

T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Macrovipera lebetinus (KOCA ENGEREK) ZEHRİNDE
BİREYSEL VARYASYONUN L-AMİNO ASİT OKSİDAZ,
HYALURONİDAZ ve FOSFODİESTERAZ ENZİM
AKTİVİTELERİ AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

Tezi Hazırlayan
Rabia TAŞ

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2022
NEVŞEHİR

T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Macrovipera lebetinus (KOCA ENGEREK) ZEHRİNDE
BİREYSEL VARYASYONUN L-AMİNO ASİT OKSİDAZ,
HYALURONİDAZ ve FOSFODİESTERAZ ENZİM
AKTİVİTELERİ AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

Tezi Hazırlayan
Rabia TAŞ

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2022
NEVŞEHİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ danışmanlığında Rabia TAŞ tarafından hazırlanan “*Macrovipera lebetinus* (Koca Engerek) Zehrinde Bireysel Varyasyonun L-Amino Asit Oksidaz, Hyaluronidaz ve Fosfodiesteraz Enzim Aktiviteleri Açısından Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jüri üyelerimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

28/07/2022

JÜRİ

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Aysel KEKİLLİOĞLU

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selen PEKER

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ

Onay:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

... / ... / 2022

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Rabia TAŞ

TEŞEKKÜR

Tecrübesi ve bilgisiyle ışık tutan, sorunlara anlayışlı ve sabırla yaklaşıp, çözüm üretmemi sağlayıp, bana yardımcı olup inanç aşıl原因 ve laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ'ye,

Farklı laboratuvar olanaklarından yararlanmama yardım eden Öğr. Görevlisi Enver Ersoy ANDEDEN'e,

Tez çalışmamda kullanılan zehirlerin temini için arazi çalışmalarında katkıda bulunan Prof. Dr. Mehmet Zülfü YILDIZ'a,

Bugüne kadar bana katkı sağlayan ve emeği olan tüm hocalarıma, arkadaşlarıma ve sevdiklerime; her daim yanımda olduğunu hissettiren, bana inanan, varlığıyla güç veren aileme, her anlamda iyisiyle kötüsüyle eleştiri yaparak beni ince ayrıntıları ile daha iyi duruma gelebilmem için yönlendiren, destek veren ablama ve eşime

TEŞEKKÜR EDERİM.

Rabia TAŞ

Ağustos 2022, NEVŞEHİR

***Macrovipera lebetinus* (KOCA ENGEREK) ZEHRİNDE BİREYSEL
VARYASYONUN L-AMİNO ASİT OKSİDAZ, HYALURONİDAZ VE
FOSFODİESTERAZ ENZİM AKTİVİTELERİ AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Rabia TAŞ

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ağustos 2022

ÖZET

Yılan zehirleri son zamanlarda bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve üzerinde yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Yılan zehirleri; toksinler, proteinler, enzimler ve enzim inhibitörlerini içeren karmaşık yapıları karışımlardır. Yılan zehri protein ve peptitleri toksik etkinin ortaya çıkmasından sorumludur. Bununla beraber, bu moleküller tanı ve tedavide de kullanılmaktadır. *Macrovipera lebetinus* (Koca Engerek), Viperiade ailesine dahil olup Türkiye’deki en büyük engerek türüdür ve zehri insan üzerinde de etkilidir. Daha önce bu türün zehri üzerinde enzim saflaştırma, karakterizasyon, biyolojik aktivite ve proteomik karakterizasyona yönelik farklı çalışmalar yapılmıştır. Ancak türün zehrinin bireysel varyasyonu ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Bu tez çalışmasında *M. lebetinus* zehrinde bireysel varyasyon L-amino asit oksidaz, hyaluronidaz, ve fosfodiesteraz enzim aktiviteleri açısından araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, yakın bölgelerden elde edilmiş *M. lebetinus* bireylerinin zehirleri arasında varyasyon olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar gelecekte yapılacak daha kapsamlı araştırmalara ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: Macrovipera lebetinus, l-amino asit oksidaz, hyaluronidaz, fosfodiesteraz, bireysel varyasyon

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ

Sayfa Adeti: 59

**INVESTIGATION of the INDIVIDUAL VARIATION in *Macrovipera lebetinus*
(BLUNT-NOSED VIPER) VENOM IN TERMS OF L-AMINO ACID OXIDASE,
HYALURONIDASE AND PHOSPHODIESTERASE ENZYME ACTIVITIES**

(MSc Thesis)

Rabia TAŞ

**NEVSEHIR HACI BEKTAS VELI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

August 2022

ABSTRACT

Snake venom has been recently taken attention of scientists and the amount of research on snake venom has been increased. Snake venom is a complex mixture containing toxins, proteins, enzymes and the enzyme inhibitors. These proteins and peptides are responsible for the toxicity of snake venoms. However, these molecules have also diagnostic and therapeutic uses. Previous research on *M. lebetinus* venom mainly focused on the protein purification and proteomic characterization and its biological activities. On the other hand, the knowledge regarding its individual venom variation is limited. In this thesis, individual variation in *M. lebetinus* venom was investigated in terms of L-amino acid oxidase, hyaluronidase and phosphodiesterase enzyme activities. Obtained results revealed the presence of the venom variation in *M. lebetinus* even between the individuals living close to each other. These results will shed light on more extensive studies in the future.

Keywords: Macrovipera lebetinus, l-amino acid oxidase, hyaluronidase, phosphodiesterase, individual variation

Thesis Supervisor: Asst. Prof. Naşit İĞCİ

Page Number: 59

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLOLAR LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Yılan Zehirleri.....	3
2. 1. 1. Viperidae zehirleri.....	3
2. 2. L-Amino Asit Oksidazlar (LAAO).....	4
2. 3. Hyaluronidazlar.....	4
2. 4. Fosfodiesterazlar (PDE).....	5
2. 5. <i>Macrovipera lebetinus</i> (Koca Engerek) (LINNAEUS, 1758).....	6
2. 5. 1. Morfoloji	6
2. 5. 2. Taksonomisi	6
2. 5. 3. Ekolojisi ve coğrafi dağılışı.....	7
3. BÖLÜM	
KAYNAK ÖZETLERİ	9

3. 1. <i>Macrovipera lebetinus</i> Zehri ile İlgili Yapılan Çalışmalar	9
3. 2. Yılan Zehirlerinde Bireysel Varyasyon	10
4. BÖLÜM	
MATERYAL ve METOT	12
4. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	12
4. 2. Kullanılan Alet ve Gereçler	13
4. 3. Kullanılan Zehirler	14
4. 4. Zehir Sağımı, Saklanması ve Çalışmalar için Hazırlanması	14
4. 5. Protein Miktar Tayini	15
4. 6. L-Amino Asit Oksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	15
4. 7. Hyaluronidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	17
4. 8. Fosfodiesteraz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	19
5.BÖLÜM	
BULGULAR	22
5. 1. Protein Miktar Tayini	22
5. 2. L-Amino Asit Oksidaz Enzim Aktivitesi	23
5. 3. Hyaluronidaz Enzim Aktivitesi	25
5. 4. Fosfodiesteraz Enzim Aktivitesi	29
6. BÖLÜM	
TARTIŞMA ve SONUÇ	32
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	42

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4. 1.	Deneyde kullanılan kimyasal maddelerin listesi	29
Tablo 4. 2.	Deneyde kullanılan alet ve gereçlerin listesi	30
Tablo 4. 3.	Çalışmada kullanılan bireylere ait bilgiler	31
Tablo 4. 4.	Protein miktar tayini için yapılan işlemler	32
Tablo 4. 5.	L- amino asit oksidaz enzim aktivitesi için kullanılacak kimyasalların hazırlanması	33
Tablo 4. 6.	L- amino asit oksidaz enzim aktivite için tüplerin yapılma planı ...	33
Tablo 4. 7.	Hyaluronidaz enzim aktivitesi için kullanılacak kimyasalların hesaplanmış işlemleri	35
Tablo 4. 8.	Hyaluronidaz enzim aktivite için tüplerin hazırlanma planı	36
Tablo 4. 9.	Fosfodiesteraz enzim aktivitesi için kullanılacak kimyasalların hesaplanmış işlemleri	37
Tablo 4. 10.	Fosfodiesteraz enzim aktivitesi için tüplerin hazırlanma planı	38
Tablo 5. 1.	Bradford protein miktar tayini sonuçları	40
Tablo 5. 2.	L-amino asit oksidaz enzim aktivite sonucu elde edilen birim değer ortalaması ve her birinin standart sapması	41
Tablo 5. 3.	Birey 1'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler	43
Tablo 5. 4.	Birey 2'ye ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler	44
Tablo 5. 5.	Birey 3'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler	44
Tablo 5. 6.	Birey 4'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler	44
Tablo 5. 7.	Birey 5'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler	44
Tablo 5. 8.	Birey 6'ya ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler	45

Tablo 5. 9.	Birey 7'ye ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler	45
Tablo 5. 10.	Birey 8'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler	45
Tablo 5. 11.	Birey 9'a ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler	45
Tablo 5. 12.	Fosfodiesteraz enzim aktivite sonucu elde edilen birim değer ortalaması ve her birinin standart sapması	47
Tablo 6. 1.	Deneyde yapılan tüm aktivitelerin birim ortalamaları, standart sapmaları ve protein konsantrasyon değerleri	50



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 5. 1. Standartların kullanılıp oluşturulduğu Bradford standart eğri grafiği.....39
- Şekil 5. 2. Örneklerin L-amino asit oksidaz enzim aktiviteleri kullanılarak oluşturulan sütun grafiği 41
- Şekil 5. 3. Hyaluronik asit konsantrasyonu ve hyaluronik asit tekrarlarının ortalaması kullanılarak oluşturulan eğri grafiği 43
- Şekil 5. 4. Örneklerin ve hyaluronidaz enzim aktiviteleri kullanılarak oluşturulan sütun grafiği 46
- Şekil 5. 5. Örneklerin fosfodiesteraz enzim aktiviteleri kullanılarak oluşturulan sütun grafiği 48

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 2. 1. *Macrovipera lebetina obtusa*'nın genel görünümü (Yer: Şanlıurfa, Bilecik, Fotoğraf: Naşit İĞCİ) 24



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
2D – PAGE	İki boyutlu jel elektroforezi
Ab	Amiloid b peptidin
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır serum albümini
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cDNA	Komplementer DNA
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CLP	C tipi lektin proteini
cm	Santimetre
CRISP	Sisteince zengin salgı proteini
CTAB	Hekzadesiltrimetilamonyum bromür
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Ekstrasellüler matris yapısı
FAD	Flavin adenin dinükleotid
g	Gram
GG	Glisin – Glisin

HA	Hyaluronik asit
HRP	Yaban turpu peroksidazı
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
l	Litre
LAAO	L-Amino asit oksidaz
m	Metre
M	Molar
MALDI – TOF	Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon – uçuş süresi
mg	Miligram
ml	Mililitre
MLO	<i>Macrovipera lebetinus obtusa</i>
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MVL – PLA₂	<i>Macrovipera lebetinus</i> fosfolipaz A ₂
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NGD	Nikotinamid guanin dinükleotid
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
OD	Optik yoğunluk
PDE	Fosfodiesteraz

PLA₂	Fosfolipaz A ₂
RNA	Ribonükleik asit
SVMP	Yılan zehri metalloproteinazı
SVSP	Yılan zehri serin proteinazı
UV	Ultraviyole (mor ötesi)
v / v	Hacim / hacim



1. BÖLÜM

GİRİŞ

Doğal zehirler doğa bilimcilerin ve araştırmacıların eski tarihlerden beri ilgisini çekmiştir. Peptit tabanlı ilaç geliştirme konusuna olan ilgi nedeniyle hayvansal zehirlerle alakalı araştırma sayısı artmıştır. Yapılan çalışmalarda yılan zehirleri önemli bir yer tutmaktadır. Çeşitli ilaç ve tanı ürünlerinin geliştirilmesi yılan zehirlerinin saflaştırılan peptit ve proteinlerine bağlı olarak yapılmaktadır. Temel olarak yılan zehirleri peptit/protein yapılı zengin içeriğe sahiptir. Yılan zehirlerinin yapısında nörotoksinler, kardiyotoksinler gibi toksik proteinler, zehirli etki göstermeyen proteinler (ör: Kobra zehir faktörü, sinir büyüme faktörü), fosfolipaz A₂ (PLA₂), hyaluronidaz, metalloproteinaz, serin proteinaz, L-amino asit oksidaz (LAAO), nükleotidaz gibi enzimler ve enzim inhibitörleri bulunur. Bunların yanında biyolojik aminler ve iyonlar da bulunmaktadır [1-3].

Yılan zehirlerinin sarımsı rengiyle ilişkili olan LAAO enzimi, hidrojen peroksit ve amonyum salınımı ile amino asitlerin ilgili α -keto asitlere oksidatif deaminasyonunu katalize eden bir flavoproteindir [4]. Yılan zehirleri LAAO açısından zengindir ve bazı LAAO'lar yılan zehirlerinden izole edilmiş ve karakterize edilmiştir [5]. L-amino asit oksidaz enzimi, trombosit agregasyonu, koagülasyon, apoptoz indüksiyonu, hemoliz ve sitotoksisite dahil birçok farmakolojik aktivite göstermektedir [6].

Hayvan dokusunun ana bileşeni olan hyaluronik asit uzun zincirli bir glikozaminoglikandır ve yılan zehirleri dahil birçok hayvan zehrinde bulunan hyaluronidaz enzimi tarafından depolimerize edilmektedir [7]. Hyaluronidaz enzimi, hyaluronik asidi parçalayıp hücre dışı matrisi hasara uğratarak bağ dokuda yayılır ve bu şekilde toksinlerin etkisini güçlendirdiği için yayılma faktörü olarak da isimlendirilmektedir [8].

Fosfodiesteraz (PDE) enzimleri ise monomerik, homodimerik veya heterodimerik formlarda bulunan metalloglikoproteinlerdir. Polinükleotitlerin fosfodiester bağlarını hidrolize edebilmektedirler. PDE'ler hücre farklılaşması, iyon kanalı işlevi, kas

kasılması, apoptoz gibi birçok farmakolojik süreçleri etkilemektedir [9,10]. Yılan zehirlerinde de bulunan fosfodiesteraz enzimi adenosin difosfatı (ADP'yi) hidrolize ederek ADP'nin neden olduğu trombosit agregasyonuna karşı güçlü inhibitör aktivite göstermektedir [11]. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda yılan zehirlerinden farklı yapılarda PDE enzimleri karakterize edilmiştir [12].

Amaç ve Tez Gerekçesi

Bu tez çalışması ile Türkiye'de yayılış gösteren *Macrovipera lebetinus* (Koca Engerek) türüne ait zehirlerde bireysel varyasyonun L-Amino asit oksidaz, hyaluronidaz ve fosfodiesteraz enzim aktiviteleri açısından araştırılması, karşılaştırmalı bir şekilde belirlenmesi ve varyasyona neden olabilecek biyolojik veya zehir protein miktarı gibi faktörlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bahsi geçen enzimler daha önce *M. lebetinus* türünün zehrinde de karakterize edilmiştir [4]. Bu tür, Türkiye'deki en büyük engerek türü olup zehirli ısırıkları insan için tehlikelidir. Literatürde, *M. lebetinus* zehirlerinin bireysel varyasyonunun araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile elde edilen bulgular bilimsel literatüre yukarıda bahsedilen konular çerçevesinde katkı sağlayacaktır ve Türkiye'de gerçekleşen engerek ısırılmalarına ait patogenezin daha iyi değerlendirilmesini sağlayacaktır. Ayrıca zehir varyasyonu panzehir geliştirilmesinde de çok önemli bir olgudur. Tez çalışması ile Türkiye'de panzehirlerin hedef türlerinden biri olan Koca Engereğin bireysel zehir varyasyonunun ne derece olduğu ve panzehir üretimini nasıl etkileyebileceği hakkında da veri elde edilecektir.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2. 1. Yılan Zehirleri

Ülkemizde de var olan yılan ısırılmaları ılıman ve sıcak iklim bölgelerinde yaşanan önemli sağlık problemleri arasında yer almaktadır. Dünya genelinde 4000'e yakın yılan türünün yaklaşık olarak %15'inin zehirli ve insanlar için tehlike oluşturduğu düşünülmektedir [13]. Zehirli yılanlar Colubridae (kırbaç yılanları), Viperidae (Engerekler ve çingiraklı yılanlar), Elapidae (Mercan yılanları ve kobralar) ve Atractaspididae (Köstebek engerekleri ve stiletto yılanları) olmak üzere dört yılan ailesinde incelenmektedir [14].

Sarımsı ve beyazımsı görünen hafif yoğun bir sıvı olan yılan zehrinin bileşimi türden türe, aynı türün farklı bireyelerine, aynı bireyin yaşına, mevsime ve sıcaklığa göre değişiklik göstermektedir [15]. Zehir bileşenini etkileyen faktörler arasında coğrafya [16], cinsiyet [17,18] ve diyet (beslenme) de [19,20] bulunur. Kuru zehrin büyük kısmı enzimler, enzim olmayan polipeptitler, toksinler ve toksik olmayan proteinlerden oluşmaktadır. Bu anlamda yılan zehirleri proteinler, toksinler, enzimler, enzim inhibitörleri, metal iyonlar ve biyolojik aminlerden oluşan heterojen bir karışımdır [21].

2. 1. 1. *Viperidae* zehirleri

Viperidae familyası engerekler ve çingiraklı yılanları içermektedir. Bu gruptaki zehirli yılanlar büyük zehir dişlerine sahiptir ve bu dişler ağız kapalıyken geriye doğru yatık halde bulunur. Fakat avını yakalamak veyahut avına saldırmak için ağzını açarken büyük dişler ön tarafta dik duruma gelmektedir. Zehir bezleri etrafında bulunan kasların kasılması ile yılan, zehrini avına aktarmaktadır [22].

Engerek zehirleri çok şiddetli hemotoksik ve miyotoksik etkiye sahiptirler. Zehir tüm organ sistemini etkiler [13]. Engerek ve çingiraklı yılan zehirlerinde bulunan başlıca enzimler PLA₂, hyaluronidaz, LAAO, yılan zehri serin proteinazlar (SVSP), yılan zehri metalloproteinazlar (SVMP), 5'-nükleotidaz ve fosfodiesterazdır. Disintegrinler,

miyotoksinler, C-tipi lektin proteinleri (CLP), sisteince zengin salgı proteinleri (CRISP) ve sinir ve damar büyüme faktörleri gibi enzimatik olmayan proteinler de bulunmaktadır [23-26]. Bazılarında ise nörotoksik etki de görülmektedir [15].

2. 2. L-Amino Asit Oksidazlar (LAAO)

L- amino asit oksidazlar moleküler kütle açısından oldukça değişken bir enzim grubu olup aynı zamanda stabilite açısından da büyük farklılıklar göstermektedir. Yılan zehirleri LAAO açısından zengin bir enzim kaynağıdır ve birçok zehirde yaygın olarak bulunmaktadır [27,28]. Özellikle engerek zehirlerinin sahip olduğu sarımsı renkle ilişkili olan LAAO, hidrojen peroksit ve amonyum salınımı ile L-amino asitlerin karşılık gelen α -keto asitlere oksidatif deaminasyonunu kataliz eden bir flavoproteindir. Çeşitli pH ve sıcaklıklarda aktif olabilen yılan zehri LAAO enzimlerinin yapıları ve izoelektrik noktaları da çeşitlilik göstermektedir [27-31].

Bazı LAAO enzimleri güçlü trombosit kümeleşme engelleyiciliği sağlarken bazı LAAO izoformları trombosit kümeleşmesini indükler. Çoğu yılan zehri LAAO'ları homodimerik olup 50-70 kDa ağırlığında alt birimleri olan moleküllerdir. Enzim doğal formunda ise 110-159 kDa'lık moleküler kütleyle sahip olmaktadır. Enzimin kofaktörü riboflavin zehre sarımsı rengini vermektedir [26]. L-amino asit oksidazlar hemoliz, kanama, ödem, apoptoz ve sitotoksitesiyi indükler, antitümör ve antiviral etkiler gösterir [5,6]. Yılan zehri LAAO'ları farklı türlere ait zehirlerde iyi çalışılmış bir enzim grubudur. Viperidae, Crotalidae ve Elapidae familyaları gibi zehirli hayvan gruplarında tüm zehrin yaklaşık %1-9'unu oluşturmaktadır. Yılan zehirlerinde bulunan LAAO'lar ayrıca flavin kofaktörünün hidrojen peroksit üretimi sonucuyla zehir toksisitesini de güçlendirmektedir [31].

2. 3. Hyaluronidazlar

Hyaluronidaz, hyaluronik asidi (HA) parçalayan bir enzimdir. Hyaluronik asit, bağ dokuda hücre dışı matrisin (ECM) başlıca bileşeni olup kan damarlarını da çevrelemektedir. Hyaluronik asit bağlayıcı özellik taşır, tekrarlayan bir disakkarit birimine sahip negatif yüklü polisakkarit içeren uzun bir glikozaminoglikandır [32].

İntegral protein sınıfından olan hyalüronan sentaz enzimi tarafından sentezlenmektedir. İnsan vücudunda gelişim, bakım ve iyileştirme üzerinde görevi bulunmaktadır. Spermin yumurtaya tutunmasını sağladığı için sperm asidi olarak da bilinmektedir [32,33]. Testisler, beyin, kıkırdak, plasenta, rahim, gözyaşı, deri, eklem sıvısı gibi yapılar HA içermektedir [32,34].

Hyaluronidazlar başlıca hyaluronik asidi parçalayan endo- β -glikosidazlar olsa da kondroitin ve kondroitin sülfatını ECM yapısında oligosakkaritlere ve N-asetilglikozamine de indirgemektedir [34]. Hayvan zehirlerinde yaygın olarak bulunan hyaluronidazlar avlarının hücre dışı matrisinin bütünlüğünü bozarak toksinlerin hızla yayılmasına neden olur. Bu yüzden hyaluronidazlara “yayılma faktörü” de denmektedir. Hyaluronidaz aktivitesi yılanların, örümceklerin, akreplerin, arı, yaban arısı, balıkların ve kertenkelelerin zehirlerinde tespit edilmiştir [7,8,35-37]. Hyaluronidazların kendilerinin toksik etkisi olmayıp dolaylı olarak toksinlerin etkinliğini arttırlar ve bu sayede ısırık bölgesinde kalıcı tahribata veya avının sistemik anlamda çökmesine yardımcı olurlar [33]. Hyaluronidazların moleküler ağırlıkları, pH optimumları ve substrat özgülükleri farklılık göstermektedir.

2. 4. Fosfodiesterazlar (PDE)

Fosfodiesterazlar (PDE), monomerik, homodimerik ve heterodimerik yapıda olan yüksek moleküler kütleli metalloglikoproteinlerdir. Moleküler kütlesi 90-160 kDa ağırlığında olabilmektedir [9,10]. Viperidae ve Crotalidae ailesinde yüksek miktarda PDE bulunurken Elapidae ve Hydrophidae ailesinde az miktarda bulunmaktadır [9-11,38]. Fosfodiesterazlar polinükleotitlerin fosfodiester bağımlı hidroliz ederler. Aynı zamanda DNA ve RNA, adenosin, nikotinamid adenin (NAD) ve nikotinamid guanin dinükleotidi (NGD) oluşturmak için adenosin trifosfat (ATP) ve adenosin difosfatı (ADP) hidrolize edebilmektedir [9].

Fosfodiesterazlar aynı zamanda hücrelerde siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfatın (cGMP) bozunmasıyla siklik nükleotit aracılı hücre sinyalleşmesinin temel düzenleyicisi konumundadırlar [11,38]. Fosfodiesterazlar hücre farklılaşması, kas kasılması, iyon kanal işlevi, apoptoz, glukoneogenez gibi birçok

biyolojik süreçlerde rol oynar. Tıp alanında kardiyak veya vasküler ilişkili hastalıklar, Alzheimer hastalığı, inflamatuvar, erektil disfonksiyon gibi hastalıklarda tedavi amaçlı potansiyel terapötik aday olarak da kullanılmaktadır. Bunlardan ötürü ilaç geliştirme konusunda iyi bir hedef olabilmektedir. Ayrıca yılan zehrinde bulunan PDE enzimleri ADP'yi hidrolize ederek ADP'nin neden olduğu trombosit agregasyonuna karşı güçlü inhibitör etki göstermektedir [11]. İnhibitör duyarlılığına karşılık, protein sekanslarına göre, substrat spesifikliğine göre ve farmakolojik özelliklerine göre sınıflandırılabilirler [9,10].

2. 5. *Macrovipera lebetinus* (Koca Engerek) (LINNAEUS, 1758)

Macrovipera lebetinus (Koca Engerek) (LINNAEUS, 1758) Viperidae ailesine ait zehirli bir yılan türüdür. Farklı alt türler ile dünya genelinde nispeten geniş bir yayılışa sahiptir. İnsan için tehlike oluşturan, küçük kemirici hayvanları ise dakikalar içerisinde öldürebilen bir zehre sahiptir [39].

2. 5. 1. Morfoloji

Çoğu zaman boyları 1 metrenin üzerinde olup 2 metreyi geçebilirler. Türkiye ve Kıbrıs'ın en büyük, en zehirli ve en kalın engerek türüdür. Ağırlıkları 3 kg kadar olabilmektedir. Başın ucu küt olup boynu biraz incelmış görünümündedir. Başının üst tarafı karinalı küçük pullarla örtülüdür. Gözbebeği dikey haldedir. Üst tarafları gri, esmer kahverengi olup orta kısımları kırmızımsıdır (Resim 2. 1.). Kuyrukları kısa olup aniden uca doğru sivrileşmektedir. Rahatsız edilmedikçe saldırgan değildir. Yavaş hareket etmektedirler [39,40].

2. 5. 2. Taksonomisi

Macrovipera lebetinus türünün şimdiye kadar tanımlanmış farklı alt türleri bulunmaktadır. *Macrovipera lebetinus*'un Linnaeus tarafından ilk kez tanımlanmasının ardından türün taksonomisi birçok kez değişiklik göstermiş olsa da günümüzde genel olarak kabul edilen alt türler; *M. l. lebetinus*, *M. l. obtusa*, *M. l. transmediterranea*, *M. l. turanica* ve *M. l. chernovi*'dir. Tanımlanan bazı alt türlerinin (*M. l. euphratica* ve *M. l. peilei*) geçerliliği tartışmalıdır. *Macrovipera lebetinus* Türkiye'de *M. l. obtusa* ve

Kıbrıs'ta *M. l. lebetina* alt türleri ile dağılışı göstermektedir [39,40]. Türün taksonomik konumu hiyerarşik düzende aşağıda belirtilmiştir:

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Reptilia

Takım: Squamata

Alt takım: Serpentes

Aile: Viperidae

Cins: *Macrovipera*

Tür: *Macrovipera lebetinus* (LINNAEUS, 1758)



Resim 2. 1 *Macrovipera lebetinus obtusa*'nın genel görünümü (Fotoğraf: Naşit İĞCİ)

2. 5. 3. Ekolojisi ve coğrafi dağılışı

Koca Engerek Batı ve Orta Asya'dan Kuzey Afrika'ya kadar dağılışı gösterir. Türkiye'de *M. lebetinus obtusa* alt türü bulunurken Kıbrıs'ta *M. l. lebetinus* alt türü görülmektedir. Ülkemizde Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde (Sivas ilinden de kayıt bulunmaktadır), Doğu Akdeniz bölgesinde Anamur'a kadar dağılım göstermektedirler.

Deniz seviyesinden 2000 m yüksekliklere kadar görülebilirler. Genellikle ormansız, düz ova ve taşlık kısımlarda yaşarlar. Tarla ve bahçelerde de görülebilirler [24,39,40]. Beslenmelerini kuşlar, büyük olmayan kemiriciler, kertenkele ve yılanlar ile yapmaktadırlar. Avlarını yemeden önce ısırıp zehrini aktarıp öldürürler, daha sonra yutarlar [24].



3. BÖLÜM

KAYNAK ÖZETLERİ

3. 1. *Macrovipera lebetinus* Zehri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Macrovipera lebetinus zehri protein yapıda toksinler, enzimler, enzim inhibitörleri ve biyoaktif peptitler barındıran bir karışım olduğu için zehri üzerinde günümüze kadar çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda türün zehrinden farklı özelliklerde enzimler, enzim olmayan proteinler ve peptitler saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Şimdiye kadar *M. lebetinus*'un farklı alt türlerinden saflaştırılan protein grupları aşağıda listelenmiştir [4]:

- Metalloproteinaz
- Serin proteinaz
- Fosfolipaz A₂
- L-amino asit oksidaz
- Hyaluronidaz
- Fosfodiesteraz
- 5'-Nükleotidaz
- Monomerik disintegrin
- Dimerik disintegrin
- Lebetin
- Sinir büyüme faktörü
- Vasküler endotelyal büyüme faktörü
- Sisteince zengin salgı proteini
- C-tipi lektin
- Bradikinin potansiye edici peptit
- Kunitz-tip proteaz inhibitörü
- Tripeptit proteaz inhibitörü

Saflaştırılan protein ve peptitler ile biyolojik aktivite çalışmaları yapılmış, *M. lebetinus* zehrinin antikanser, antikoagülan, antimikrobiyal, antianjiyogenik aktivite gibi özellikleri ortaya koyulmuştur [4]. Bu çalışmalara ait bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

Macrovipera lebetinus obtusa zehrinin nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığındaki potansiyel nöroproteksiyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada amiloid b peptidinin (Ab) intraserebroventriküler uygulamasından sonra sıçan hipokampus hücre yapılarının morfo-fonksiyonel durumu zehir enjekte edilen ve edilmeyen gruplarda karşılaştırılmıştır. Çalışmanın amacı *M. l. obtusa* zehrinin hücrelerin dejenere olmasını engelleyip engellemediğini araştırmaktır. Hipokampusün tüm alanlarına Ab enjekte

edilmiş ardından küçük dozlarla zehir enjekte edilmiştir. Sonuç olarak zehir enjekte edilen grupta nöronlarda pozitif yapısal değişiklikleri, metabolizmadaki artışı, nöronların yoğunluğundaki artışı ve Ca^{+2} bağımlı fosforilasyonun artışı ile hücrelerin sağkalımı gözlemlenmiştir. Zehrin küçük dozlarının nöroprotektif etkiler gösterdiğini ortaya koymuşlardır [41].

Başka bir çalışmada, moleküler ağırlığı 13 kDa olan MVL-PLA2 isimli asidik bir Asp49 fosfolipaz A₂ enzimi *M. l. transmediterranea* zehrinden karakterize edilmiş ve farklı tümör hücrelerine karşı anti-kanser etkileri ortaya koyulmuştur. MLV-PLA2'nin enzimatik aktivitesini anti-tümör etkisini etkilemeden ortadan kaldırarak yılan zehri fosfolipaz A₂'deki aktif bölgenin dışında farmakolojik bölgelerin varlığı tespit edilmiştir. MVL-PLA2'nin anti-tümör etkisine $\alpha 5\beta 1$ integrinlerin aracılık ettiği bulunmuştur [42].

Hovhannisyan ve arkadaşları *M. l. obtusa* zehrinin nosiseptif etkisinin mekanizmasını öğrenmek için çalışma yapmışlardır. Koca Engerek ısırıkları ağrıya neden olmaktadır. Fareler üzerinde yapılan deney sonucunda zehirde bulunan PLA₂'nin inhibe edilmesiyle ağrı davranışlarının azaldığı, dolayısıyla da zehirde bu enzimin ağrı oluşturmada önemli rol oynadığı ortaya koyulmuştur [43].

Yapılan diğer bir çalışmada iki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE) ile *M. l. lebetinus* ve *M. l. obtusa* zehirleri karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda *M. l. obtusa* zehrinden protein tanımlamak için matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon/uçuş süresi (MALDI-TOF) kütle spektrometresi kullanılarak protein tanımlaması yapılmıştır. Deney sonucunda *M. l. obtusa* için ilk kez yapılan 2D-PAGE ile iki alt türe ait ayırıcı özellikler istatistiksel olarak bulunmuştur. *M. l. obtusa*'da hyaluronidaz, LAAO, metalloproteinaz, serin proteinaz, PLA₂, CRISP gibi proteinler tanımlanmıştır [2].

3. 2. Yılan Zehirlerinde Bireysel Varyasyon

Yılan zehirlerinin türe, cinsiyete, yaşa, coğrafik bölgeye ve iklim koşullarına göre varyasyon gösterdiği bilinmektedir [16-20,44]. Bu kapsamda yılan zehirlerinde aynı

türün bireyleri arasında görülen bireysel varyasyonlar daha önce literatürde farklı türlerle yapılan çalışmalarda ortaya koyulmuştur.

Bu çalışmalardan birinde laboratuvar ortamında büyütülmüş birbiriyle kardeş *Bothrops jararaca* yılanlarının zehirleri biyokimyasal açıdan karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonunda protein içeriklerinde ve enzimatik aktivitelerde cinsiyete bağlı farklılıklar görülmüştür [17].

Benzer bir çalışma da *Bothrops atrox* türünde yapılmıştır ve cinsiyete özgü bazı farklılıklar görülse de protein profilleri, enzim aktiviteleri ve öldürücü dozları bakımından cinsiyetten bağımsız olarak bireysel varyasyon görüldüğü belirtilmiştir [18].

Crotalus durissus cumanensis (bir çingiraklı yılan türü) zehri üzerinde yapılan çalışmalarda farklı bölgelerden zehirler toplanarak bireysel varyasyon çalışması yapılmıştır. Protein profilleri ve kan pıhtılaşması üzerindeki etkileri yönünden yapılan araştırmada özellikle fibrinolitik ve hemorajik aktivitelerde farklılıklar görülmüştür [45].

4. BÖLÜM MATERYAL ve METOT

4. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tüm materyaller moleküler biyoloji çalışmalarında kullanıma uygundur ve Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4. 1. Deneyde kullanılan kimyasal maddelerin listesi

Kimyasal adı	Marka
Bis (4-nitropheny) phosphate	Sigma-Aldrich
Bradford reaktifi	Sigma
Hekzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB)	Sigma-Aldrich
Hdroxymethy hidroklorür (Tris HCl)	Sigma-Aldrich
Hyaluronik asit (HA)	Sigma
L-Amino asit (L-lösin)	Sigma-Aldrich
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	Merck
O-dianisidin dihidroklorür	Sigma-Aldrich
Sığır serum albümini	Thermo Scientific Pierce
Sodyum asetat	Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Ultra saf su	Sigma-Aldrich
Yaban turpu peroksidazı (HRP)	Thermo Scientific

4. 2. Kullanılan Alet ve Gereçler

Tüm alet ve gereçler kullanım kılavuzu takip edilerek titizlikle kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçler Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4. 2. Deneyde kullanılan alet ve gereçlerin listesi

Cihaz adı	Model / Marka	Kullanım amacı
Buzdolabı	Lovibond	Uygun malzemelerin saklanması
Buzdolabı (-80°C)	Thermo Scientific	Uygun malzemelerin saklanması
Etüv	Nüve FN 500	İnkübasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi
Hassas terazi (0,1 mg hassasiyetinde)	Bel Engineering, M214Ai	Örnek ve kimyasal tartılması
Istıcı	Shin Saeng	Çözeltilerin daha iyi çözdürülmesi
Karıştırıcı	Hot Stirrer Topo MS300HS	Çözeltilerin karıştırılması
Mikropipet seti (2, 20, 200 ve 1000 µl)	Thermo Scientific	Hacimce küçük örneklerin ölçülüp hazırlanması
pH metre	Hanna, HI2020-02	Çözeltilerin pH’larının ölçülmesi
Santrifüj/Vorteks (Karıştırıcı)	Biosan, Combi-spin, FVL-2400N	Örneklerin karıştırılıp çözdürülmesi
Spektrofotometre (UV/VIS)	PG Instruments T60	Protein miktarının belirlenmesi
Tüpler (1.5, 15 ve 50 ml)	ISOLAB	Çözeltilerin koyulması

4. 3. Kullanılan Zehirler

Deneyde kullanılan zehirlerin listesi, cinsiyetleri, uzunlukları ve toplandıkları yerler Tablo 4. 3'te yer almaktadır. Tüm zehirler uygun koşullar altında kullanılmıştır.

Tablo 4. 3. Çalışmada kullanılan bireylere ait bilgiler

Birey Kodu	Toplandığı Yer	Cinsiyet	Uzunluk (SVL)
1. Birey	Mengelen, Ceylanpınar	Dişi	87,0 cm
2. Birey	Mengelen, Ceylanpınar	Dişi	93,5 cm
3. Birey	Uzuncuk, Hilvan	Erkek	78,3 cm
4. Birey	Güzelkuyu, Eyyübiye	Dişi	62,9 cm
5. Birey	Mengelen, Ceylanpınar	Erkek	84,5 cm
6. Birey	Kelaynak Vadisi, Birecik	Dişi	74,1 cm
7. Birey	Demircik, Eyyübiye	Dişi	88,7 cm
8. Birey	Kapıkaya, Siverek	Dişi	82,2 cm
9. Birey	Kızılkuyu, Eyyübiye	Bilinmiyor	Bilinmiyor

4. 4. Zehir Sağımı, Saklanması ve Çalışmalar için Hazırlanması

Tez çalışmasında, tez danışmanı tarafından daha önceki çalışmalar için Şanlıurfa ilinden toplanmış 9 farklı erişkin *Macrovipera lebetinus obtusa* bireylerinden elde edilmiş liyofilize toz halindeki zehir örnekleri kullanılmıştır. Üzeri parafinle örtülü steril beherleri yılanın ısırması ile zehirler toplanmış ve dondurarak-kurutma ile toz haline getirilmiştir. Daha sonra toz halindeki zehirler deiyonize su ile çözdürülüp 8 mg/ml derişimde stok zehir çözeltisi hazırlanmıştır.

4. 5. Protein Miktar Tayini

Zehirdeki proteinlerin miktarının belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Liyofilize toz halindeki 9 farklı bireyin 8 mg/ml’lik hazırlanmış stok haldeki zehir çözeltisi ile miktar tayini yapılmıştır. Standart olarak 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml derişimlerdeki sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır. 19:1 (v/v) boya/örnek oranı olarak belirlenmiştir.

Tablo 4. 4. Protein miktar tayini için yapılan işlemler

50 µl BSA standartları + 950 µl boya	
50 µl zehir örnekleri + 950 µl boya	
Blank	50 µl ultra saf su + 950 µl boya

Tablo 4. 4’te verilen değerlere göre tüpler hazırlanmıştır. Boya eklendikten sonra örneklerin boya ile bağlanması için 15 dk. inkübasyona bırakılmış ve UV/VIS spektrofotometre cihazında (PG Instruments T60) 595 nm dalga boyunda blank’a karşı ölçümleri yapılmıştır. Örnekler üç tekrarlı olarak yapıp optik yoğunluk (OD) değerlerinin ortalamaları alınarak standart eğri grafiği oluşturulmuştur.

4. 6. L-Amino Asit Oksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Çalışmada LAAO enzim aktivitesini belirlenmek için UV/VIS spektrofotometre kullanılmıştır. LAAO enzim aktivitesi için kullanılan substratın (L-lösin) zamana karşı zehirle etkileşime girmesi esas alınmıştır. Toplam üç çözelti (kimyasal) hazırlanarak deneyler yapılmıştır. Bu çözeltiler Tris-HCl tamponu ile hazırlanmıştır. Tris-HCl, hidrokolik asit ile karıştırılmış tris bazı içeren bir tampon çözeltidir. O-dianisidin dihidroklorür kolorimetrik bir peroksidaz substratıdır, kullanılan yaban turpu peroksidazı (HRP) ile reaksiyona girmektedir. Bu reaksiyon için gerekli hidrojen

peroksit ise LAAO aktivitesi ile sağlanmaktadır. Bu şekilde aktivite miktarı ile alınan OD değerleri doğru orantılı olmaktadır [46,47].

Tablo 4. 5. L-amino asit oksidaz enzim aktivitesi için kullanılacak kimyasalların hazırlanması

Son Hacimler	20 ml	2 ml	3 ml	4 ml
0,2 M Tris HCl tamponu	4 ml	-	-	-
100 mM L-lösin	-	0,0262 g	-	-
1 mg/ml O-dianisidin dihidroklorür	-	-	0,003 g	-
1 mg/ml HRP	-	-	-	0,004 g

Tablo 4. 5'te verilen değerlere göre çözeltiler hazırlanmıştır. Tris-HCl tartılıp ultra saf suda çözülüp son hacim için 20 ml'ye tamamlanmıştır. pH 7.6'ya ayarlanmıştır. Diğer tamponlar ise hassas terazide tartılıp Tris-HCl tamponu ile son hacme tamamlanmıştır.

Tüm tüpler tablo 4. 6'da verilen tüp isimlerine göre etiketlenip ilgili tüplere sırası ile tamponlar eklenmiştir. Negatif kontrol tüpünü diğer zehir olan tüpler ile karşılaştırmak için ultra saf su eklenmiştir. Her dakikada bir 5 dk. boyunca Blank tüpüne karşı tüm tüplerden UV/VIS spektrofotometre cihazında 436 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Farkların ortalaması alınmış ve OD değerindeki 0.01'lik fark (artış) 1 birim olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4. 6. L- amino asit oksidaz enzim aktivitesi için tüplerin yapıma planı

Tamponlar/Tüpler	Örnek tüpleri	Negatif kontrol tüpü	Blank tüpü
Tris-HCL tamponu	613 µl	613 µl	1000 µl
O-dianisidin hidroklorür çözeltisi	200 µl	200 µl	-
L-lösin çözeltisi	100 µl	100 µl	-

Tablo 4. 6. Devam

1 mg/ml HRP çözeltisi	370 µl	370 µl	-
1 mg/ml zehir stoktan	50 µl	-	-
Ultra saf su	-	50 µl	-

Yapılan çalışmada 5 dk boyunca her ölçüm zamanında OD değerinin arttığı görülmüştür. İlk ölçüm ve son 5. dk ölçüm arasında dramatik bir fark vardır. Bu sonuç, zehirde bulunan LAAO enziminin hızlı bir şekilde aktivite gösterdiğini ortaya koymakta deneyin çalıştığını doğrulamaktadır.

4. 7. Hyaluronidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Çalışmada hyaluronidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi UV/VIS spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, ortamdaki oluşmuş bulanıklık derecesini ölçen turbidimetri yöntemine göre yapılmıştır. Ortam içindeki partiküllerin saçılması ile ortamda ışık yoğunluğu kaybı oluşup bu kaybın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Çalışmada kullanılan çözeltiler Tablo 4. 7'de verilmiştir. Asetat tamponu ortamın pH seviyesini istenilen değerde tutmaya yardımcı olarak, CTAB tamponu belli bir aşamadan sonra reaksiyonu durdurmak için ve substrat olarak ise hyaluronik asit (HA) çözeltisi kullanılmıştır.

Tablo 4. 7'de verilen asetat tamponunda kullanılacak olan sodyum asetat ve NaCl kimyasalları hassas terazide tartılıp steril bir behere aktarılmıştır. Son hacim için ultra saf su ile 200 ml'ye tamamlanarak karıştırıcı yardımı ile çözdürülmüştür. Ardından pH 6 olacak şekilde ayarlanmıştır. HA tamponu için kimyasal tartılıp ultra saf su ile son hacme tamamlanarak çözdürülmüştür. CTAB tamponu için öncelikle NaOH kimyasalı tartılıp biraz su ile çözdürülmüştür. Çözünmüş NaOH üzerine CTAB tartılarak çözdürülmüştür ve son hacim için ultra saf su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

Tablo 4. 7. Hyaluronidaz enzim aktivitesi için kullanılacak kimyasalların hesaplanmış işlemleri

Hyaluronik enzim çözeltisi	200 ml için	10 ml için
0,2 M Sodyum asetat tamponu	3,281 g	-
0,15 M NaCl	1,75 g	-
%2'lik NaOH	4 g	-
%2,5'luk CTAB tamponu	5 g	-
1 mg/ml Hyaluronik asit tamponu	-	0,01 g

Tüm tüpler Tablo 4. 8'de verilen tüp isimlerine göre etiketlenmiş ve ilgili her tüpe sırası ile sodyum asetat tamponu, HA stok tamponu ve ardından zehirler eklenmiştir. Tüplerin hazırlanma planı Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tüpler daha önceden ayarlanmış 37,5°C'lik etüve koyulup 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde her bir tüpe CTAB tamponu eklenmiştir. Blank 1'e karşı tüm tüpler spektrofotometre cihazında 400 nm'de okuma yapılmıştır. Diğer blank tüpleri ise, deneyde kullanılan farklı miktarlardaki zehrin kendisinden gelen bir bulanıklık olup olmadığını görmek amacıyla eklenmiştir. Deney 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır ve ortalama değerler kullanılmıştır.

Daha sonra elde edilen HA OD değerleri kullanılarak yılan zehri eklendikten sonra tüpte kalan kalan HA miktarının hesaplanabilmesi için kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Farklı konsantrasyonlarda zehir eklenen tüplerdeki OD değeri kullanılarak HA miktarları hesaplanmıştır, başlangıç miktarına göre azalış % değeri olarak belirlenmiş ve her bir bireyin beş farklı zehir konsantrasyonu için bu değerler kullanılarak bireylere ait IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4. 8. Hyaluronidaz enzim aktivitesi için tüplerin hazırlanma planı

Tüp isimleri	Sodyum asetat tamponu	8 mg/ml zehir stoktan	1 mg/ml HA stoktan	CTAB solüsyonu
160 µg zehir	430 µl	20 µl	50 µl	1000 µl
80 µg zehir	440 µl	10 µl	50 µl	1000 µl
40 µg zehir	445 µl	5 µl	50 µl	1000 µl
20 µg zehir	447,5 µl	2,5 µl	50 µl	1000 µl
10 µg zehir	448,7 µl	1,25 µl	50 µl	1000 µl
HA 50 µg	450 µl	-	50 µl	1000 µl
HA 25 µg	475 µl	-	25 µl	1000 µl
HA 12,5 µg	487,5 µl	-	12,5 µl	1000 µl
HA 6,25 µg	493,7 µl	-	6,5 µl	1000 µl
Blank 1	500 µl	-	-	1000 µl
Blank 2	480 µl	20 µl	-	1000 µl
Blank 3	490 µl	10 µl	-	1000 µl
Blank 4	495 µl	5 µl	-	1000 µl
Blank 5	497,5 µl	2,5 µl	-	1000 µl
Blank 6	498,7 µl	1,25 µl	-	1000 µl

4. 8. Fosfodiesteraz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Çalışmada fosfodiesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi UV/VIS spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada pH dengesi için Tris-HCL ve enzimlerin çalışması için MgCl₂ tamponları, substrat olarak bis phosphate (nitropheny) ve reaksiyonu durdurmak için NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

Tablo 4. 9. Fosfodiesteraz enzim aktivitesi için kullanılacak kimyasalların hesaplanmış işlemleri

Fosfodiesteraz enzim çözeltisi	10 ml	8 ml	50 ml
10 mM MgCl ₂	0,0203 g	-	-
0,1 M Tris HCl	0,1211 g	-	-
10 mM Nitrophenyl tamponu	-	0,0272 g	-
0,1 M NaOH (3 M stoktan) tamponu	-	-	1,66 ml

Tablo 4. 9’de verilen değerlere göre tüm kimyasallar hassas terazide tartılmıştır. Tris-HCl ve MgCl₂ bir steril behere alınarak son hacim 10 ml’ye ultra saf su ile tamamlanarak çözdürülmüştür. Ardından pH 8.8 olacak şekilde asit baz dengesi sağlanarak ayarlanmıştır. Daha sonra tartılan Nitrophenyl üzerine Tris-HCl + MgCl₂ tamponu ile son hacim 8 ml’ye tamamlanmıştır. Önceden hazırlanmış 3 M stok NaOH’dan 0,1 M 50 ml için 1660 µl olarak ayarlanmıştır.

Tüm tüpler Tablo 4. 10’da verilen tüp isimlerine göre hazırlanmıştır. Tüplere sırası ile tamponları koyulmuştur fakat örnek tüpleri ve negatif tüplere NaOH tamponu inkübasyon sonrası eklenmiştir. Blank tüpüne zehir ve NaOH tamponu eklenmemiştir. Negatif tüpüne ise yine aynı sebepten dolayı zehir eklenmemiştir.

Yapılan çalışma ile yılan zehrinde bulunan fosfodiesteraz enziminin substrat ile reaksiyona girerek oluşan renk ölçülmüş ve değerlendirilmiştir. Tüm tüplerin etkileşime girebilmesi için NaOH tamponu eklenmeyerek hazırlandıktan sonra önceden hazırlanmış 37°C etüvde 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnek tüplere ve negatif tüpe NaOH tamponu eklenerek karıştırılmıştır. Ardından tüplerin blank tüpüne karşı spektrofotometre cihazında 405 nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır.

Tablo 4. 10. Fosfodiesteraz enzim aktivitesi için tüplerin hazırlanma planı

Tamponlar/tüpler	Örnek tüpleri	Negatif kontrol tüpü	Blank tüpü
Nitropheny tamponu	200 µl	200 µl	200 µl
1 mg/ml zehir	50 µl	-	-
Tris-HCL+MgCl₂ tamponu	-	-	1300 µl
0,1 M NaOH tamponu	1250 µl	1250 µl	-
Ultra saf su	-	50 µl	-

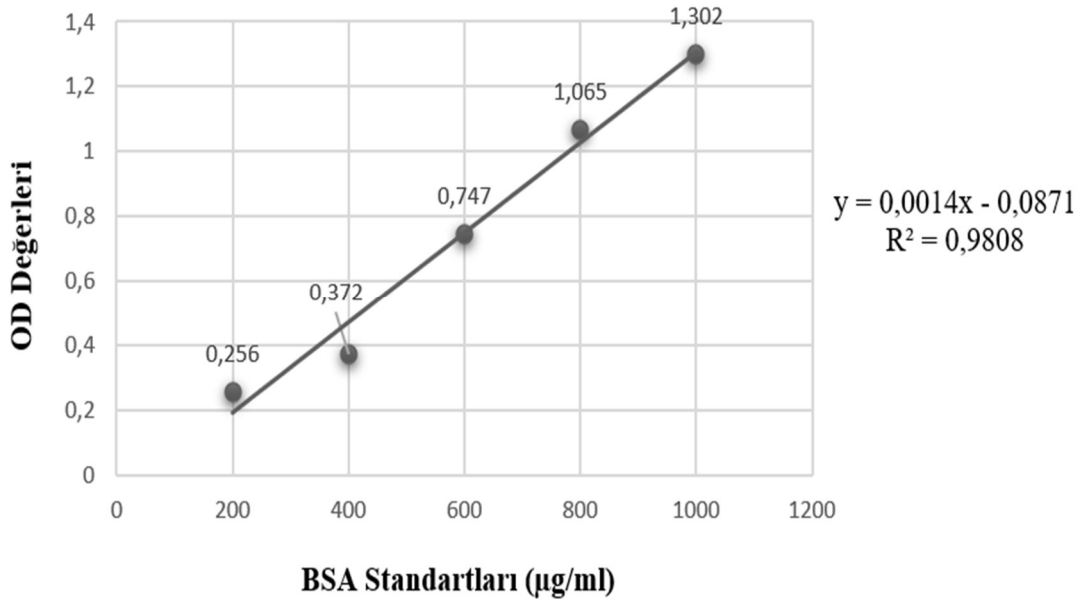
5.BÖLÜM

BULGULAR

5. 1. Protein Miktar Tayini

Bireysel zehirlerin protein miktarının belirlenmesinde Bradford yöntemi kullanılmıştır. Standart olarak tercih edilen BSA proteini için oluşturulan kalibrasyon eğri grafiği Şekil 5.1’de görülmekte olup R^2 değerinin 1’e yakın (>0.98) olması hesaplamanın güvenilir olduğunu göstermektedir. Grafikten elde edilen $y = 0,0014x - 0,0871$ eğim denkleminde y yerine *M. lebetinus* zehirlerinin ortalama OD değerlerinin yazılmasıyla x değeri bulunmaktadır. Buradaki x değeri zehirlerde bulunan protein miktarını belirtmektedir.

Bu hesaplama yöntemi ile çalışmalarda kullanılan *M. lebetina* zehirlerindeki protein miktar tayini sonuçları Tablo 5.1’de verilmiştir.



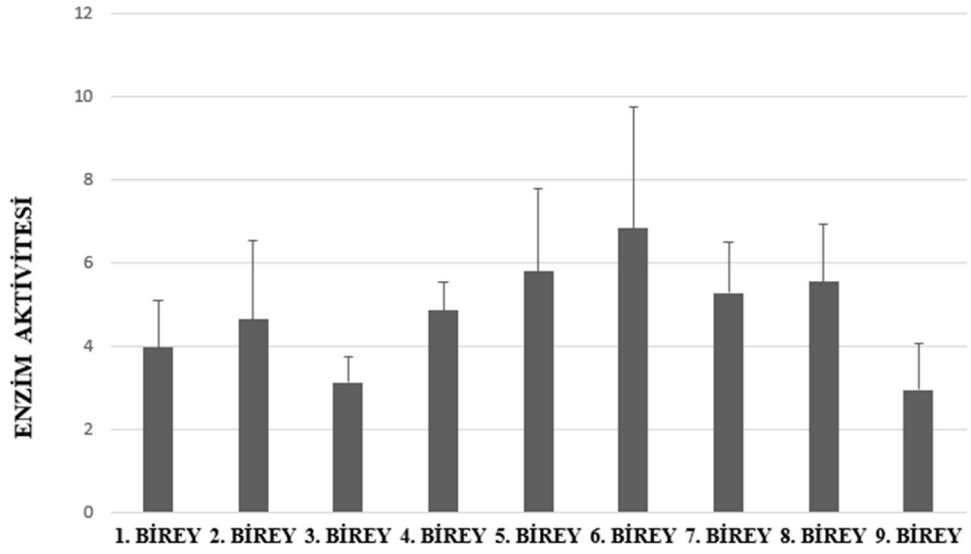
Şekil 5. 1. Standartların kullanılıp oluşturulduğu Bradford standart eğri grafiği

Tablo 5. 1. Bradford protein miktar tayini sonuçları

Örnekler	Protein konsantrasyonları (mg/ml)
Birey 1	4,76
Birey 2	3,29
Birey 3	3,64
Birey 4	3,90
Birey 5	3,58
Birey 6	6,52
Birey 7	5,09
Birey 8	7,79
Birey 9	4,74

5. 2. L-Amino Asit Oksidaz Enzim Aktivitesi

L-amino asit oksidaz enzim aktivitesi için spektrofotometre cihazında ölçüm yapılmıştır. Ölçümler sonucunda örneklerden elde edilen OD değerleri kullanılarak Materyal ve Metot kısmında belirtildiği şekilde hesaplanan birim değerleri ile sütun grafiği oluşturulmuştur (Şekil 5. 2). Her bir örnek tüplerden negatif kontrol çıkarılmıştır ve her bir 0,01'lik fark 1 birim olarak ifade edilmiştir. Hesaplanan tüm birim değerleri ayrıca Tablo 5. 2'de de verilmiştir. Bu değer tür bireylerde 4,74 – 10,78 arasında değişmektedir.



ÖRNEKLER

Şekil 5. 2. Örneklerin L-amino asit oksidaz enzim aktiviteleri kullanılarak oluşturulan sütun grafiği

Tablo 5. 2. L-amino asit oksidaz enzim aktivite sonucu elde edilen birim değer ortalaması ve her birinin standart sapması

Örnek isimleri	Ortalama / Standart sapma
Birey 1	6,8 ± 1,12
Birey 2	7,34 ± 1,92
Birey 3	5,64 ± 0,60
Birey 4	9,02 ± 0,68
Birey 5	9,62 ± 1,97
Birey 6	10,78 ± 2,90
Birey 7	9,38 ± 1,21
Birey 8	9,74 ± 1,38
Birey 9	4,74 ± 1,13

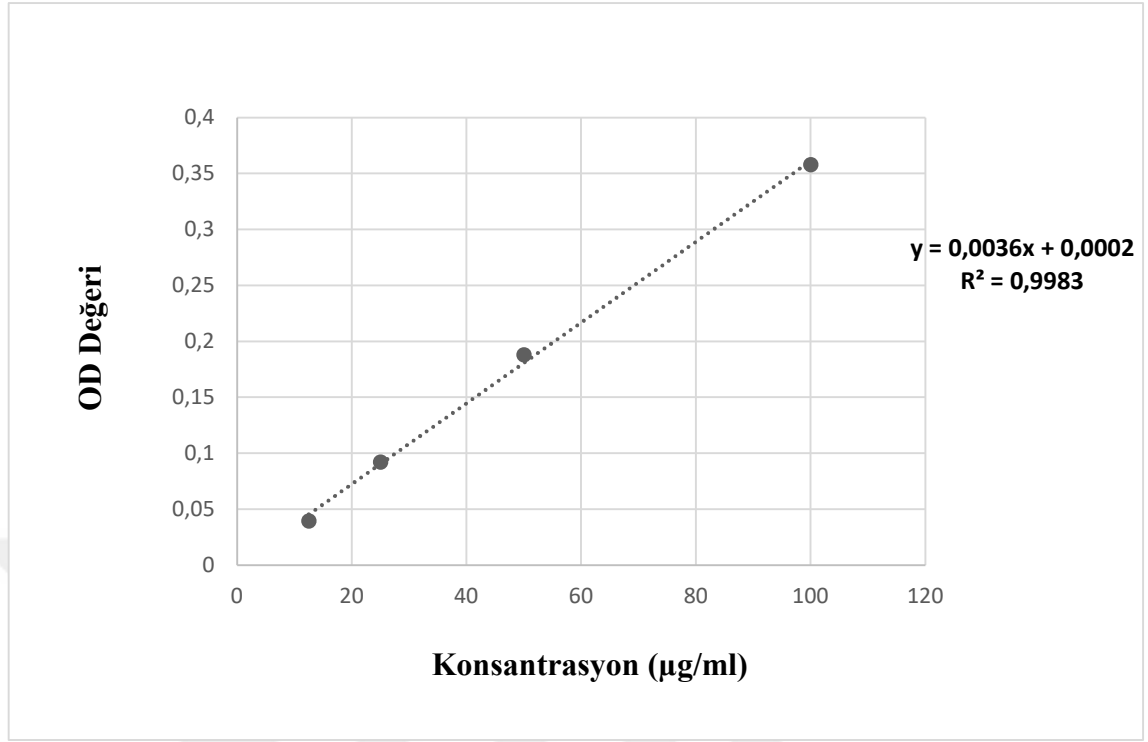
Şekil 5. 2’de *Macrovipera lebetinus* zehrinin LAAO enzim aktiviteleri görülmektedir. Bu sütun grafiklerinden yola çıkarak *Macrovipera lebetinus* zehrinde bireysel varyasyonun olduğu görülmektedir. 9 farklı zehir arasında en çok aktivite gösteren Birey 6 iken en az aktivite gösteren Birey 9 olmuştur. Sırası ile en fazla Birey 6, Birey 5, Birey 8, Birey 7, Birey 4, Birey 2, Birey 1, Birey 3 ve Birey 9’dur.

Spektrofotometrede 5 dk boyunca her dakikada bir ölçüm yapılmıştır. Süre geçtikçe kullanılan substrat miktarının arttığı görülmüştür. Negatif kontrol tüpü içerisine zehir koyulmamıştır ve zehir koyulmayan bu tüpte süre ile birlikte OD değerinde bir artış görülmemiştir. Zehir koyulmayan, negatif kontrol tüpünün yapılma amacı zehrin enzimle birlikte gösterdiği aktiviteden ziyade diğer tamponların herhangi bir aktivite gösterip göstermediğini anlamaktır.

5. 3. Hyaluronidaz Enzim Aktivitesi

Hyaluronidaz enzim aktivitesi için spektrofotometre cihazında turbidimetri yöntemine dayanan ölçüm yapılmıştır. Ölçümler sonucunda her bir birey için elde edilen OD değerleri kullanılarak farklı zehir konsantrasyonlarına ait HA miktarları hesaplanmış, bunların azalışları % olarak ifade edilmiş ve IC₅₀ değerleri bulunmuştur. HA miktar hesaplaması için oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 5.3’te görülmektedir. Hesaplanan R² değerinin 0.99 olması yapılacak miktar tayininin yüksek doğrulukta olacağını göstermektedir.

Saf HA konsantrasyonları kullanılarak kalibrasyon eğri grafiği oluşturulmuştur. Y yerine OD değerleri yazılarak X değeri bulunmuştur. X değeri ise hyaluronik asit miktarını (µg/ml) belirtmektedir. Ardından zehir koyulduktan sonra ne kadar hyaluronik asit kaldığı hesaplanmıştır. Hyaluronik asit miktarı ile hyaluronik asit parçalanması yani inhibisyonu (%) belirlenmiştir. Ardından aat bioquest IC₅₀ calculator programı kullanılarak µg/ml cinsinden IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalara ait değerler her bir birey için Tablo 5.3-5.11’de verilmiştir. Tablolardaki değerlere bakıldığında zehir konsantrasyonu arttıkça parçalanmış HA miktarının arttığı görülmüştür. Hesaplanan IC₅₀ değerleri ise, koyulan HA’nın %50’sini parçalayan zehir dozunu ifade etmektedir.



Şekil 5. 3. Hyaluronik asit konsantrasyonu ve hyaluronik asit tekrarlarının ortalaması kullanılarak oluşturulan eğri grafiği

Tablo 5. 3. Birey 1'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler

Konsantrasyon (µg/ml)	Hyaluronik asit miktarı (µg/ml) ortalaması	Hyaluronik asit parçalanması (inhibisyonu) (%)	IC ₅₀ değeri
320	2,04	97,95	99,66
160	26,14	73,85	
80	60,60	39,39	
40	90,44	9,55	
20	112,74	0	

Tablo 5. 4. Birey 2'ye ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler

Konsantrasyon (µg/ml)	Hyaluronik asit miktarı (µg/ml) ortalaması	Hyaluronik asit parçalanması (inhibisyonu) (%)	IC ₅₀ değeri
320	0,80	99,19	98,7
160	20,19	79,80	
80	63,69	36,30	
40	99,80	0,19	
20	117,27	0	

Tablo 5. 5. Birey 3'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler

Konsantrasyon (µg/ml)	Hyaluronik asit miktarı (µg/ml) ortalaması	Hyaluronik asit parçalanması (inhibisyonu) (%)	IC ₅₀ değeri
320	21,99	78,00	184,4
160	59,41	40,58	
80	91,39	8,60	
40	107,66	0	
20	125,19	0	

Tablo 5. 6. Birey 4'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler

Konsantrasyon (µg/ml)	Hyaluronik asit miktarı (µg/ml) ortalaması	Hyaluronik asit parçalanması (inhibisyonu) (%)	IC ₅₀ değeri
320	24,34	75,65	81,67
160	10,22	89,77	
80	62,37	37,62	
40	94,69	5,30	
20	110,02	0	

Tablo 5. 7. Birey 5'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler

Konsantrasyon (µg/ml)	Hyaluronik asit miktarı (µg/ml) ortalaması	Hyaluronik asit parçalanması (inhibisyonu) (%)	IC ₅₀ değeri
320	12,99	87,00	101,13
160	20,29	79,70	
80	72,11	27,88	
40	98,28	1,71	

Tablo 5. 8. Birey 6'ya ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler

Konsantrasyon (µg/ml)	Hyaluronik asit miktarı (µg/ml) ortalaması	Hyaluronik asit parçalanması (inhibisyonu) (%)	IC ₅₀ değeri
320	0	100	60,88
160	23,51	76,48	
80	29,72	70,27	
40	75,63	24,36	
20	106,73	0	

Tablo 5. 9. Birey 7'ye ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler

Konsantrasyon (µg/ml)	Hyaluronik asit miktarı (µg/ml) ortalaması	Hyaluronik asit parçalanması (inhibisyonu) (%)	IC ₅₀ değeri
320	7,86	92,13	125,04
160	35,73	64,26	
80	74,40	25,59	
40	107,25	0	
20	113,46	0	

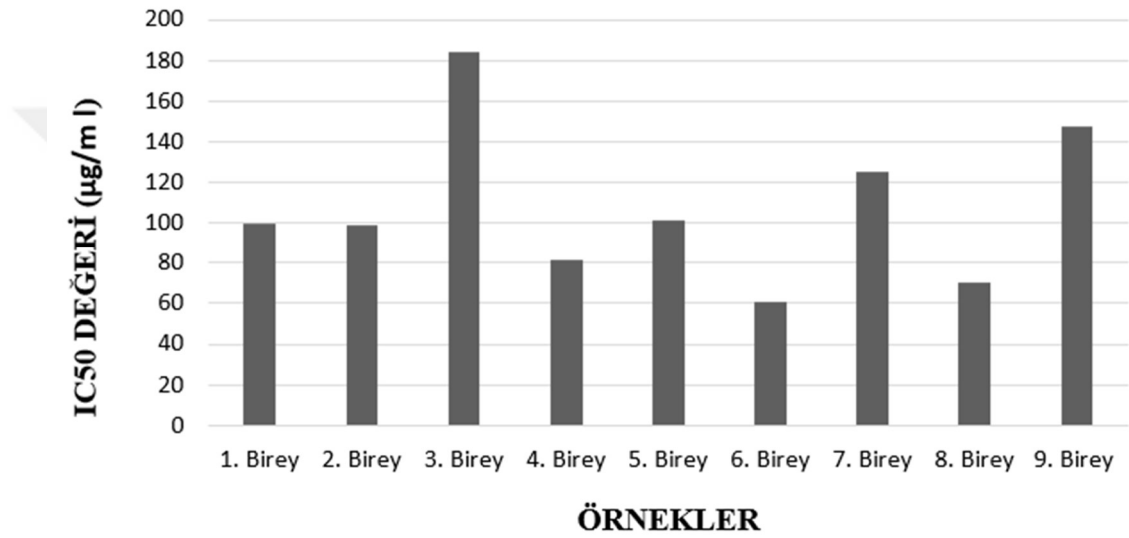
Tablo 5. 10. Birey 8'e ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler

Konsantrasyon (µg/ml)	Hyaluronik asit miktarı (µg/ml) ortalaması	Hyaluronik asit parçalanması (inhibisyonu) (%)	IC ₅₀ değeri
320	1,08	98,91	70,46
160	10,45	89,54	
80	42,46	57,53	
40	81,48	18,51	
20	107,93	0	

Tablo 5. 11. Birey 9'a ait hyaluronidaz aktivite için elde edilen değerler

Konsantrasyon (µg/ml)	Hyaluronik asit miktarı (µg/ml) ortalaması	Hyaluronik asit parçalanması (inhibisyonu) (%)	IC ₅₀ değeri
320	18,67	81,32	147,24
160	45,78	54,21	
80	80,79	19,20	
40	104,13	0	
20	116,92	0	

Şekil 5.4'te ise bireylere ait elde edilen IC₅₀ değerleri sütun grafiği şeklinde verilmiştir. IC₅₀ değeri az olan bireylerin daha düşük dozda zehrin %50'sinin parçalandığı dolayısıyla daha aktif olduğu yönünde bir değerlendirme yapılabilir. Bu anlamda en etkili olan 6. Birey iken (IC₅₀ = 60.88 µg/ml) az etkili olan ise 3. Birey (IC₅₀ = 184.4 µg/ml) olarak görünmektedir. Sırası ile etkili olan zehirlerin 6. Birey, 8. Birey, 4. Birey, 2. Birey, 1. Birey, 5. Birey, 7. Birey, 9. Birey ve 3. Birey'dir.



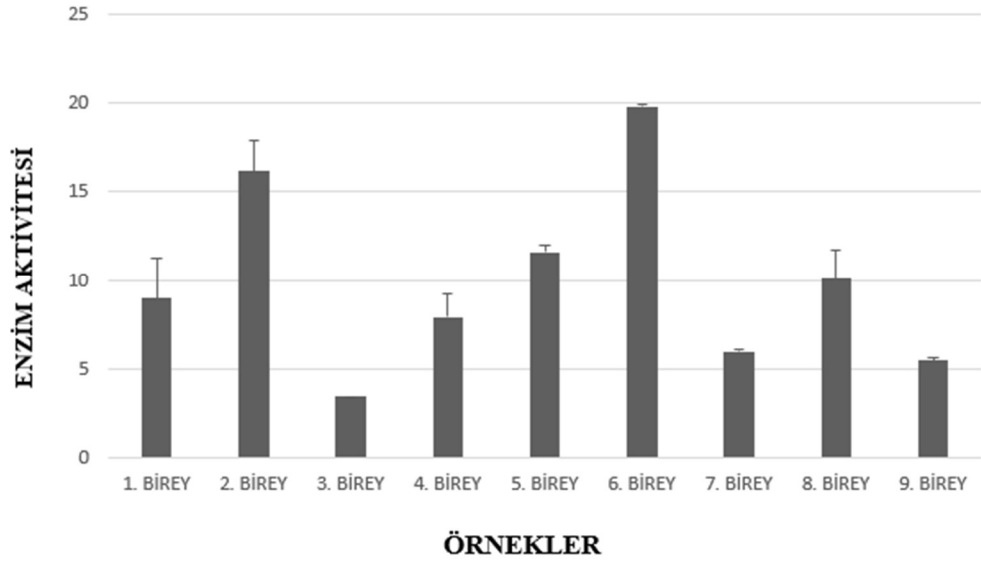
Şekil 5. 4. Örneklerin hyaluronidaz enzim aktiviteleri kullanılarak oluşturulan sütun grafiği

5. 4. Fosfodiesteraz Enzim Aktivitesi

Fosfodiesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi için spektrofotometre cihazında ölçüm yapılmıştır. Üç tekrarlı olarak elde edilen OD değerlerinin ortalaması alınmış ve karşılaştırmada kolaylık olması açısından değerlerin 10 katı verilmiştir (yani her 0.1'lik OD değeri 1 birim olarak hesaplanmıştır). Ölçümler sonucunda elde edilen bu değerler Tablo 5.12'de verilmiştir.

Tablo 5. 12. Fosfodiesteraz enzim aktivite sonucu elde edilen birim değer ortalaması ve her birinin standart sapması

Örnek isimleri	Ortalama / Standart sapma
Birey 1	8,96 ± 2,27
Birey 2	16,18 ± 1,73
Birey 3	3,42 ± 0,02
Birey 4	7,91 ± 1,31
Birey 5	11,58 ± 0,38
Birey 6	19,80 ± 0,13
Birey 7	5,95 ± 0,09
Birey 8	10,05 ± 1,69
Birey 9	5,43 ± 0,22



Şekil 5. 5. Örneklerin fosfodiesteraz enzim aktiviteleri kullanılarak oluşturulan sütun grafiği

Ayrıca Şekil 5.5'te elde edilen aktivite değerlerini karşılaştırmalı bir şekilde inceleyebilmek için sütun grafiği de verilmiştir. Bu sütun grafiklerinden yola çıkarak *M. lebetinus* zehrinde bireysel varyasyonun olduğu ve birbirleri içerisindeki farkları görülebilmektedir. Birim değerler tür bireylerde 3,42 – 19,96 arasında değişmektedir. En fazla enzim aktivitesi Birey 6'da görülürken en az enzim aktivitesi Birey 3'de görülmüştür. Bireyler arasındaki farklılıklar beslenme, yaşayış yerlerine göre değişkenlik göstermektedir. Sırası ile en fazla Birey 6, Birey 2, Birey 5, Birey 8, Birey 1, Birey 4, Birey 7, Birey 9 ve Birey 3'dür.

Negatif kontrol tüpü içerisinde zehir koyulmamıştır. Zehir koyulmayan bu tüpte herhangi bir aktivite olup olmadığına bakılmıştır ve tamponlardan bulaşma ile gelen bir aktivite görülmemiştir.

6. BÖLÜM

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yılan zehirleri peptit tabanlı ilaç keşiflerinde oldukça iyi bir kaynak olabilmektedir. Bu yüzden yılan ısırıkları sağlık sorunu olsa da yılan zehri son yıllarda dünya genelinde yaygın bir araştırma konusu olmuştur. Buna paralellik göstererek yılan zehri ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı da artış göstermektedir. Türkiye’de ise *Viperidae* familyasına dahil engerek türleri fazla bulunduğu için ve en fazla vaka görülen türlerden biri olması üzerine *Macrovipera lebetinus* (Koca Engerek) yılan zehrinin enzimlerinin bireysel varyasyonu LAAO, hyaluronidaz ve fosfodiesteraz enzim aktiviteleri açısından incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında, birbirine çok yakın noktalardan toplanmış olsalar dahi *M. lebetinus* zehrinde incelenen enzim aktiviteleri açısından bir varyasyon olduğu açıkça görülmektedir. Literatürde konu ile ilgili çalışmalar incelendiğinde yılan zehirlerinin yaş, cinsiyet, diyet, ekolojik koşullar, coğrafi bölge gibi faktörlere bağlı olarak bireysel varyasyon gösterebileceği belirtilmiştir [16-20,44,45,48-50].

Yapılan bu çalışmada 9 farklı bireye ait zehir kullanılmıştır ve bireylerin boylarına bakıldığında nispeten birbirine yakın erişkin bireyler olduğu söylenebilir. Yılanların boyu yaşla birlikte uzamaktadır bu nedenle tez çalışmasında yaşa bağlı varyasyona yönelik veri elde etmek için uygun örneklem bulunmamaktadır. Ancak yine de mevcut uzunluk verileriyle enzim aktiviteleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayısı ile değerlendirilmiş ve anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bunun dışında, bireylerden 2 tanesi erkek, 6 tanesi ise dişidir. Elde edilen veriye bakıldığında özellikle erkek bireylerin zehrini her iki örnekte de ayıran belirgin bir fark görülmemiştir ancak örnek sayısının artırılmasıyla yaşa bağlı varyasyon daha iyi ortaya koyulabilir. İklimsel faktörlerin ise bu çalışma sonucunda görülen varyasyona önemli bir etkisinin olacağı düşünülmemektedir. Çünkü bireyler aynı iklimsel özelliklere sahip birbirine yakın alanlardan toplanmıştır.

Yukarıda bahsedilen değerlendirmelere ek olarak, zehir enzim aktivitelerinin protein konsantrasyonları ile ilişkili olup olmayacağı sorusu düşünülmüştür. Çünkü protein

miktarları da bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bu soruyu cevaplamak için korelasyon analizi yapılmış ve Pearson korelasyon katsayılarının kareleri hesaplanmıştır. Yapılan hesaplama sonucunda protein miktarı ile LAAO, fosfodiesteraz ve hyaluronidaz aktiviteleri arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir ($p > 0.05$, r^2 sırasıyla 0,21; 0,05; 0,24). Ancak aşağıda verilen Tablo 6. 1’de toplu bir şekilde sunulmuş protein miktar ve enzim aktivite değerleri istatistiki analizden bağımsız olarak incelendiğinde, bir ilişkinin olabileceği ve daha fazla örnek içeren kapsamlı çalışma ile daha net bir istatistiğin ortaya çıkabileceği görülmektedir.

Tablo 6. 1. Deneyde yapılan tüm aktivitelerin birim ortalamaları, standart sapmaları ve protein konsantrasyon değerleri

Örnekler / Enzimler	Protein konsantrasyonları (mg/ml)	LAAO Ortalama \pm Standart sapma	Hyaluronidaz IC ₅₀ Değeri	Fosfodiesteraz Ortalama \pm Standart sapma
Birey 1	4,76	6,8 \pm 1,12	99,66	8,26 \pm 2,27
Birey 2	3,29	7,34 \pm 1,92	98,7	16,18 \pm 1,73
Birey 3	3,64	5,64 \pm 0,60	184,4	3,42 \pm 0,02
Birey 4	3,90	9,02 \pm 0,68	81,67	7,91 \pm 1,31
Birey 5	3,58	9,62 \pm 1,97	101,13	11,58 \pm 0,38
Birey 6	6,52	10,78 \pm 2,90	60,88	19,80 \pm 0,13
Birey 7	5,09	9,38 \pm 1,21	125,04	5,95 \pm 0,09
Birey 8	7,79	9,74 \pm 1,38	70,46	10,05 \pm 1,69
Birey 9	4,74	4,74 \pm 1,13	147,24	5,43 \pm 0,22

Tablo 6. 1 incelendiğinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- L-Amino asit oksidaz enzimi için en fazla birey 6 iken en az birey 3 aktivite göstermiştir.
- Hyaluronidaz enzimi için en fazla birey 6 iken en az birey 3 aktivite göstermiştir.
- Fosfodiesteraz enzimi için en fazla birey 6 iken en az birey 3 aktivite göstermiştir.

- Protein konsantrasyonu 6. birey için 6,52 mg/ml iken 3. birey 3,64 mg/ml'dir.

Değerler incelendiğinde tüm enzim aktivitelerinde birey 6 en aktif, birey 3 en az aktif olarak görülmektedir. Protein miktarında da benzer bir durum görüldüğünden, protein konsantrasyonu fazla olan bireyde enzimlerin daha aktif olduğu protein miktarının az olduğu bireylerde ise enzimlerin daha az aktivite göstermesi düşünülebilir. Her ne kadar biyolojik varyasyon çalışmasında belirlenen zehir miktarı ham zehir üzerinden hesaplanırsa da, aynı ağırlıktaki zehirlerin protein miktarlarında da varyasyon görüldüğünden bu farklılık enzim aktivitelerinde ortaya çıkan varyasyona belli derecede katkı yapabilir. Protein miktarındaki tür içi varyasyona yönelik benzer bulgular başka türlerde yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir [51]. Daha fazla örnek sayısı ile yapılacak bir çalışma ile bu ilişki ortaya koyulabilecektir.

Literatürde aynı bölgeden elde edilen *M. lebetinus* zehrinin bireysel varyasyonuna yönelik yayımlanmış bir makale bulunmamakla birlikte, daha önce yapılan bir tez çalışması kapsamında Şanlıurfa ilinden toplanan *M. lebetinus* bireylerine ait zehirlerin bireysel varyasyonu protein profilleri (HPLC ve SDS-PAGE yöntemleri ile) ve PLA₂ enzim aktivitesi açısından araştırılmıştır [48]. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, bireyler arasında hem protein içerikleri hem de enzim aktivitesi açısından farklılıklar görülmektedir. Şimdiki tez çalışmasında elde edilen enzim aktivite varyasyonları bu anlamda daha önce yapılan çalışmayı destekler niteliktedir. Elde edilen aktivite farkları, önceki çalışmada görülen protein farklılıklarıyla ilişkili olabilir. Bu farklar bazı enzimlerin bazı bireylerin zehirlerinde daha fazla bulunmasıyla veya daha aktif olmasıyla açıklanabilir. Örneğin *M. lebetinus*'un farklı alt türlerinin zehir proteomlarında bazı kalitatif ve kantitatif farklılıklar olabileceği daha önce de literatürde gösterilmiştir [2,4].

Bu çalışmalardan birinde *M. lebetinus* türünün Güneydoğu Anadolu'da dağılışı gösteren *M. l. obtusa* ve Kıbrıs'ta dağılışı gösteren *M. l. lebetinus* alt türlerinin zehirleri proteomik yöntemlerle karşılaştırılmıştır. 2D-PAGE ile protein profilleri elde edilmiştir ve ardından MALDI-TOF kütle spektrometresi ile proteinler tanımlanmıştır. *M. l. obtusa* zehrinde SVMP, disintegrin, SVSP, PLA₂, LAAO, CLP, CRISP, sinir büyüme

faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörü, hyaluronidaz ve tripsin inhibitör proteinleri tanımlanmıştır. Bu çalışma doğrultusunda *M. lebetinus*'un iki alt türünün zehir proteinleri arasında popülasyona özgü biyobelirteç olabilecek bazı anlamlı farklılıkların (özellikle PLA₂ enziminde) olduğu görülmüştür. Bu bulgu ile *M. lebetinus* zehrinde farklı coğrafi popülasyonlarda varyasyon görülebileceği ortaya koyulmuştur [2].

Tez çalışmasına benzer şekilde birbirine yakın noktalardan elde edilmiş zehirlere yönelik bireysel varyasyon çalışmaları farklı türler üzerinde de yapılmıştır. Bunlara ait bazı örnekler Kaynak Özetleri kısmında verilmiştir. Özetle, birbirine yakın noktalardan ve hatta aynı anneden doğan kardeş yılanlardan toplanan zehirler üzerinde protein içeriği, enzim aktiviteleri, biyolojik aktiviteleri yönünden yapılmış çalışmalara bakıldığında yılan zehirlerinde bireysel varyasyonun olabileceği görülmektedir [17,18,49,50].

Yapılan bu tez çalışmasında bu şekildeki bir bireysel varyasyonun Koca Engerek, *M. lebetinus* zehrinin protein miktarı, LAAO, hyaluronidaz ve fosfodiesteraz enzim aktivitelerinde de olduğu görülmektedir. Literatürde bu yönde bir veri olmadığından yapılan çalışma sonucunda bilimsel birikime katkı sağlanmıştır. Bu enzimler, Koca Engerek ısırması sonucunda oluşan klinik tabloda önemlidir ve Koca Engerek Türkiye'nin tıbbi açıdan önemli bir türüdür [4,13]. Bu nedenle elde edilen bulgular Koca Engerek kaynaklı ısırıkların değerlendirilmesine ışık tutacaktır. Ayrıca panzehir üretiminde de yılan zehirlerindeki bireysel ve coğrafik varyasyonların belirlenmesinin önemi büyüktür [2]. Tez çalışmasının sonuçları bu konuda da katkı sağlamaktadır.

Her ne kadar yaşa veya cinsiyete bağlı bireysel varyasyonun değerlendirilmesine yetecek kadar fazla örnek olmasa da, bu tez çalışmasının amacı birbirine yakın bölgeden elde edilen *M. lebetinus* zehrindeki bireysel varyasyonu ortaya koymaktır ve bu anlamda tez amacına ulaşmıştır. Bireysel varyasyonun olduğunu gösteren ön veriler elde edilmiş olup, daha fazla örnek ile yapılacak gelecekteki çalışmalar ile görülen varyasyonun cinsiyet, yaş gibi herhangi bir faktöre bağlı olup olmadığına yönelik daha detaylı veriler elde edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Koh, D. C. I., Armugam, A., Jeyaseelan, K., “Snake venom components and their applications in biomedicine”, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 63, 3030-3041, 2006.
2. İğci, N., Özel Demiralp, D., “A preliminary investigation into the venom proteome of *Macrovipera lebetina obtusa* (Dwigubsky, 1832) from Southeastern Anatolia by MALDI-TOF mass spectrometry and comparison of venom protein profiles with *Macrovipera lebetina lebetina* (Linnaeus, 1758) from Cyprus by 2D-PAGE”, *Arch. Toxicol.*, 86, 441-451, 2012.
3. Chippaux, J.-P., “Snake Venoms and Envenomations, 1. baskı”, *Krieger Publishing Company*, Florida, 2006.
4. Siigur, J., Aaspollu, A., Siigur, E., “Biochemistry and pharmacology of proteins and peptides purified from the venoms of the snakes *Macrovipera lebetina* subspecies”, *Toxicon*, 158, 16-32, 2018.
5. Tonismagi, K., Samel, M., Trummal, K., Rönholm, G., Siigur, J., Kalkkinen, N., Siigur, E., “L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria”, *Toxicon.*, 48 (2), 227-237, 2006.
6. Soares, T. G., Santos, J. L.-D., Alvarenga, V. G., Santos, J. S. C., Leclercq, S. Y., Faria, C. D., Oliveira, M. A. A., vd., “Biochemical and functional properties of a new l-amino acid oxidase (LAAO) from *Micrurus lemniscatus* snake venom”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 154, 1517-1527, 2020.
7. Pukrittayakamee, S., Warrell, D. A., Desakorn, V., McMichael, A. J., White, N. J., Bunnag, D., “The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venom”, *Toxicon*, 26 (7), 629-637, 1988.
8. Machiah, D. K., Girish, K. S., Gowda, T. V., “A glycoprotein from a folk medicinal plant, *Withania somnifera*, inhibits hyaluronidase activity of snake venoms”, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 143 (2), 158-161, 2006.
9. Oliveira, I. S., Pucca, M. B., Wiesel, G. A., Cardoso, L. A., Bordon, K. C. F., Sartim, M. A., Kalogeropoulos, K., Ahmadi, S., vd., “Unraveling the structure and function of CdcPDE: A novel phosphodiesterase from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 178, 180-192, 2021.

10. Trummal, K., Aaspollu, A., Tonismagi, K., Samel, M., Subbi, J., Siigur, J., Siigur, E., “Phosphodiesterase from *Vipera lebetina* venom- structure and characterization”, *Biochimie*, 106, 48-55, 2014.
11. Mitra, J., Bhattacharyya, D., “Phosphodiesterase from *Daboia russelli russelli* venom: purification, partial characterization and inhibition of platelet aggregation”, *Toxicon*, 88, 1-10, 2014.
12. Kini, R. M., Gowda, T. V., “Rapid method for separation and purification of four isoenzymes of phosphodiesterase from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake) venom”, *J. Chromatogr.*, 291, 299-305, 1984.
13. Çete, Y., Göksu, E., Çete, E., “Zehirli yılan ısırıkları”, *Türkiye Acil Tıp Dergisi*, 5 (2), 92-97, 2005.
14. Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I., “Haemostatically activite proteins in snake venoms”, *Toxion*, 57 (5), 627- 645, 2011.
15. Kara, M. E., Ay, M. O., Seğmen, S., Avcı, A., İçme, F., Gökel, Y., “Yılan Isırmalarının yönetimi”, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23 (2), 272-163, 2014.
16. Cavinato, R. A., Remold, H., Kipnis, T. L., “Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions”, *Toxicon*, 36, 257-267, 1998.
17. Menezes, M. C., Furtado, M. F., Travaglia-Cardoso, S. R., Camargo, A. C. M., Serrano, S. M. T., “Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings”, *Toxicon*, 47, 304-312, 2006.
18. Hatakeyama, D. M., Tasima, L. J., Bravo-Tobar, C. A., Rodrigues, C. F. B., Aguiar W. S., Galizio, N. C., Lima, E. O. V., vd., “Venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings”, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 26, 1-17, 2020.
19. Li, M., Fry, B. G., Kini, R. M., “Eggs-Only Diet: Its implications for the toxin profile changes and ecology of the Marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*)”, *J. Mol. Evol.*, 60, 80-89, 2005.
20. Daltry, J. C., Wüster, W., Thorpe, R. S., “Diet and snake venom variation”, *Nature*, 379, 537-540, 1996.

21. Boundy, J., "Snakes", Encyclopedia of Toxicology, 3. baskı, P. Wexler (Ed.) *Academic Press*, San Diego, 310-312, 2014.
22. Edstrom, A., "Venomous and Poisonous Animals", *Krieger Publishing Company*. Florida, 209 p., 1992.
23. Wiesel, G. A., Santos, P. K., Cordeiro, F. A., Bordon, K. C. F., Selistre-de-Araujo, H. S., Ueberheide, B., Arantes, E. C., "Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom", *Toxicon*, 107, 359-368, 2015.
24. Sanz, L., Ayvazyan, N., Calvete, J. J., "Snake venomomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei*", *J. Proteomics.*, 71, 198-209, 2008.
25. Nalbantsoy, A., Hempel, B.-F., Petras, D., Heiss, P., Göçmen, B., Iğci, N., Yildiz, M. Z., Süßmuth, R. D., "Combined venom profiling and cytotoxicity screening of the Radde's mountain viper (*Macrovipera raddei*) and Mount Bulgar Viper (*Montivipera bulgardaghica*) with potent cytotoxicity against human A549 lung carcinoma cells", *Toxicon*, 135, 71-83, 2017.
26. Mackessy, S. P. (Ed.), "Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles, 1. baskı", *CRC Press*, 528 s., Boca Raton, 2009.
27. Fox, J. W., "A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases", *Toxicon*, 62, 75-82, 2012.
28. Lima, E. O. V., Tasima, L. J., Hatakeyame, D. M., Serino-Silva, C., Rodrigues, C. F. B., Galizio, N. C., Chiarelli, T., vd., "Snake venom color and L-amino acid oxidase: An evidence of long – term captive *Crotalus durissus terrificus* venom plasticity", *Toxicon.*, 193, 73-83, 2021.
29. Hiu, J. J., Yap, M. K. K., "Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase", *Biochem. Soc. Trans.*, 48 (2), 719-731, 2020.
30. Abelkafi-Koubaa, Z., Jebali, J., Othman, H., Morjen, M., Aissa, I., Zouari-Kesentini, R., Bazaa, A., vd., "A thermoactive L-amino acid oxidase from *Cerastes*

- cerastes* snake venom: purification, biochemical and molecular characterization”, *Toxicon*, 89, 32-44, 2014.
31. Izidoro, L. F. M., Sobrinho, J. C., Mendes, M. M., Costa, T. R., Grabner, A. N., Rodrigues, V. M., Silva, S. L., vd., “Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry”, *Biomed Res. Int.*, 196754, 2014.
32. İnternet: Vikipedi Özgür Ansiklopedi “Hyaluronik Asit”
https://tr.wikipedia.org/wiki/Hyal%C3%BCronik_asit.
33. Bala, E., Hazarika, R., Singh, P., Yasir, M., Shrivastava, R., “A biological overview of Hyaluronidase: A venom enzyme and its inhibition with plants materials”, *Materials today: Proceedings*, 5 (2), 6406-6412, 2018.
34. Kemparaju, K., Girish, K. S., “Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target”, *Cell. Biochem. Funct.*, 24 (1), 7-12, 2006.
35. Girish, K. S., Jagadeesha, D. K., Rajeev, K. B., Kemparaju, K., “Snake venom hyaluronidase: An evidence for isoforms and extracellular matrix degradation”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 240, 105-110, 2002.
36. Guerra-Duarte, C., Horta, C. C. R., Oliveira-Mendes, B. B. R., Magalhaes, B. F., Costal-Oliveira, F., Stransky, S., Freitas, C. F., vd., “Determination of hyaluronidase activity in Tityus spp. Scorpion venoms and its inhibition by Brazilian antivenoms”, *Toxicon*, 167, 134-143, 2019.
37. Vivas-Ruiz, D., Gonzalez-Kozlova, E. E., Delgadillo, J., Palermo, P. M., Sandoval, G. A., Lazo, F., Rodriguez, E., “Biochemical and molecular characterization of the hyaluronidase from *Bothrops atrox* Peruvian snake venom”, *Biochimie*, 162, 33-45, 2019.
38. Peng, L., Xu, X., Shen, D., Zhang, Y., Song, J., Yan, X., Guo, M., “Purification and partial characterization of a novel phosphodiesterase from the venom of *Trimeresurus stejnegeri*: inhibition of platelet aggregation”, *Biochimie*, 93 (9), 1601-1609, 2011.
39. Budak, A., Göçmen, B., “Herpetoloji, 2. baskı”, *Ege Üniversitesi Yayınları*, Fen Fakültesi Yayın No. 194, 2008.
40. İnternet: AdaMerOs Herptil Türkiye “Koca Engerek”
<http://www.turkherptil.org/IcerikDetay.asp?IcerikKatId=&TurId=599>.

41. Ghazaryan, N. A., Simonyan, K. V., Danielyan, M. H., Zakaryan, N. A., Ghulikyan, L. A., Kirakosyan, G. R., Chavushyan, V. A., vd., “Neuroprotective effects of *Macrovipera lebetina* snake venom in the model of Alzheimer’s disease”, *Neurophysiology.*, 49, 412-423, 2017.
42. Bazaa, A., Luis, J., Srairi-Abid, N., Kallech-Ziri, O., Kessentini-Zouari, R., Defilles, C., Lissitzky, J.-C., Ayeb, M. E., vd., “MVL-PLA₂, a phospholipase A₂ from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration”, *Matrix Biol.*, 28 (4), 188-193, 2009.
43. Hovhannisyanyan, M., Voskanyan, A., Bezuglov, Vardapetyan. H., V., Koshatashyan, H., Darbinyan, A., Antonyan, M., “Phospholipase A₂ of *Macrovipera lebetina obtusa* venom as a main target to relief pain after snake bites”, *Journal of Pain*, 16 (4), 44, 2015.
44. Chippaux, J. P., Williams, V., White, J., “Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation”, *Toxicon*, 29, 1279-1303, 1991.
45. Aguilar, I., Guerrero, B., Salazar, A. M., Giron, M. E., Perez, J. C., Sanchez, E. E., Rodriguez-Acosta, A., “Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*”, *Toxicon*, 50, 214-224, 2007.
46. İnternet: vikipedi Özgür Ansiklopedi “O-dianisidin dihidroklorür”
<https://en.wikipedia.org/wiki/O-Dianisidine>.
47. More, S. S., Kiran, K. M., Veena, S. M., Gadag, J. R., “Purification of an L-amino acid oxidase from *Bungarus caeruleus* (Indian krait) venom”, *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16 (1), 60-75, 2010.
48. Eroğlu, Ş., “*Macrovipera lebetina obtusa* (Koca Engerek) bireysel zehir varyasyonun protein profili ve fosfolipaz A₂ enzim aktivitesi açısından araştırılması”, *Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Nevşehir, 2019.
49. Dos-Santos, M. C., Assis, E. B., Moreira, T. D., Pinherio, J., Fortes-Dias, C. L., “Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region”, *Toxicon*, 46, 958-961, 2005.
50. Salazar, A. M., Rodriguez-Acosta, A., Giron, M. E., Aguilar, I., Guerrero, B., “A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom

(*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela”, *Thrombosis Research*, 120, 95-104, 2007.

51. Aird, S. D., “A quantitative assessment of variation in venom constituents within and between three nominal rattlesnake subspecies”, *Toxicon*, 23 (6), 1000-1004.



