5, 1, 89-97.
- Bonnell, B.S.ve Chandler, D.E., 1996. Egg jelly layers of *Xenopus laevis* are unique in ultrastructure and sugar distribution, *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 44, 2, 212-220.
- Borković-Mitić, S.S., Prokić, M.D., Krizmanić, I.I., Mutić, J., Trifković, J., Gavrić, J., Despotović, S.G., Gavrilović, B.R., Radovanović, T.B.ve Pavlović, S.Z., 2016. Biomarkers of oxidative stress and metal accumulation in marsh frog (*Pelophylax ridibundus*), *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 9649-9659.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72, 1-2, 248-254.
- Bradstreet, R.B., 1954. Kjeldahl method for organic nitrogen, *Analytical Chemistry*, 26, 1, 185-187.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A.ve Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and

mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, CA: a cancer journal for clinicians, 68, 6, 394-424.

Brown, M., Allen, R., Villareal, J., Rivier, J.ve Vale, W., 1978. Bombesin-like activity: radioimmunologic assessment in biological tissues, Life Sciences, 23, 27-28, 2721-2728.

Brunner, L.S., 2010. Brunner & Suddarth's textbook of medical-surgical nursing, Lippincott Williams & Wilkins.

Budak, A.ve Göçmen, B., 2005. Herpetoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Budak, A., Göçmen, B., Mermer, A.ve Kaya, U., 2002. Omurgalılar sistematigi, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Carroll Jr, E.J., Wei, S.H., Nagel, G.M.ve Ruibal, R., 1991. Structure and Macromolecular Composition of the Egg and Embryo Jelly Coats of the Anuran *Lepidobatrachus laevis*: (frog jelly coat/fertilization/glycoprotein), Development, growth & differentiation, 33, 1, 37-43.

Chan, N.J.-A., Gu, D., Tan, S., Fu, Q., Pattison, T.G., O'Connor, A.J.ve Qiao, G.G., 2020. Spider-silk inspired polymeric networks by harnessing the mechanical potential of β -sheets through network guided assembly, Nature communications, 11, 1, 1630.

Chen, X., Lam, K.F., Mak, S.F.ve Yeung, K.L., 2011. Precious metal recovery by selective adsorption using biosorbents, Journal of hazardous materials, 186, 1, 902-910.

Cheng, F.-Y., Su, C.-H., Wu, P.-C.ve Yeh, C.-S., 2010. Multifunctional polymeric nanoparticles for combined chemotherapeutic and near-infrared photothermal cancer therapy in vitro and in vivo, Chemical communications, 46, 18, 3167-3169.

Chesnel, A., Lerivray, H.ve Jégo, P., 2019. Lectin-Induced Agglutination of Microorganisms in Urodelan Amphibian Egg Jelly, Proceedings of the Third Symposium, Lyon, France, June 26–28, 1985, 647-652.

Chinembiri, T.N., Du Plessis, L.H., Gerber, M., Hamman, J.H.ve Du Plessis, J., 2014. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment, Molecules, 19, 8, 11679-11721.

Chylińska, M., Szymańska-Chargot, M.ve Zdunek, A., 2016. FT-IR and FT-Raman characterization of non-cellulosic polysaccharides fractions isolated from plant cell wall, Carbohydrate polymers, 154, 48-54.

Costa, M., Garcia, M., Costa-Rodrigues, J., Costa, M.S., Ribeiro, M.J., Fernandes, M.H., Barros, P., Barreiro, A., Vasconcelos, V.ve Martins, R., 2013. Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the Portuguese

- coast: High potential as a source of anticancer compounds, *Marine drugs*, 12, 1, 98-114.
- Coulombe, P.A.ve Omary, M.B., 2002. 'Hard'and 'soft'principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments, *Current opinion in cell biology*, 14, 1, 110-122.
- Cragg, G.M.ve Newman, D.J., 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830, 6, 3670-3695.
- Cragg, G.M.ve Pezzuto, J.M., 2016. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents, *Medical Principles and Practice*, 25, Suppl. 2, 41-59.
- Cui, F.M., Zhang, X.Y.ve Shang, L.M., 2013. Thermogravimetric analysis of glucose-based and fructose-based carbohydrates, *Advanced Materials Research*, 805, 265-268.
- Dadras Chomachayi, M., Jalali-Arani, A., Beltrán, F.R., de la Orden, M.U.ve Martínez Urreaga, J., 2020. Biodegradable nanocomposites developed from PLA/PCL blends and silk fibroin nanoparticles: study on the microstructure, thermal behavior, crystallinity and performance, *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 1252-1264.
- de Oliveira, S.A., Borges, R., dos Santos Rosa, D., de Souza, A.C.S., Seabra, A.B., Bairo, F.ve Marchi, J., 2021. Strategies for cancer treatment based on photonic nanomedicine, *Materials*, 14, 6, 1435.
- Desai, A.G., Qazi, G.N., Ganju, R.K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A.K., Bedi, Y.S., Taneja, S.C.ve Bhat, H.K., 2008. Medicinal plants and cancer chemoprevention, *Current drug metabolism*, 9, 7, 581-591.
- Deschamps, S., Morales, J., Mazabraud, A., le Maire, M., Denis, H.ve Brown, D.D., 1991. Two forms of elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha O and 42Sp50), present in oocytes, but absent in somatic cells of *Xenopus laevis*, *J Cell Biol*, 114, 6, 1109-1111.
- Dong, C., Lin, Z., Diao, W., Li, D., Chu, X., Wang, Z., Zhou, H., Xie, Z., Shen, Y.ve Long, J., 2015. The Elp2 subunit is essential for elongator complex assembly and functional regulation, *Structure*, 23, 6, 1078-1086.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.t.ve Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical chemistry*, 28, 3, 350-356.
- Erb, P., Ji, J., Wernli, M., Kump, E., Glaser, A.ve Büchner, S.A., 2005. Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation, *Immunology letters*, 100, 1, 68-72.

- Fedorov, S.N., Ermakova, S.P., Zvyagintseva, T.N.ve Stonik, V.A., 2013. Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: Some results and prospects, *Marine drugs*, 11, 12, 4876-4901.
- Ferreira, H.ve Jesus, C., 1973. Salt adaptation in *Bufo bufo*, *The Journal of Physiology*, 228, 3, 583-600.
- Folkes, B., Grant, R.ve Jones, J., 1950. 440. Frog-spawn mucin, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2136-2140.
- Freddi, G., Tsukada, M.ve Beretta, S., 1999. Structure and physical properties of silk fibroin/polyacrylamide blend films, *Journal of applied polymer science*, 71, 10, 1563-1571.
- Freedman, M.ve Nierodzik, M., 2007. *Cancer and age*, Second Edition, Elsevier, New York, USA.
- Freeman, S.B., 1968. A study of the jelly envelopes surrounding the egg of the amphibian, *Xenopus laevis*, *The Biological Bulletin*, 135, 3, 501-513.
- Galeski, A., 2003. Strength and toughness of crystalline polymer systems, *Progress in Polymer Science*, 28, 12, 1643-1699.
- Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W.ve Nie, S., 2004. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots, *Nature biotechnology*, 22, 8, 969-976.
- Gilbreth, R.N., Novarra, S., Wetzel, L., Florinas, S., Cabral, H., Kataoka, K., Rios-Doria, J., Christie, R.J.ve Baca, M., 2016. Lipid-and polyion complex-based micelles as agonist platforms for TNFR superfamily receptors, *Journal of Controlled Release*, 234, 104-114.
- Gül, S., Olgun, K.ve Kutrup, B., 2011. Body size and age structure of *Pelophylax ridibundus* populations from two different altitudes in Turkey, *Amphibia-Reptilia*, 32, 2, 287-292.
- Häkkinen, J., Pasanen, S.ve Kukkonen, J.V., 2001. The effects of solar UV-B radiation on embryonic mortality and development in three boreal anurans (*Rana temporaria*, *Rana arvalis* and *Bufo bufo*), *Chemosphere*, 44, 3, 441-446.
- Halliday, T., 2008. Why amphibians are important, *International Zoo Yearbook*, 42, 1, 7-14.
- Heinrich, M., Barnes, J., Prieto-Garcia, J., Gibbons, S.ve Williamson, E.M., 2017. *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*, Elsevier Health Sciences.
- Herrmann, H.ve Aebi, U., 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds, *Annual review of biochemistry*, 73, 1, 749-789.

- Hu, X., Kaplan, D.ve Cebe, P., 2006. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy, *Macromolecules*, 39, 18, 6161-6170.
- Huang, M., Lu, J.-J., Huang, M.-Q., Bao, J.-L., Chen, X.-P.ve Wang, Y.-T., 2012. Terpenoids: natural products for cancer therapy, *Expert opinion on investigational drugs*, 21, 12, 1801-1818.
- Humphries Jr, A.ve Hughes, W., 1959. A study of the polysaccharide histochemistry of the oviduct of the newt, *Triturus viridescens*, *The Biological Bulletin*, 116, 3, 446-451.
- Ishihara, K., Hosono, J., Kanatani, H.ve Katagiri, C., 1984. Toad egg-jelly as a source of divalent cations essential for fertilization, *Developmental biology*, 105, 2, 435-442.
- Iyer, A.K., Singh, A., Ganta, S.ve Amiji, M.M., 2013. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance, *Advanced drug delivery reviews*, 65, 13-14, 1784-1802.
- Jena, K., Pandey, J., Kumari, R., Sinha, A., Gupta, V.ve Singh, G., 2018. Free radical scavenging potential of sericin obtained from various ecoraces of tasar cocoons and its cosmeceuticals implication, *International journal of biological macromolecules*, 120, 255-262.
- Jena, K., Pandey, J., Kumari, R., Sinha, A., Gupta, V.ve Singh, G., 2018. Tasar silk fiber waste sericin: new source for anti-elastase, anti-tyrosinase and anti-oxidant compounds, *International journal of biological macromolecules*, 114, 1102-1108.
- Ji, X., Liu, F., Peng, Q.ve Wang, M., 2018. Purification, structural characterization, and hypolipidemic effects of a neutral polysaccharide from *Ziziphus Jujuba* cv. Muzao, *Food Chemistry*, 245, 1124-1130.
- Jonas, E., Sargent, T.D.ve Dawid, I.B., 1985. Epidermal keratin gene expressed in embryos of *Xenopus laevis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 16, 5413-5417.
- Kachuri, L., De, P., Ellison, L.ve Semenciw, R., 2013. Cancer incidence, mortality and survival trends in Canada, 1970-2007, *Chronic diseases and injuries in canada*, 33, 2.
- Kaida, S., Cabral, H., Kumagai, M., Kishimura, A., Terada, Y., Sekino, M., Aoki, I., Nishiyama, N., Tani, T.ve Kataoka, K., 2010. Visible Drug Delivery by Supramolecular Nanocarriers Directing to Single-Platformed Diagnosis and Therapy of Pancreatic Tumor ModelVisible DDS for Diagnosis and Therapy of Solid Tumors, *Cancer research*, 70, 18, 7031-7041.

- Kakkar, P., Verma, S., Manjubala, I.ve Madhan, B., 2014. Development of keratin–chitosan–gelatin composite scaffold for soft tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 45, 343-347.
- Kashyap, D., Tuli, H.S., Yerer, M.B., Sharma, A., Sak, K., Srivastava, S., Pandey, A., Garg, V.K., Sethi, G.ve Bishayee, A., 2021. Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges, *Seminars in cancer biology*, 5-23.
- Katagiri, C., 1987. Role of oviducal secretions in mediating gamete fusion in anuran amphibians, *Zoological science*, 4, 1, 1-14.
- Keten, S., Xu, Z., Ihle, B.ve Buehler, M.J., 2010. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of β -sheet crystals in silk, *Nature materials*, 9, 4, 359-367.
- Ki, C.S., Kim, J.W., Oh, H.J., Lee, K.H.ve Park, Y.H., 2007. The effect of residual silk sericin on the structure and mechanical property of regenerated silk filament, *International journal of biological macromolecules*, 41, 3, 346-353.
- Krajhanzl, A., 1985. Fish oocyte lectins. Further physicochemical characterization of lectins from oocytes of the bream *Abramis brama* L., and the perch *Perca fluviatilis* L. Interaction of perch lectin I with components of the mature egg jelly envelope, *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, 4, 377-396.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N.ve Aster, J.C., 2014. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition, Elsevier Health Sciences.
- Kumar, V., Bhatt, P.C., Rahman, M., Kaithwas, G., Choudhry, H., Al-Abbasi, F.A., Anwar, F.ve Verma, A., 2017. Fabrication, optimization, and characterization of umbelliferone β -D-galactopyranoside-loaded PLGA nanoparticles in treatment of hepatocellular carcinoma: in vitro and in vivo studies, *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6747.
- Kumari, P., Muddineti, O.S., Rompicharla, S.V.K., Ghanta, P., BBN, A.K., Ghosh, B.ve Biswas, S., 2017. Cholesterol-conjugated poly (D, L-lactide)-based micelles as a nanocarrier system for effective delivery of curcumin in cancer therapy, *Drug Delivery*, 24, 1, 209-223.
- Kundu, J., Dewan, M., Ghoshal, S.ve Kundu, S., 2008. Mulberry non-engineered silk gland protein vis-a-vis silk cocoon protein engineered by silkworms as biomaterial matrices, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 2679-2689.
- Kunjachan, S., Rychlik, B., Storm, G., Kiessling, F.ve Lammers, T., 2013. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions, *Advanced drug delivery reviews*, 65, 13-14, 1852-1865.

- Kuru, M., 1999. Omurgalı Hayvanlar Palme Yayıncılık, Feryal Matbaacılık San, Ltd. Şti., Ankara.
- Lau, N.C., Ohsumi, T., Borowsky, M., Kingston, R.E.ve Blower, M.D., 2009. Systematic and single cell analysis of *Xenopus* Piwi-interacting RNAs and Xiwi, *The EMBO journal*, 28, 19, 2945-2958.
- Lee, P.A., 1967. Studies of frog oviducal jelly secretion. I. Chemical analysis of secretory product, *Journal of Experimental Zoology*, 166, 1, 99-106.
- Leuenberger, J., Gander, A., Schmidt, B.R.ve Perrin, N., 2014. Are invasive marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) replacing the native *P. lessonae*/*P. esculentus* hybridogenetic complex in Western Europe? Genetic evidence from a field study, *Conservation Genetics*, 15, 869-878.
- Li, L., Gu, W., Chen, J., Chen, W.ve Xu, Z.P., 2014. Co-delivery of siRNAs and anti-cancer drugs using layered double hydroxide nanoparticles, *Biomaterials*, 35, 10, 3331-3339.
- Lin, S., Lin, X., Zhang, Z., Jiang, M., Rao, Y., Nie, Q.ve Zhang, X., 2018. Copy number variation in *SOX6* contributes to chicken muscle development, *Genes*, 9, 1, 42.
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P.ve Declercq, W., 2009. Cell death in the skin, *Apoptosis*, 14, 549-569.
- Madan, V., Lear, J.T.ve Szeimies, R.-M., 2010. Non-melanoma skin cancer, *The lancet*, 375, 9715, 673-685.
- Markman, J.L., Rekechenetskiy, A., Holler, E.ve Ljubimova, J.Y., 2013. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance, *Advanced drug delivery reviews*, 65, 13-14, 1866-1879.
- Marquis, O., Millery, A., Guittonneau, S.ve Miaud, C., 2006. Toxicity of PAHs and jelly protection of eggs in the common frog *Rana temporaria*, *Amphibia-Reptilia*, 27, 3, 472-475.
- Martínez, D.C.C., Zuluaga, C.L., Restrepo-Osorio, A.ve Álvarez-López, C., 2017. Characterization of sericin obtained from cocoons and silk yarns, *Procedia engineering*, 200, 377-383.
- Mashreghi, M., Bazaz, M.R., Shahri, N.M., Asoodeh, A., Mashreghi, M., Rassouli, M.B.ve Golmohammadzadeh, S., 2013. Topical effects of frog “*Rana ridibunda*” skin secretions on wound healing and reduction of wound microbial load, *Journal of ethnopharmacology*, 145, 3, 793-797.
- Mathisen, P.M.ve Miller, L., 1989. Thyroid hormone induces constitutive keratin gene expression during *Xenopus laevis* development, *Molecular and Cellular Biology*, 9, 5, 1823-1831.

- Mekonnen, B.T., Ragothaman, M.ve Palanisamy, T., 2017. Bifunctional hybrid composites from collagen biowastes for heterogeneous applications, *ACS omega*, 2, 8, 5260-5270.
- Meng, Z., Zheng, X., Tang, K., Liu, J., Ma, Z.ve Zhao, Q., 2012. Dissolution and regeneration of collagen fibers using ionic liquid, *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 4, 440-448.
- Miyake, H., Wakisaka, H., Yamashita, Y.ve Nagura, M., 2003. Moisture characteristic and structure of high molecular weight sericin film, *Polymer journal*, 35, 8, 683-687.
- Molassiotis, A., Fernandez-Ortega, P., Pud, D., Ozden, G., Scott, J.A., Panteli, V., Margulies, A., Browall, M., Magri, M.ve Selvekerova, S., 2005. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey, *Annals of oncology*, 16, 4, 655-663.
- Mondal, P., Jain, D., Aronow, W.S.ve Frishman, W.H., 2019. Cardiotoxicity of Cancer therapies, *Cardiology in Review*, 27, 5, 230-235.
- Moody, T.W.ve Pert, C.B., 1979. Bombesin-like peptides in rat brain: quantitation and biochemical characterization, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 90, 1, 7-14.
- Mousavi, S.M., Gouya, M.M., Ramazani, R., Davanlou, M., Hajsadeghi, N.ve Seddighi, Z., 2009. Cancer incidence and mortality in Iran, *Annals of oncology*, 20, 3, 556-563.
- N Nwodo, J., Ibezim, A., Simoben, C.V.ve Ntie-Kang, F., 2016. Exploring cancer therapeutics with natural products from African medicinal plants, part II: alkaloids, terpenoids and flavonoids, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16, 1, 108-127.
- Nakajima, Y., Suzuki, H., Sakakibara, F., Kawauchi, H., Mizuno, D.ve Yamazaki, M., 1986. Induction of a cytotoxin from murine macrophages by an animal lectin, *The Japanese Journal of Experimental Medicine*, 56, 1, 19-25.
- Nuerxiati, R., Abuduwaili, A., Mutailifu, P., Wubulikasimu, A., Rustamova, N., Jingxue, C., Aisa, H.A.ve Yili, A., 2019. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (Salep), *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 431-443.
- Ohki-Hamazaki, H., Iwabuchi, M.ve Maekawa, F., 2003. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors, *International Journal of Developmental Biology*, 49, 2-3, 293-300.

- Okimura, M., Watanabe, A.ve Onitake, K., 2001. Organization of carbohydrate components in the egg-jelly layers of the newt, *Cynops pyrrhogaster*, Zoological science, 18, 7, 909-918.
- Olson, J.H.ve Chandler, D.E., 1999. *Xenopus laevis* egg jelly contains small proteins that are essential to fertilization, Developmental biology, 210, 2, 401-410.
- Omata, S., 1993. Relative roles of jelly layers in successful fertilization of *Bufo japonicus*, Journal of Experimental Zoology, 265, 3, 329-335.
- Özeti, N.ve Yılmaz, İ., 1994. Türkiye amfibileri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, 151, 221.
- Palfree, R.G., Bennett, H.P.ve Bateman, A., 2015. The evolution of the secreted regulatory protein progranulin, PloS one, 10, 8, e0133749.
- Pandey, S.K., Patel, D.K., Maurya, A.K., Thakur, R., Mishra, D.P., Vinayak, M., Halder, C.ve Maiti, P., 2016. Controlled release of drug and better bioavailability using poly (lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles, International journal of biological macromolecules, 89, 99-110.
- Peavy, T.R., Hernandez, C.ve Carroll, E.J., 2003. Jeltraxin, a frog egg jelly glycoprotein, has calcium-dependent lectin properties and is related to human serum pentraxins CRP and SAP, Biochemistry, 42, 44, 12761-12769.
- Pérez-Herrero, E.ve Fernández-Medarde, A., 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy, European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 93, 52-79.
- Perlmann, P.ve Perlmann, H., 1957. Analysis of the surface structures of the sea urchin egg by means of antibodies: II. The J-and A-antigens, Experimental Cell Research, 13, 3, 454-474.
- Pourjavadi, A., Kurdtabar, M., Mahdavinia, G.R.ve Hosseinzadeh, H., 2006. Synthesis and super-swelling behavior of a novel protein-based superabsorbent hydrogel, Polymer Bulletin, 57, 813-824.
- Rasoulzadeh, M.ve Namazi, H., 2017. Carboxymethyl cellulose/graphene oxide bio-nanocomposite hydrogel beads as anticancer drug carrier agent, Carbohydrate Polymers, 168, 320-326.
- Sak, K., 2014. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types, Pharmacognosy reviews, 8, 16, 122.
- Sakakibara, F., Takayanagi, G., Ise, H.ve Kawauchi, H., 1977. Isolation of two agglutinins with different biological properties from the eggs of *Rana catesbiana* (author's transl), Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 97, 8, 855-862.

- Salo-väänänen, P.P.ve Koivistoinen, P.E., 1996. Determination of protein in foods: comparison of net protein and crude protein ($N \times 6.25$) values, *Food chemistry*, 57, 1, 27-31.
- Salthe, S.N., 1963. The egg capsules in the Amphibia, *Journal of Morphology*, 113, 2, 161-171.
- Samgina, T.Y., Artemenko, K.A., Gorshkov, V.A., Ogourtsov, S.V., Zubarev, R.A.ve Lebedev, A.T., 2008. De novo sequencing of peptides secreted by the skin glands of the Caucasian Green Frog *Rana ridibunda*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 22, 3517-3525.
- Schulz, F.N.ve Becker, M., 1935. Über die Kohlenhydrate der Eiweissdrüse von *Rana esculenta*, *Biochem. Z*, 280, 217-226.
- Senapati, S., Mahanta, A.K., Kumar, S.ve Maiti, P., 2018. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance, *Signal transduction and targeted therapy*, 3, 1, 7.
- Shaver, J.ve Barch, S., 1960. Experimental studies on the role of jelly coat material in fertilization in the frog, *Acta Embryol. et Morphol. Exp*, 3, 180-189.
- Shaver, J., Barch, S.ve Shivers, C., 1962. Tissue-specificity of frog egg-jelly antigens, *Journal of Experimental Zoology*, 151, 2, 95-103.
- Shaver, J.R., 1966. Immunobiological studies of the jelly-coats of anuran eggs, *American Zoologist*, 75-87.
- Shimoda, Y., Kitajima, K., Inoue, S.ve Inoue, Y., 1994. Isolation, structural determination, and calcium-binding properties of the major glycoprotein present in *Bufo japonicus japonicus* egg jelly, *European journal of biochemistry*, 223, 1, 223-231.
- Simmaco, M., Mignogna, G.ve Barra, D., 1998. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?, *Peptide Science*, 47, 6, 435-450.
- Slevin, M.L., Stubbs, L., Plant, H.J., Wilson, P., Gregory, W.M., Armes, P.J.ve Downer, S.M., 1990. Attitudes to chemotherapy: comparing views of patients with cancer with those of doctors, nurses, and general public, *British Medical Journal*, 300, 6737, 1458-1460.
- Spindel, E., 1986. Mammalian bombesin-like peptides, *Trends in Neurosciences*, 9, 130-133.
- Steinke, J.ve Benson Jr, D., 1970. The structure and polysaccharide cytochemistry of the jelly envelopes of the egg of the frog, *Rana pipiens*, *Journal of Morphology*, 130, 1, 57-65.
- Suhail, Y., Cain, M.P., Vanaja, K., Kurywchak, P.A., Levchenko, A.ve Kalluri, R., 2019. Systems biology of cancer metastasis, *Cell systems*, 9, 2, 109-127.

- Taché, Y.ve Brown, M., 1982. On the role of bombesin in homeostasis, *Trends in Neurosciences*, 5, 431-433.
- Tapiero, H., Tew, K., Ba, G.N.ve Mathe, G., 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56, 4, 200-207.
- Tedeschi, G., Pagliato, L., Negroni, M., Montorfano, G., Corsetto, P., Nonnis, S., Negri, A.ve Rizzo, A.M., 2011. Protein pattern of *Xenopus laevis* embryos grown in simulated microgravity, *Cell Biology International*, 35, 3, 249-258.
- Teramoto, H.ve Miyazawa, M., 2005. Molecular orientation behavior of silk sericin film as revealed by ATR infrared spectroscopy, *Biomacromolecules*, 6, 4, 2049-2057.
- Thornton, M., Parry, M., Gill, P., Mead, D.ve Macbeth, F., 2011. Hard choices: A qualitative study of influences on the treatment decisions made by advanced lung cancer patients, *International journal of palliative nursing*, 17, 2, 68-74.
- Titani, K., Takio, K., Kuwada, M., Nitta, K., Sakakibara, F., Kawauchi, H., Takayanagi, G.ve Hakomori, S., 1987. Amino acid sequence of sialic acid binding lectin from frog (*Rana catesbeiana*) eggs, *Biochemistry*, 26, 8, 2189-2194.
- Turani, B., Aliko, V.ve Faggio, C., 2020. Allurin and egg jelly coat impact on in-vitro fertilization success of endangered Albanian water frog, *Pelophylax shqipericus*, *Natural product research*, 34, 6, 830-837.
- Tyler, A., 1959. Some immunobiological experiments on fertilization and early development in sea urchins, *Experimental Cell Research*, 7, 183-199.
- Valeriote, F.A., Tenney, K., Pietraszkiewicz, H., Edelstein, M., Johnson, T.A., Amagata, T.ve Crews, P., 2012. Discovery and development of anticancer agents from marine sponges: perspectives based on a chemistry-experimental therapeutics collaborative program, *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*, 10, 2.
- Van Soest, J.J.ve Vliegenthart, J.F., 1997. Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties, *Trends in biotechnology*, 15, 6, 208-213.
- Viborg, A.ve Rosenkilde, P., 2001. Angiotensin II elicits water seeking behavior and the water absorption response in the toad *Bufo bufo*, *Hormones and behavior*, 39, 3, 225-231.
- Wake, D.B.ve Koo, M.S., 2018. Amphibians, *Current Biology*, 28, 21, R1237-R1241.
- Wang, J., Hu, W., Liu, Q.ve Zhang, S., 2011. Dual-functional composite with anticoagulant and antibacterial properties based on heparinized silk fibroin and chitosan, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85, 2, 241-247.

- Wang, X., Li, B., Jing, H., Dong, X.ve Leng, X., 2020. MWCNT-mediated combinatorial photothermal ablation and chemo-immunotherapy strategy for the treatment of melanoma, *Journal of Materials Chemistry B*, 8, 19, 4245-4258.
- Wang, Y., Nie, J., Chang, B., Sun, Y.ve Yang, W., 2013. Poly (vinylcaprolactam)-based biodegradable multiresponsive microgels for drug delivery, *Biomacromolecules*, 14, 9, 3034-3046.
- Wang, Y., Xu, S., Xiong, W., Pei, Y., Li, B.ve Chen, Y., 2016. Nanogels fabricated from bovine serum albumin and chitosan via self-assembly for delivery of anticancer drug, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 107-113.
- Wiedemann, H.ve Larnprechth, I., 1999. *Wood Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, Chapter, 14, 765.
- Wilson, D., Valluzzi, R.ve Kaplan, D., 2000. Conformational transitions in model silk peptides, *Biophysical journal*, 78, 5, 2690-2701.
- Wright, A.H.ve Wright, A.A., 2019. *Handbook of frogs and toads of the United States and Canada*, Cornell University Press.
- Xu, X.ve Lai, R., 2015. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions, *Chemical reviews*, 115, 4, 1760-1846.
- Xue, B., Kozlovskaya, V., Liu, F., Chen, J., Williams, J.F., Campos-Gomez, J., Saeed, M.ve Kharlampieva, E., 2015. Intracellular degradable hydrogel cubes and spheres for anti-cancer drug delivery, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 24, 13633-13644.
- Yardley, D.A., 2013. nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery, *Journal of Controlled Release*, 170, 3, 365-372.
- Yurewicz, E.C., Oliphant, G.ve Hedrick, J.L., 1975. Macromolecular composition of *Xenopus laevis* egg jelly coat, *Biochemistry*, 14, 14, 3101-3107.
- Zeeshan, R.ve Mutahir, Z., 2017. Cancer metastasis-tricks of the trade, *Bosnian journal of basic medical sciences*, 17, 3, 172.
- Zhang, J., Jing, L., Li, M., He, L.ve Guo, Z., 2019. Regulation of histone arginine methylation/demethylation by methylase and demethylase, *Molecular medicine reports*, 19, 5, 3963-3971.
- Zhao, D., Zhao, X., Zu, Y., Li, J., Zhang, Y., Jiang, R.ve Zhang, Z., 2010. Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles, *International journal of nanomedicine*, 669-677.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Behlül KOÇ BİLİCAN

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi, 2011 - 2015

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2016 - 2019

Doktora : Aksaray Üniversitesi, 2019 - 2023

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

Mesleki Deneyim

1. Aksaray Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi / Araştırma Görevlisi
2. Vytautas Magnus University / Litvanya, Erasmus Staj Programı
3. University of East Sarajevo / Bosna Hersek, Erasmus+ K107 Ders Alma Programı
4. University of Zagreb / Hırvatistan, Erasmus+K107 Ders Alma Programı

Ödüller

1. Bu Gençlikte İş Var!, Türkiye Üçüncülüğü, TÜSİAD, 2018
2. Benim İşim Girişim, Bölge Birinciliği, ERCİYES TEKNOPARK, 2018

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Amfibi Yumurta Jel Katmanları; Morfolojik Yapısı ve İçeriği, Fertilizasyon Üzerine Etkisi ve İmmünoyoloji Aktivitesi, Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2023. doi.org/10.21597/jist.1265923.

Patentler

1. Anura Takımında Yer Alan Kurbağaların Yumurtalarındaki Jellerinin Biyoteknolojik Kullanımı, (İncelemede, Başvuru Numarası: 2021/009350).