

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

***MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA (KOCA ENGEREK)
BİREYSEL ZEHİR VARYASYONUNUN PROTEİN
PROFİLİ VE FOSFOLİPAZ A₂ ENZİM AKTİVİTESİ
AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI***

**Tezi Hazırlayan:
Şeyma EROĞLU**

**Tez Danışmanı:
Dr. Öğretim Üyesi Naşit İĞCİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Mayıs 2019
NEVŞEHİR**

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

***MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA (KOCA ENGEREK)*
BİREYSEL ZEHİR VARYASYONUNUN PROTEİN
PROFİLİ VE FOSFOLİPAZ A₂ ENZİM AKTİVİTESİ
AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan:
Şeyma EROĞLU**

**Tez Danışmanı:
Dr. Öğretim Üyesi Naşit İĞCİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Mayıs 2019
NEVŞEHİR**

Dr.Öğretim Üyesi Naşit İĞCİ danışmanlığında Şeyma EROĞLU tarafından hazırlanan “*Macrovipera lebetina obtusa* (Koca Engerek) Bireysel Zehir Varyasyonunun Protein Profili ve Fosfolipaz A₂ Enzim Aktivitesi Açısından Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

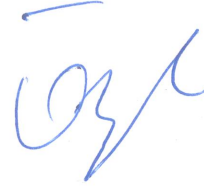
06/05/2019

JÜRİ

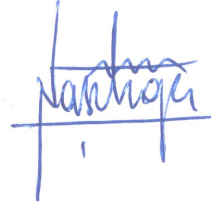
Başkan :Doç.Dr. Mehmet Zülfü YILDIZ



Üye :Doç.Dr. Özlem FINDIK



Üye :Dr.Öğr.Üyesi Naşit İĞCİ



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ...13.06.2019..... tarih ve ...341.240..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

18/04/2019
Prof. Dr. Sahlan ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü
Enstitü Müdürü
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
BİYOLOJİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ



TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Bu tezde sunulan bütün bilgi ve sonuçların, etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına dikkat edilerek hazırlanan tez içindeki her türlü bana ait olmayan bilgi ve ifadelere de atıf yapıldığını beyan ederim.

Kullanılan tüm materyallerinin elde edilmesindeki desteği için Doç. Dr. Mehmet Zülfi YILDIZ'a (Adıyaman Üniversitesi Fen-Biçbiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü);

Laboratuvar imkanları ve analiz hizmetlerinden faydalandığımız Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama Araştırma Merkezi ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne;

Şeyma EROĞLU

S. Eroğlu

"Tıbbi Protein Analizleri Laboratuvarı Alt Yapısının Kurulması" başlıklı proje ile (Proje No: NEÜADP 16F2) tez çalışmalarımda kullanılan bazı ekipmanların temin edilmesindeki desteği için Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleőtirilmesinde, yüksek lisans öğrenimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, yardımlarını esirgemeyen, her daim yol gösteren saygı değer Danıőman Hocam Naőt İĞCI'ye;

Kullanılan zehir materyallerinin elde edilmesindeki desteği için Doç. Dr. Mehmet Zülfü YILDIZ'a (Adıyaman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü);

Laboratuvar imkanları ve analiz hizmetlerinden faydalandığımız Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne;

“Temel Protein Analizleri Laboratuvar Alt Yapısının Kurulması” baőtıklı proje ile (Proje No: NEADP 16F2) tez çalışmalarında kullanılan bazı ekipmanların temin edilmesindeki desteği için Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili anneme sonsuz teşekkür ederim.

**MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA (KOCA ENGEREK) BİREYSEL ZEHİR
VARYASYONUNUN PROTEİN PROFİLİ ve FOSFOLİPAZ A₂ ENZİM
AKTİVİTESİ AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Şeyma EROĞLU

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2019

ÖZET

Yılan zehirleri, içeriğinde çok farklı özelliklerde biyoaktif protein ve peptitleri içermesi bakımından günümüzde üzerinde çok sayıda araştırma yapılan önemli bir doğal üründür. Ayrıca ısırılma vakaları nedeniyle özellikle bazı bölgelerde insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu çalışmada, Türkiye'nin tıbbi açıdan önemli bir zehirli yılan türü olan *Macrovipera lebetina obtusa* (Koca Engerek)'nin bireysel zehir varyasyonu araştırılmıştır. Bu amaçla, Şanlıurfa ilinden toplanan *M. l. obtusa*'nın dokuz farklı bireyine ait yılan zehirlerinin protein profilleri SDS-PAGE ve ters faz HPLC yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca örneklerin fosfolipaz A₂ (PLA₂) enzim aktiviteleri de belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda hem protein içeriklerinde hem de PLA₂ enzim aktivitelerinde bireysel varyasyonlar görülmüştür. Bu çalışma ile *M. l. obtusa* bireysel zehir varyasyonu ilk defa ortaya koyulmuş olup, elde edilen sonuçlar özellikle anti-serum üretimi çalışmalarına katkı sağlayacak ve yapılacak sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Macrovipera lebetina obtusa*, *Koca Engerek*, *Yılan Zehri*, *Protein*, *Enzim*, *Varyasyon*, *HPLC*.

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Naşit İĞCİ

Sayfa Adedi: 42

**INVESTIGATION OF THE INDIVIDUAL VENOM VARIATION OF
MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA (BLUNT-NOSED VIPER) IN TERMS OF
PROTEIN PROFILE AND PHOSPHOLIPASE A₂ ENZYME ACTIVITY**

(M.Sc. Thesis)

Şeyma EROĞLU

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

May 2019

ABSTRACT

Snake venom is an important natural product which is the subject of numerous scientific studies due to its richness for various bioactive peptides and proteins with diverse biological activities. It also threatens human health, especially in some areas due to bite cases. In this study, the individual venom variation of *Macrovipera lebetina obtusa* (Blunt-Nosed Viper), a medicinally-important venomous snake in Turkey was investigated. For this purpose, the venomous protein profiles of nine different *M. l. obtusa* individuals from Şanlıurfa province were compared by SDS-PAGE and reversed phase HPLC methods. Additionally, phospholipase A₂ (PLA₂) enzyme activities of the samples were determined. As a result of the study, individual variations were observed in both protein contents and PLA₂ enzyme activities. The individual venom variation of *M. l. obtusa* was documented for the first time in this study. The results will contribute to the anti-serum production studies and will shed light on further studies.

Keywords: *Macrovipera lebetina obtusa, Blunt-Nosed Viper, Snake venom, protein, variation, HPLC.*

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Naşit İĞCİ

Page Number: 42

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
HARİTALAR LİTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	xiii
1.BÖLÜM	
GİRİŞ.....	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Yılan Zehirlerinin Genel Özellikleri.....	3
2.2. Yılan Zehirlerinin Tanı Ve Tedavi Amaçlı Kullanımı.....	5
2.3. Yılan Zehirlerinde Bulunan Fosfolipaz A ₂ Enzim Hakkında Bilgi.....	7
2.4. <i>Macrovipera lebetina obtusa</i> (Koca engerek) Hakkında Bilgi.....	9

2.5.	SDS-PAGE Yönteminin Temel Prensi Ve Yılan Zehri Araştırmalarında Kullanımı.....	10
2.6.	Ters Faz Sıvı Kromatografisinin Prensi Ve Yılan Zehri Araştırmalarında Kullanımı.....	12
3. BÖLÜM		
KAYNAK ÖZETLERİ.....		14
3.1.	Yılan Zehirlerinde Bireysel Varyasyon.....	14
3.2.	<i>Macrovipera lebetina</i> Zehri İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	16
4. BÖLÜM		
MATERYAL VE METOD.....		19
4.1.	Çalışmada yer alan <i>M.lebetina</i> Bireyleri.....	19
4.2.	Zehir Materyalinin Hazırlanması.....	20
4.3.	Protein Miktar Tayini.....	20
4.4.	SDS-PAGE.....	20
4.5.	Ters Faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (RP-HPLC).....	21
4.6.	PLA ₂ Enzim Aktivitesi Tayini.....	21
5. BÖLÜM		
BULGULAR.....		23
5.1.	Protein Miktar Tayini Bulguları.....	23
5.2.	SDS-PAGE Bulguları.....	24
5.3.	Ters Faz HPLC Bulguları.....	27
5.4.	PLA ₂ Enzim Aktivite Bulguları.....	29
6. BÖLÜM: SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....		32

KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	42



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.1.	Çalışmada kullanılan bireylere ait bilgiler.....	19
Tablo5.1.	Bradford miktar tayininde kullanılan BSA standartlarına ait OD. Değerleri.....	23
Tablo 5.2.	Zehir örneklerine ait OD Değerleri ve standart grafiğine göre hesaplanan protein konsantrasyonlar ıle ham zehir protein yüzdeleri.....	24
Tablo 5.3.	Zehir örneklerine ait PLA ₂ enzim aktivitesi değerleri.....	30



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 5. 1. BSA standartları ile oluşturulan kalibrasyon grafiği.....23
- Şekil 5. 2. *Macrovipera lebetina obtusa*'nın farklı bireylerine ait zehirlerin SDS-PAGE yöntemi ile elde edilmiş protein profilleri.....25
- Şekil 5. 3. SDS-PAGE çalışması sonucunda elde edilen jel görüntüsündeki bantların yoğunluk grafiği.....26
- Şekil 5. 4. *Macrovipera lebetina obtusa* zehirlerine ait ters faz kromatogramları (1.Birey,2.Birey,3.Birey4.Birey,5.Birey).....28
- Şekil 5. 5. *Macrovipera lebetina obtusa* zehirlerine ait ters faz kromatogramları (6.Birey,7.Birey,8.Birey,9.Birey).....29
- Şekil 5. 6. Fosfolipaz A₂ enzim aktivitesi sonuçlarının bar grafiği şeklinde gösterimi. A: µmol/dk/ml şeklinde gösterim, B: nmol/dk/ml/mg protein spesifik aktivite şeklinde gösterim.....31

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1.1. *Macrovipera lebetina obtusa* alt türünün doğal ortamında (Birecik, Şanlıurfa) görünümü (Fotoğraf: Naşit İGÇİ).....10



HARİTALAR LİSTESİ

Harita 4.1.	Bireylerin lokaliteleri.....	20
-------------	------------------------------	----



SİMGE VE KISATMALAR

μ l:	mikrolitre
μ mol:	mikromol
ml:	mililitre
nmol:	nanomol
dk:	dakika
BSA:	Sığır serum albümini
DTNB:	5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
HPLC:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
PLA ₂ :	Fosfolipaz A ₂
SDS-PAGE:	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
RP-HPLC:	Ters faz-yüksek basınçlı sıvı kromatografi

1.BÖLÜM

GİRİŞ

Hayvan zehirleri her zaman araştırmacıları farklı farmakolojik özelliklere sahip çeşitli biyoaktif moleküller için önemli kaynaklar olarak büyülemiştir. Günümüzde de özellikle peptit bazlı ilaç geliştirilmesiyle ilgili çalışmalarındaki artışa paralel olarak ve yılan ısırıklarının önemli sağlık problemlerinden kabul edilmesiyle birlikte hayvan zehirleri üzerindeki karakterizasyon ve varyasyona yönelik araştırmalar da önemli ölçüde artmıştır [1-5].

Üzerinde en çok araştırma yapılan hayvan zehirlerinden olan yılan zehri, zehir bezi tarafından üretilen ve çok etkili kimyasal moleküllerin bulunduğu bir salgıdır. Yılan zehirleri büyük ölçüde biyolojik olarak aktif proteinlerin ve peptitlerin karmaşık bir karışımıdır. Bu bileşenlerin çoğu avı öldürmek veya hareketsiz kılmak için işlev gören sindirim sürecine yardımcı olan biyolojik olarak aktif proteinlerdir [1-5].

Her yılan türü farklı miktarlarda toksik ve toksik olmayan bileşiklere sahip benzersiz bir zehir içerir [5]. Taksonomik seviye, cinsiyet, coğrafi köken, mevsim, yaş ve av tercihini içeren pek çok faktör zehir bileşimini etkileyebilir [1-6]. Yılan zehirleri, antikoagülan-koagülan etki, nörotoksik etki gibi bir dizi biyolojik aktivite içerir ve özgün biyolojik aktiviteleri yılan zehri proteinlerinin terapötik kullanım potansiyelini oluşturur [1-7]. Yılan zehirlerinin bileşiminde görülen varyasyonlar onların biyolojik aktivitelerine de yansır [1-5].

Ülkemizde de zehirli yılan türleri olarak başlıca engerekler bulunmaktadır [1,6]. Türkiye'nin farklı bölgelerinde farklı türler yaşamaktadır. Ayrıca bir adet kobra türü de (*Walterinnesia morgani*) Türkiye'de bulunmaktadır.

Yılan zehirleri ile yapılan çalışmalarda tür içi ve türler arası zehir varyasyonlarının belirlenmesi önemli bir yer tutmaktadır [1-5,8,9]. Bu çalışmalar özellikle zehirli yılan ısırığı etkilerinin değerlendirmesinde ve anti serum üretimi için zehir kaynağı popülasyonların belirlenmesinde çok önemlidir.

Türkiye'de yılanlarla ilgili çalışmalar çoğunlukla taksonomik araştırmalardır. Son yıllarda ise yılan zehirleriyle ilgili çalışmalar da artış göstermiştir [1,9-13]. Literatürde,

ülkemizde de bulunan *Macrovipera lebetina obtusa* zehrinin bireysel varyasyonuna yönelik detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de tıbbi öneme sahip engerek türü olan *M. l. obtusa* zehrinin bireysel varyasyonunu protein profillerini ve yılan zehirlerinde önemli bir enzim olan fosfolipaz A₂ enzim aktivitesini karşılaştırarak araştırmaktır. Bu çalışma ile elde edilecek bulgular bilimsel literatüre katkı sağlayacaktır ve Türkiye’de yapılacak anti-serum üretimi çalışmaları için önemli veriler sağlayacaktır.



2.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2. 1. Yılan Zehirlerinin Genel Özellikleri

Hayvansal zehirler eski tarihlerden beri araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bunlar arasında en fazla ilgi gören yılan zehri olmuştur. Geçmişten günümüze kadar yılan zehirleri temel araştırma, tanı ve tedavide çeşitli şekillerde kullanılmıştır [5].

Yeryüzünde bugün yılanlar yaklaşık 3.700 türle temsil edilmektedir. Geleneksel olarak zehirli kabul edilen yılanlar, enjektör şeklindeki ön zehir dişlerine sahiptir. Bu türlerden yaklaşık 600'ü insanlar açısından da tehlikeli olabilecek zehirli yılanlardır [14].

Zehir, yılanların avına zehir dişleriyle verilir. Zehir bezindeki kasların kasılmasıyla zehir dişleri içerisinde kanaldan zehir enjekte edilir. Çoğu yılanlarda zehir bezleri gözün hemen arkasındaki boşluktadır ve üst çenenin arkasında bulunur. Zehirli yılanlarda zehir aygıtı üç kısımdan oluşmaktadır: zehir bezi, zehir kanalı ve zehir dişi. Bu kısımların şekil ve yapıları cins ve türlere göre değişiklik gösterir [5].

Yılan zehirleri avı sindirmek için olduğu kadar avı öldürmek için işlev gören yüzlerce protein ve peptidin karmaşık karışımlarıdır. Yılan zehirleri tarafından ortaya koyulan toksik etkiler karmaşıktır. Çünkü farklı bileşenleri farklı etkilere sahiptir ve aynı zamanda faaliyetlerini geliştirmek için sinerjistik bir şekilde diğer zehir bileşenleri ile birlikte hareket edebilirler [5,14,15].

Yılan zehri işlevleri bilinmeyen bazı karbonhidratlar, nükleositler, lipitler ve reseptörler iyon kanallarına veya enzimlere hedeflenecek şekilde evrimleşmiş güçlü proteinler ve peptidlerin bir karışımını içerir. Çok çeşitli memeli proteinleri ile etkileşirler ve merkezi sinir sistemlerini, kan pıhtılaşma, kardiyovasküler ve genel olarak homeostaziyi bozabilirler. Bu zehirli proteinler büyük bir hassasiyetle hareket ederler ve belirli reseptörlerin farklı alt tiplerini sadece ince farklarla tanırlar ve biyolojik olarak aktiftirler [5,7,14].

Birçok yılan zehri proteini enzimatik aktiviteye sahiptir. Bu anlamda yılan zehri özellikle enzimler bakımından çok zengindir. Yılan zehirlerinde en az 25 farklı enzim tespit

edilmiştir. Yılan zehrinde bulunan başlıca önemli enzimler: proteolitik enzimler (proteazlar: srin proteazlar, metalloproteazlar), arjinin ester hidrolaz, asetilkolinesteraz, trombin benzeri enzim, hiyaluronidaz, fosfolipaz A₂, kollajenaz, fosfomonoesteraz, RNAaz, DNAaz, 5-nükleotidaz, NAD nükleotidaz ve L-aminoasit oksidaz [1,5,14]. Bu enzimler enzimatik aktivitelerine ek olarak hemorajik, hemolitik, miyotoksik, kardiyotoksik, nörotoksik etkilerini de içeren çeşitli farmakolojik etkilere neden olurlar. Bu bileşenler arasında serbest yağlı asitleri ve lizofosfolipitleri serbest bırakan sn-3 fosfogliseritlerin sn-2 yağlı asil ester bağının hidrolizini katalize eden fosfolipaz A₂ de yer alır [1,5,14,16]. Viperidae yılan zehirlerinde de bulunan fosfolipaz A₂ enzimi yılan zehirlerinde en çok bulunan proteinlerden biridir [1,5,16]. Yapılarındaki benzerliklere ve ortak katalitik özelliklere rağmen geniş bir farmakolojik aktivite sergilerler. Bu proteinler farklı mekanizmalarla toksik etki gösterebilir [5,17].

Zehir yapısında enzimlerin aktivasyonunda rol oynayan kalsiyum, sodyum, demir, magnezyum, kobalt, nikel, çinko ve manganez gibi inorganik iyonlar da bulunur [5]. Viperidae ailesinde bulunan engerekler hemostatik sistem ve doku onarımı üzerinde etkili olan çeşitli proteinler içerir ve ısırıkları genellikle kalıcı kanama ile sonuçlanmaktadır [5]. Yılan zehri serin proteazları hemostatik sistemi etkileyen enzimlerdir. Pıhtılaşma, fibrinolitik sistemleri ile avın hemostatik sisteminin dengesizliğine neden olmak için çeşitli bileşenlerine etki ederler [5,17].

Yılan zehirleri proteinazlar içerdiğinden zehrin toplanmasından sonra hızlı bir şekilde dondurulması ve düzgün bir şekilde tercihen kurutularak saklanması gerekir. Bu işlemler uygun şekilde yapılmadığı takdirde zehirli proteinlerin bozulma ve denatürasyon riskini ortaya çıkarır. Dondurarak kurutma işlemi özellikle kritiktir. Çünkü yetersiz bir donma, kurutma zehrin kalitesini önemli ölçüde bozabilir. Ayrıca uzun süre boyunca dondurularak kurutulmuş venomların depolanması aynı zamanda toksik etkisinde bozulma ile birlikte hidrasyon riskini içerebilir. Bu nedenle hayvan zehirlerinin kalite kontrolü için kurutma işlemi zehir numunelerinin hazırlanmasında kritik bir işlemdir [18].

Bir yılanın zehri ne kadar farklı dokunun yıkımına sebep oluyorsa o kadar fazla miktarda proteolitik enzim içerir. Proteolitik enzimler (proteazlar), doku proteinlerinin yıkımına sebep olurlar. Bu enzimler engerekler ve özellikle çingiraklı yılanlarda çok

çeşitli ve bol olmakla birlikte kobra ve deniz yılanları gibi diğer gruplarda da bulunur [5,14].

Yılan zehri kompozisyonu, coğrafi köken, yaşam alanı, mevsimsel değişim, diyet, yaş, ve cinsiyete bağlı olarak varyasyonlar sergileyebilir [1-6,8,9,13,15,19]. Viperidae familyasından yılanların zehri üzerine yapılan çalışmalarda da bireyler arasında bilinen proteinlerin izoformlarının yanı sıra kromotografik farklılıklar ve protein konsantrasyonlarındaki değişiklikler tespit edilmiştir [1,2,8,9,13,19]. Zehir bileşimi, coğrafi olarak farklı popülasyonlar arasında, sınırlı bir alandaki aynı türün popülasyonuna ait bireylerine göre daha fazla varyasyon göstermektedir.

2. 2. Yılan Zehirlerinin Tanı ve Tedavi Amaçlı Kullanımı

Yılan zehirleri çok çeşitli toksin, enzim, büyüme faktörü, aktivatör ve inhibitör içeren geniş kapsamlı biyolojik aktiviteye sahip moleküler karışımlardır. Kalbin hareketi, kan dolaşımı, zarların geçirgenliği, sinirsel iletim, kas kasılmaları, solunum işlevi gibi hayati süreçlere etkili oldukları bilinmektedir [5]. Yılan zehri araştırmalarının, sağlık alanındaki potansiyeli nedeniyle tanı ve tedaviye odaklandığı görülmektedir [5,7,14].

Tıbbi amaçlar için yılan zehri kullanımı eski zamanlara dayanırken geçtiğimiz on yıl boyunca yılan zehri bileşenlerinden elde edilen yeni ilaçların dünya çapında hastalara ulaşması yapılan temel araştırmalar ile mümkün olmuştur [14]. Biyomedikal araştırmacılar, farmakologlar, klinisyenler yılan zehri türevli ilaçların tam potansiyelinin gerçekleştirilmesi için çabalarını birleştirmektedirler. Yılan zehri bileşenlerine dayalı olarak insan sağlığına yönelik bazı önemli ilaçlar veya tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Bazı temel biyolojik süreçler hücreleri ve bunların reseptörlerini incelemek için toksinler kullanılarak açığa çıkarılmıştır. Son yıllarda cins, tür, alt tür, popülasyon ve hatta bireysel düzeylerdeki zehir kompozisyonunun kayda değer çeşitliliği tam olarak anlaşılmıştır ve altta yatan ekolojik güçleri ve mekanizmaları tanımlamak ve anlamak için bir başlangıç yapılmıştır [14].

Yılanlar gibi zehirli hayvanlar her zaman şifa ile ilişkilendirilmiştir. Bazı yılan zehri bileşenleri tıbbi uygulama ve ilaç keşiflerinde uygulanabilir bir ilaç ürünleri topluluğu oluşturur. Bazı yılan zehri bileşenleri ise antimikrobiyal etkileri için çalışılmıştır.

Viperidae ve Elapidae ailelerine ait yılanların zehirleri gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal etkiler sergilerler [10,20].

Bugün tıpta ve veterinerlikte kullanılabilecek farmakolojik olarak aktif maddelerin araştırılmasında yılan zehirleri doğal molekül kaynakları olarak kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar bazı yılan türlerinin zehirlerinin analjezik ve antineoplastik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda zehirlerin geleneksel olarak bazı cerrahi prosedürlerde biyolojik bir yapıştırıcı olarak da kullanıldığı bilinmektedir. Böylece yeni ilaçların araştırılmasında zehir kompozisyonunun değişkenliğinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Engerek zehirlerinden şimdiye kadar kan pıhtılaşması üzerinde etkili ilaçlar ve tanı kitleri geliştirilmiştir ve günümüzde onaylı olarak kullanılmaktadır [14].

Yılan zehri bileşenleri kanser hücreleri üzerinde doğrudan etki gösterebilir ya da dolaylı olarak tümör büyümesini inhibe eden ve tümörün yok edilmesini sağlayan vücudun enflamatuvar yanıtını güçlendirebilir. Çalışmaların sonuçlarına göre yılan zehrinin bileşenleri anti-tümör etkinliği immün sistem aracılığıyla veya apoptoz gibi hücrel mekanizmaları etkileyerek oluşturmaktadır [5,21]. Son yıllarda kanser tanı ve tedavisinde detaylı çalışmalar yapılarak yılan zehirlerinden elde edilen proteinler izole edilmiştir.

Son dönemde yapılan çalışmalarda peptit bileşenlerinin kronik enflamatuvar, kardiyovasküler, nörolojik ve tümöral hastalıkların tedavisinde de etkili olabildiği gösterilmiştir. Yılan zehri üzerindeki araştırmalar zehir bileşenlerinin kanser ve nörolojik bozukluklar gibi günümüzün sık karşılaşılan hastalıklarında etkili olabileceğini göstermektedir. Bunun bir örneği de yine engerek yılanı zehridir. Meme kanserinde sergilediği sitotoksik etkinlik ile kanser hücrelerinin çevre dokulara adezyonunu ve invazyonunu önleyebilmektedir. Yine engerek yılanı türlerinden elde edilen atroporin ve kaotreenin kansere karşı tedavisinde değerli olabileceği ifade edilmektedir [7,21]. Mamba yılanının zehrinde türetilen dendrotoksinin ise Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda etkili olduğu gösterilmiştir [7].

Kobradan türeyen bileşikler alternatif tıpta kullanılmaktadır. Morfinden daha güçlü ağrı kesici özellikte toksinler bulunduran kobra zehri 1930'larda kanser hastalarında ağrıyı tedavi etmek için kullanılmıştır. Zehrin anti kanser özelliklerine göre şu anda çok fazla araştırma yapılmaktadır [14].

Ayrıca Brezilya'dan tropikal çingıraklı yılanın zehrinin kızamık virüsüne karşı aktif olduğu gösterilmiştir [14].

2. 3. Yılan Zehirlerinde Bulunan Fosfolipaz A₂ Enzimi Hakkında Bilgi

Fosfolipazlar hücre membranının ana bileşeni fosfolipidleri parçalayan enzimlerdir. Fosfolipaz A₂ fosfolipit hidrolizleyen bir enzim olarak ilk defa 1877'de tanımlanmasından bu yana araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Fosfolipaz A₂ olarak tanımlanmış enzimin aktivitesi ilk olarak 1890'larda kobra zehri kullanılarak ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır. Benzer özellikler taşıyan ve salgılanan bir PLA₂ ise domuz pankreasında bol miktarlarda bulunmuştur. Bir enzimin aktivitesinin enzim ve substrat konsantrasyonlarına bağımlı olduğu bilinmektedir. Aktiviteye etki eden diğer faktörler sıcaklık, pH, iyon şiddeti, kimyasal etkiler, kofaktörler ve inhibitörler olarak sıralanabilir. Bu özellikler PLA₂ enzimi için de geçerlidir [4,5,22].

Yılan zehirlerinde tanımlanan protein ailelerinden PLA₂ yılan zehirlerinin çoğunda bulunur ve serbest membranlara bağlanmış olan fosfolipitleri yağ asitleri ve lizofosfolipitlere hidrolize eden bir enzimdir. Yılan zehri fosfolipaz A₂ genleri çok çeşitli fonksiyonlara sahip büyük multigen ailelerinin üyeleridir. Bu nedenle gen kopyalamasından sonra yeni fonksiyonların ortaya çıkışını incelemek için mükemmel modellerdir [22]. Yılan zehri PLA₂'leri disülfid bağlarının durumlarına göre grup 1 ve grup 2 olmak üzere iki gruba ayrılır. Grup 1 PLA₂'ler genellikle Elapid ve Hydrophid'lerde bulunurken grup 2 PLA₂'lerin farklı zehirli yılan gruplarında farklı farmakolojik etkileri olabilmektedir. Bu enzimin yılan zehirlerindeki evrimi ve kazandığı farklı farmakolojik etkiler günümüzde hala bu alanda yoğun olarak çalışılan konulardan biridir [22].

Fosfolipaz A₂'ler fosfogliseridlerin sn-2 yağ asidi ester bağımlı hidrolizleyerek serbest yağ asitleri ve lizofosfolipitleri ayıran enzim ailesidir. PLA₂ hidroliz ürünü olan lizofosfolit hücre sinyal iletiminde fosfolipidin yeniden modellenmesinde ve membranın bozulmasında çok önemlidir. Bu rollere ek olarak PLA₂ son zamanlarda sistematik ve akut inflamatuvar şartlardan kansere kadar değişen geniş bir patofizyolojik durumun içinde yer almakla tanınmaktadır. PLA₂ mikroorganizmalar ve değişik hayvan kaynaklarından farklı tekniklerle izole edilerek saflaştırılmaktadır. Hücre sinyal ve

fonksiyonları itibariyle farklı hastalıklara neden olabilen PLA₂'nin aktivasyonu üzerine terapötik çalışmalar yapılmaktadır [5,22].

Fosfolipaz A₂ memeliler de dahil olmak üzere çeşitli canlı gruplarında bulunur. Yılan zehirlerin hemen hepsinde değişen miktarlarda bulunan PLA₂ enzimlerinin moleküler fonksiyonları farklılık gösterse de hepsinin atasal sindirim özelliği olan PLA₂' den evrimleştiği düşünülmektedir. Genellikle izoenzimler halinde ifade olan yılan zehri PLA₂'leri monomerik yapıda olabildiği gibi heteropentomerik formlarda da bulunabilir [5,22].

Memelilerde PLA₂'ler toksisiteden yoksundur ve çeşitli fizyolojik süreçlerde ve romatizma astım ve sedef hastalığı gibi bazı patolojilerde önemli rol oynarlar. Buna karşılık yılan zehirlerinden bulunan PLA₂, toksik proteinler arasındadır ve sıklıkla avın öldürülmesinde önemli bir rol oynarlar. Tek bir yılan zehrinde PLA₂, farmakolojik etkisi önemli ölçüde değişebilen çeşitli izoenzimlerle temsil edilebilir [23].

Fosfolipaz A₂'ler küçük boyutu ve yapısal stabiliteleri nedeniyle en iyi incelenen yılan zehri enzimleridir. Birçok yılan zehri PLA₂ enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Yılan zehri PLA₂'ler çok fonksiyonlu proteinlerdir ve membran fosfolipitleri üzerindeki enzimatik etkilerine ek olarak spesifik hedef proteinlere bağlanma yeteneklerinden dolayı çok çeşitli fizyolojik ve patolojik etkiler sergilerler. Bazı PLA₂'ler bakterilerin öldürülmesinde rol oynayabilir ve bakteriyel enfeksiyona karşı konak savunmasında rol oynayabilir [16].

PLA₂ enzimleri suda çok çözünür olup suda çözünmeyen substrat fosfolipitlerini hidrolize ettikleri için benzersiz hidrolitik enzimlerdir. Yılan zehri PLA₂ enzimleri diğer bileşenlerin yardımı olmadan kendi farmakolojik etkilerini kendilerini sergilerler. Bununla birlikte diğer bazı PLA₂ enzimleri farmakolojik etkilerini ancak diğer protein faktörleri ile kompleks oluşturduklarında tam güçte ifade ederler. Birkaç PLA₂ enziminin farklı mekanizmalarla aynı farmakolojik etkiyi sergileyebilir. Örneğin nörotoksik etki belirgin olarak farklı mekanizmalar tarafından indüklenebilir. Böylece farklı nörotoksik PLA₂ enzimleri farklı hedef proteinlere bağlanabilir ve benzer nörotoksik semptomlar sergileyebilir [24].

Viperidae yılan zehirlerinde de PLA₂'ler en çok bulunan proteinlerdendir [23]. Yapılarındaki benzerliklere ve ortak katalitik özelliklere rağmen geniş bir farmakolojik aktivite sergilerler. Bu proteinler farklı mekanizmalarla toksik etkileri gösterebilir. Bazı venom PLA₂'ler enzimatik aktivitelerinden bağımsız mekanizmalarla antitümör ve antianjiyojenik aktiviteler gösterirler [17].

Bazaa ve arkadaşları çalışmalarında *Macrovipera lebetina* venomundan yeni bir fosfolipaz A₂ olan MVL-PLA₂'nin anti-integrin aktivitesi sergilediğini bildirmiş ve tanımlamıştır. Çalışmalarında MVL-PLA₂'nin de güçlü anti-anjiyojenik özellikler sergilediğini göstermiştir. Bu fosfolipaz A₂, insan mikrovasküler endotel hücrelerinin sitotoksik olmaksızın doza bağımlı bir şekilde yapışmasını ve göçünü inhibe etmiştir. PLA₂'nin ayrıca katalitik olarak inaktif hale getirilmiş formunun hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak anjiyogenezi önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir [25].

Yine yapılan proteomik çalışmalarda, tez kapsamında zehri araştırılan *Macrovipera lebetina* zehirlerinden PLA₂ tanımlanmış ve zehir içeriğinin önemli bir kısmını oluşturduğu görülmüştür [1,26,27].

2. 4. *Macrovipera lebetina obtusa* (Koca Engerek) Hakkında Bilgi

Macrovipera cinsi Kuzey Afrika'dan Pakistan'a Hindistan'a ve Kaşmir'e, Kuzeyden Yunanistan'a, Ermenistan'a, Rusya ve güneyden Yemen'e kadar dağılışı olan ve engerekler arasında boyut açısından nispeten büyük türleri içeren bir cinstir. *Macrovipera lebetina*, Batı ve Orta Asya'dan Kuzey Afrika'ya kadar geniş bir yayılışa sahiptir. *Macrovipera lebetina obtusa* Viperidae ailesine dahil bir engerek yılanıdır ve *M. lebetina*'nın alt türüdür [28,29].

Macrovipera lebetina obtusa Türkiye'de Gazipaşa-Anamur civarından Güneydoğu, Güney, İç ve Kuzeydoğu Anadolu'ya kadar bir dağılışa sahiptir. *Macrovipera lebetina* genellikle kayalık, yarı kurak bitki örtüsü veya kumlu bozkır habitatlarında bulunur [29].

Macrovipera lebetina Kıbrıs'ta da *M. l. lebetina* alt türü olarak bulunmaktadır. Türkiye ve Kıbrıs'taki en büyük engerek türüdür. Başın üst tarafı karinalı pullarla örtülüdür. Göz bebekleri dikeydir. Sırt tarafı gri, veya açık kahverengi olup sarımsı kahverengi koyu

lekelidir (Resim 1). Karın tarafı beyazımsı, hafif pembemsi sarı ya da yeşilimsi sarıdır ve koyu renkli ufak beneklidir [29].



Resim 2.1 *Macrovipera lebetina obtusa* alt türünün doğal ortamında (Birecik, Şanlıurfa) görünümü (Fotoğraf: Naşit İĞCİ)

2.5. SDS-PAGE Yönteminin Temel Prensibi ve Yılan Zehri Araştırmalarında Kullanımı

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) elektrik akımı kullanılarak moleküllerin zıt yüklü elektroda doğru göç ettirilmesi tekniği olarak tanımlanan elektroforez yöntemini kullanan, proteinlerin ayrılmasında ve analizinde geniş çapta kullanılan bir tekniktir. Moleküllerin bu göçü elektrik akımının şiddetine, molekülün yüküne, büyüklüğüne, çözeltinin iyonik gücüne bağlı olarak değişir [30].

Günümüzde proteinlerin ayrıştırılmasında en yaygın olarak PAGE kullanılmaktadır. Proteomik çalışmalarda yaygın olarak moleküler ağırlık belirlenmesi ve karşılaştırma amacıyla sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanımını içeren SDS-PAGE denatüre edici jel

kullanılmaktadır. SDS-PAGE yönteminde jele yüklenecek proteinler öncesinde bir tampon ile karıştırılır daha sonra genellikle 90-95°C sıcaklıkta bekletilir ondan sonra jele yüklenir. Bu tamponun içerisinde Tris ile birlikte yine SDS bulunur. Buna ek olarak sisteinler arasında oluşan disülfüt bağlarını kıran β -merkoptoetanol veya ditiyotritol gibi indirgeyici bir ajan da bulunur. Ayrıca bu tamponun içerisinde bir de gliserol bulunur. Gliserol kuyucuklara yükleme yaparken sıvının dışarıya kaçmadan dibe çökmesini sağlar [30].

Jellerin boyanması ve görüntülenmesinde elektroforez sonrası jeller üzerindeki protein kümelerinin bantlarının görünür hale gelmesi için boyanması gerekir. En yaygın kullanılan yöntemler “Coomassie Brilliant Blue” gümüş boyama ve floresan boyalardır [30].

Temel proteinler için poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanımı tüm yılan zehirlerinin karakterizasyonu ve yılanların taksonomik sınıflandırması için yararlı bir yardımcı araç olabilir. Dünyanın dört bir yanındaki araştırmacılar SDS-PAGE yöntemini kullanarak birçok yılan grubunun zehirlerinin çeşitli bileşenlerini incelemiştir [1,2,6,8,9,15,19]. Ayrıca zehirli toksik faktörlerin ayırt edici biyolojik aktivitelerini ortaya çıkarmak için girişimlerde bulunulmuştur ve saflaştırılan bu proteinlerin karakterizasyonunda da kullanılan bir yöntemdir [16,18,27]. Elektroforetik yöntem sadece venom bileşenlerinin tanımlanması için değil aynı zamanda karşılaştırılmalı biyokimyasal çalışmalar için de çok etkilidir.

SDS-PAGE yönteminin yılan zehri çalışmalarında kullanımına yönelik bazı örneklerden aşağıda bahsedilmiştir.

Barber ve arkadaşları çalışmalarında *Oxyuranus temporalis* zehrini, cinsin diğer türlerinin zehriyle karşılaştırdıkları çalışmada SDS-PAGE yöntemini de kullanmışlardır. Bu veriler diğer venomlarla karşılaştırıldığında *O. temporalis* venomunun çoğunluğunun düşük molekül ağırlıklı bileşenlerden oluştuğu görülmüştür [31].

Lourenço ve arkadaşları Breziya'nın belirli bir coğrafik bölgesindeki *Crotalus durissus terrificus* yılanlarından elde edilen zehirleri bireysel varyasyon açısından karşılaştırmış ve SDS-PAGE yöntemini de kullanmıştır. Protein bantlarında önemli farklılıklar gözlemlenmiştir [19].

Shashidharamurthy ve arkadaşları üç farklı coğrafi bölgeden elde edilen Hint Kobrası (*Naja naja naja*) zehrini elektroforetik, biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteler açısından incelenmiştir. SDS-PAGE bantlamada üç bölgesel zehirin protein bileşenlerinde önemli farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmıştır [3].

Türkiye’de yaşayan bazı zehirli yılan türlerinin zehirleri poliakrilamit disk jel elektroforezi ile analiz edilerek protein profilleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir ve taksonomik ayrımlarda zehir protein farklılıklarının kullanılabilirliği irdelenmiştir [6].

Arıkan ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda *Montivipera xanthina* [32], *Vipera kaznakovi* ve *Vipera ammodytes* [9] türlerine ait farklı büyüklükteki bireylerin zehirlerini poliakrilamit disk jel elektroforezi kullanılarak incelemiştir. Bu araştırmacılar yaşa bağlı olarak zehir protein içeriklerinde farklılıklar olabildiğini göstermiştir.

2.6. Ters Faz Sıvı Kromatografisinin Prensibi ve Yılan Zehri Araştırmalarında Kullanımı

Kromatografi, çeşitli moleküllerin ayrılması ve saflaştırılması ve miktar tayininde kullanılan ve bu anlamda proteomiks alanında da çok önemli yere sahip olan bir tekniktir [30].

Yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi ters faz kromatografisidir. Ters faz kromatografisinde sabit faz olarak apolar, hareketli faz olarak da düşük çözücüler kullanılır. Bu karışımlardan biri organik diğeri ise inorganiktir. Kullanılan organik çözücüler genellikle asetonitril ve metanoldür. İnorganik çözücüler ise saf su ve sulu tampon çözücüdür [33].

Yüksek Performans Sıvı Kromatografide (HPLC) ters faz kromatografisi genel olarak küçük moleküllü organik kompleks karışımları ve protein/peptit karışımlarını bileşenlerine ayırmak için kullanılır [33].

Ters faz sıvı kromatografi yöntemi, yılan zehri proteinlerinin analiz edilmesinde de yaygın bir şekilde kullanılır. Bu çalışmalara ait bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

Lourenço ve arkadaşları Breziya’nın belirli bir coğrafik bölgesindeki *Crotalus durissus*

terrificus yılanlarından elde edilen zehirleri bireysel varyasyon açısından karşılaştırmış ve ters faz HPLC yöntemini de kullanmıştır. Kromatogramlarda bireysel varyasyona işaret eden önemli farklılıklar gözlemlenmiştir [19].

Barber ve arkadaşları çalışmalarında *Oxyuranus temporalis* zehrini, cinsin diğer türlerinin zehriyle karşılaştırdıkları çalışmada ters faz kromatografi yöntemini de kullanmışlardır. Türler arasında kromatogram piklerinde kantitatif ve kalitatif farklar görülmüştür [31].

Namiranian ve arkadaşları çalışmasında Tayland kobra türleri *Naja naja kaouthia* ve *Naja naja siamensis*'in venomlarının bileşimini ve toksin içeriğindeki varyasyonu araştırmak için hem iyon değişimi hem de ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) kullanmışlardır. Zehirler farklı nispi konsantrasyonlarda olmasına rağmen aynı ana toksin bileşenlerini içermiştir [34].

İğci çalışmasında, *Macrovipera lebetina*, *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin venomik karakterizasyonunda zehir proteinlerinin ayrılması ve kantitatif analizi için RP-HPLC kullanmıştır [26].

Ters faz HPLC yöntemi, yılan zehirlerinin venomik karakterizasyonu çalışmalarında zehir proteinlerinin ayrımı ve nicel analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır [18,26,27].

3.BÖLÜM

KAYNAK ÖZETLERİ

3. 1. Yılan Zehirlerinde Bireysel Varyasyon

Yılan zehirlerinin varyasyonu günümüzde iyi belgelenmiş olgulardır ve zehrin bileşimi destekleyici bilgiler olarak sistematığe yararlı olabilir. Bölgesel zehir varyasyonları nedeniyle ülkelerin kendi türlerini kullanarak antiserum üretmeleri önemlidir [18]. Venom bezleri kullanılarak tamamlayıcı genomik ve transkriptomik çalışmalar, moleküler varyasyonu ortaya çıkarmak ve farklı şekilde eksprese edilen genleri daha doğru tespit etmek için yapılmalıdır [13].

Venom varyasyonu yılan zehirlenmesi konusunda verdiği bilgilerin yanı sıra temel zehir araştırmaları için de önemlidir. İntraspesifik varyasyon ile zehirli kompozisyon bireysel olarak değişebilmektedir ve çevresel koşulların, yaşın, beslenme alışkanlıklarının vb. sağladığı etkiler her bir birey tarafından sergilenen proteaz enzimi gibi önemli zehir protein gruplarının ifade profillerini de etkiler [1-6].

Farklı yılanların zehir proteinleri üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda genç bireylerin ölümcül pıhtılaşma gibi belirli aktivitelere göre yaşlı bireylerden daha yüksek potansiyele sahip oldukları gösterilmiştir [19].

Francischetti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Brezilya'nın eyaletinden sekiz ayrı çingiraklı yılanın zehrini karşılaştırılmıştır ve tür-içi bireysel varyasyonu araştırmıştır. Yılanlar bazıları 600 km uzaklıkta olmak üzere farklı konumlarda toplanmıştır. Venomlar proteolitik, fosfolipaz A₂, trombosit agregasyonu ve koagülasyon aktiviteleri için test edilmiştir. Venomlar ayrıca poliakrilamid jel elektroforezi ve izoelektrik odaklama ile de analiz edilmiştir. Bu yöntemlere ek olarak jel filtrasyon ve anyon değişim kromatografileri ile venom proteinlerinin ayrımı gerçekleştirilmiştir ve karşılaştırılmıştır. Zehirler arasında karşılaştırılan özellikler açısından bazı farklılıklar görülmüştür [35].

Aguilar ve arkadaşları çalışmalarında Venezuela'nın farklı bölgelerinden *Crotalus durisus cumanensis* yılan zehirlerinin biyokimyasal ve hemostatik varyasyonlarını

ortaya koymuşlardır. Jel fitrasyon kromatografisi ve SDS-PAGE profilleri analiz edilmiştir. Fibrinolitik ve hemorajik aktivitede farklılıklar gözlenmiştir [36].

Lourenço ve arkadaşları çalışmalarında Brezilya'daki *Crotalus durissus terrificus* yılan zehirlerinin biyokimyasal, farmakolojik ve enzimatik özelliklerini değerlendirerek bireysel varyasyonlarını karakterize etmeyi amaçlamıştır. Yani yakalanan yılanlardan elde edilen zehirler, zehirli kompozisyonu etkileyebilecek çevresel ve biyolojik varyasyonları doğrulamak için karşılaştırmalı olarak karakterize edilmiştir. SDS-PAGE ve RP-HPLC kullanılan yöntemler arasındadır. Bireysel SDS-PAGE analizleri yapılmış ve 60 yetişkin, 18 yeni doğanın zehirlerinin biyolojik aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, aynı bölgede bulunan aynı tür olmasına rağmen zehirlerin aktivite ve protein profili açısından önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir [19].

Shashidharamurty ve arkadaşları üç farklı coğrafi bölgeden elde edilen Hint Kobrası (*Naja naja naja*) venomunu elektroforetik desen, biyokimyasal farmakolojik aktiviteler (hemoliz, enzim aktiviteleri, nörotoksisite, miyotoksisite) açısından incelenmiştir. Bakılan biyolojik aktiviteler ve protein profilleri açısından önemli farklılıklar bulmuşlardır [3].

Magro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise birbirine yakın zamanda yakalanan *Crotalus durissus terrificus* bireylerinin zehir örneklerinin venom protein bileşimindeki olası bireysel varyasyonların araştırılması amaçlanmıştır. Protein seviyeleri biyokimyasal yöntemle ölçülmüş ve daha sonra elektroforeze tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlarda analiz edilen tüm venom örneklerinde ortak protein fraksiyonları saptanmasına rağmen bazı nitel ve nicel farklılıklar göstermiştir. Erkek ve dişilerin doğal venom protein kompozisyonunda farklılıklar görülmüştür [8].

Feroze ve arkadaşları çalışmalarında *Echis carinatus*'un zehrinin protein profilinde önemli bireysel varyasyonlar göstermişlerdir. Türlerimize özgü protein bantları bu türlerin profillemesinde yararlı olabilirken zehirli bir yılanın intra-spesifik protein bantlarındaki varyasyonu tespit etmek türünün statüsünü daha güvenilir ve kesin bir seviyede oluşturmaya yardımcı olabilir. Bu çalışmada *Echis carinatus* zehrinin protein desenleri SDS-PAGE aracılığıyla analiz edilmiştir. Bu çalışma Pakistan'ın önemli bir zehirli yılan türünün taksonomik durumunun aydınlatılması için zehir çalışmalarının önemini açıklamaya yardımcı olunmuştur [2].

Menezes ve arkadaşlarının çalışmalarında ise laboratuvarında doğmuş ve yetiştirmiş on sekiz *Bothrops jararaca* örneğinin zehir proteomlarının varyasyonu araştırılmıştır. Bu venomların proteolitik aktivitelerini ölçmek için elektroforetik teknikler ve çeşitli protokoller kullanarak bireysel değişkenlik tespit edilmiş ve kardeşler arasında SDS poliakrilamid jel elektroforezinde erkek venomlara özgü 100 kDa protein bantları gösterilmiştir. Dişi zehirlerinin erkek zehirlerinde olmayan 25 kDa proteinazları içerdiği görülmüştür [15].

Queiroz ve arkadaşlarının çalışmalarında Brezilya'da insan vakalarından sorumlu olan on dokuz yılanın zehirlerinin biyokimyasal ve biyolojik özellikleri analiz edilmiştir. Özellikle *Crotalidae* ve *Viperidae* yılanlarından oluşan venomlar zengin serin proteazlar ve metaloproteaz kaynaklarıdır. Bu venomların proteolitik aktivitesini nötralize etme yetenekleri de test edilmiştir. Burada elde edilen sonuçlar kompozisyon ve aktivitelerde geniş bir varyasyon varlığını göstermektedir. Anti-serumun analiz edilen tüm zehirlerin toksik aktivitelerini tamamen nötralize edemediği görülmüştür. Bu sonuçlar tamamen etkili bir terapötik anti-serumun hazırlanmasında immünizasyon karışımına başka zehirlerin dahil edilmesi gerektiğini düşündürmektedir [4].

Iğci ve Demiralp *M. lebetina*'nın venomunu literatürde ilk kez 2D-PAGE ile çalışmış ve ayrıca Türkiye ve Kıbrıs'ta bu yöntemle yılan zehirlerinin bölgesel varyasyonlarını belirlemeyi amaçlayan ilk çalışmayı yapmıştır. İki alt tür arasında protein spotlarında farklılıklar bulunmuş ve kütle spektrometresi ile bu proteinler tanımlanmıştır [1].

3. 2. *Macrovipera lebetina* Zehri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Macrovipera lebetina Türkiye'de ve Kıbrıs'ta bazı rahatsızlıklarla hastane bakımına neden olan ısırık vakalarından sorumlu olduğu için tıbbi açıdan da önemli olan bir engerek türüdür [1,29].

Yücel çalışmasında yurdumuzda bulunan 14 zehirli yılan türünden *Viperidae* (Engerekgiller) familyasına dahil *Macrovipera lebetina* (Koca Engerek) ile çalışmıştır. Bu çalışmada *Macrovipera lebetina* zehrinin 0,5, 1, 1,5 mg/kg olarak belirlenen zehir dozlarının farelerin kuyruk toplardamarına enjeksiyonu ile farelerin karaciğer, böbrek, ve kalp dokularında oluşan histopatolojik değişimler incelenmiştir. Histopatolojik incelemeler sonucu karaciğer hepatositlerinde dejenerasyon, hidropik dejenerasyon,

mononükleer hücre infiltrasyon, glomerulus yapısında deformasyon, kalp dokusunda ise nukleus etrafında vakuol, nekroz, hemoroji ve infiltrasyon tespit edilmiştir [37].

İğci ve Demiralp *Macrovipera lebetina* alt türlerinin venomları arasında proteomik karşılaştırma yapmayı amaçlamıştır. İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ile farklılıkları ve alt türlere özgü biyolojik belirteç adaylarını değerlendirmek için çalışma yapmışlardır. *M. lebetina* zehri bu çalışma ile literatürde ilk kez 2D-PAGE ile çalışılmıştır. 2D-PAGE analizi sonucunda istatistiksel testler, iki alt tür arasındaki alt türlere özgü biyolojik belirteç adayları olarak düşünülebilecek bazı önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Daha sonra jelde görülen protein spotları MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır [1].

İğci, çalışmasında Türkiye’de yayılış gösteren tıbbi öneme sahip üç engerek türünün (*Macrovipera lebetina*, *Montivipera xanthina*, *Vipera ammodytes*) zehirlerini kütle spektrometresi tabanlı modern proteomik yöntemlerle karakterize ederek farklılıkları tespit etmiştir. Tez kapsamında yapılan arazi çalışmalarıyla türler doğadan elde edilmiş ve bu üç türün zehirleri 2D-PAGE, jel filtrasyonu ve ters faz kromatografisi ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi gibi biyoanalitik teknikler ile profillenerek varyasyonları belirlenmiştir. Kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilen aminoasit dizilime tabanlı yaklaşım ile üç türün zehirlerinin proteomik karakterizasyonları yüksek doğrulukta gerçekleştirilerek içerdikleri protein aileleri belirlenmiştir [26].

Anadolu’da bulunan *M. lebetina obtusa* zehri üzerinde yapılan çalışmalarda, zehrin antimikrobiyal ve çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri gösterilmiştir [10,12].

Yine *M. lebetina*’nın farklı alt türleri ile ilgili venomik çalışmalar yapılmış ve zehir içerikleri ters faz HPLC ve kütle spektrometresi tabanlı *de novo* peptit sekanslama ile proteomik olarak karakterize edilmiştir [27,38]. Bir diğer çalışmada *Centaurea calolepis* ekstresi ve cnicinin yine Anadolu’da bulunan *M. l. obtusa* zehrine karşı anti-inflamatuar etki gösterebileceği *in vivo* çalışmalar ile ortaya koyulmuştur.

Kütle spektrometresi tabanlı venomik çalışmalar ile farklı bölgelerdeki *M. lebetina* zehirleri karakterize edilmiştir [1,26,27,38].

Ayrıca Őimdiye kadar farklı *M. lebetina* alt tűrleri ile yapılan birçok çalıŐmada çok çeŐitli metalloproteaz, serinproteaz, PLA2, L-amino asit oksidaz, disintegrin, lektin, sinir bűyűme faktűrű gibi proteinler saflaŐtırılarak karakterize edilmiŐtir [17]



4.BÖLÜM

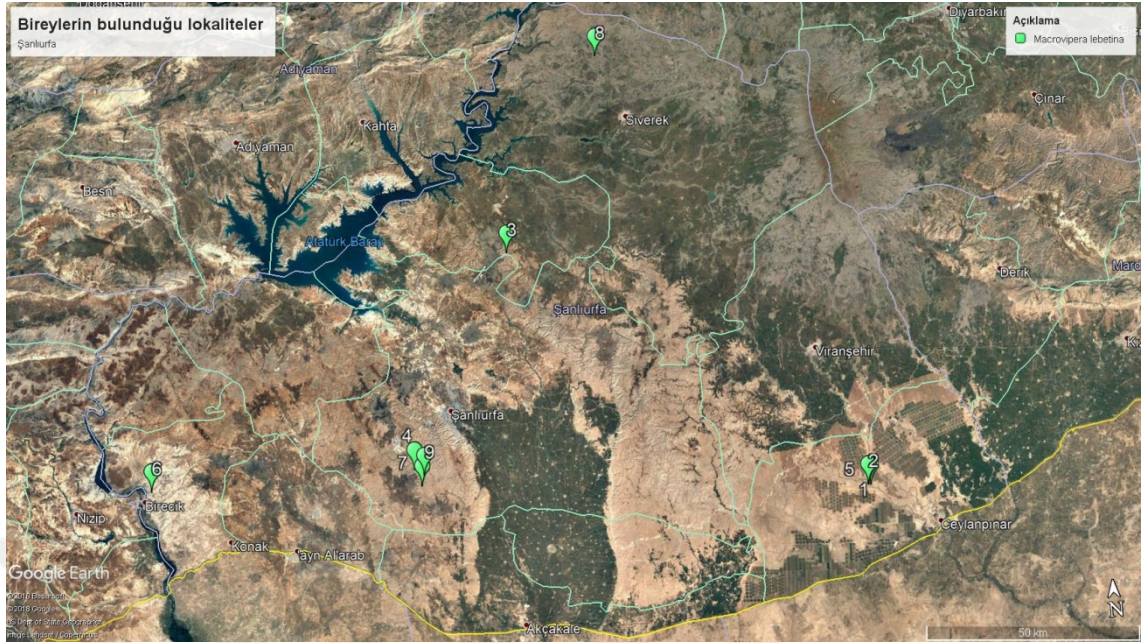
MATERYAL VE METOT

4. 1. Çalışmada Yer Alan *M. lebetina* Bireyleri

Çalışmada kullanılan zehir örnekleri *Macrovipera lebetina obtusa* (Koca Engerek)'nin Şanlıurfa ilinden toplanmış 9 farklı ergin bireyinden elde edilmiştir. Tez danışmanı tarafından gerçekleştirilen arazi çalışmaları için “Şanlıurfa İlinin Karasal ve İç Su Ekosistemleri Biyolojik Çeşitlilik Envanter ve İzleme Projesi” kapsamında Tarım ve Orman Bakanlığından gerekli izinler alınmıştır. Yılanların toplanması için Şanlıurfa ilinde farklı dönemlerde gece ve gündüz arazi çalışmaları yapılmıştır. Bireylere ait lokalite, cinsiyet ve uzunluk bilgileri Tablo 4. 1.'de verilmiştir. Bireylerin Şanlıurfa ilindeki lokaliteleri ayrıca harita üzerinde de işaretlenmiştir (Harita 4. 1.).

Tablo 4. 1. Çalışmada kullanılan bireylere ait bilgiler

Birey Kodu	Toplandığı Yer	Cinsiyet	Uzunluk (SVL)
1. Birey	Mengelen, Ceylanpınar	Dişi	870 cm
2. Birey	Mengelen, Ceylanpınar	Dişi	935 cm
3. Birey	Uzuncuk, Hilvan	Erkek	783 cm
4. Birey	Güzelkuyu, Eyyübiye	Dişi	629 cm
5. Birey	Mengelen, Ceylanpınar	Erkek	845 cm
6. Birey	Kelaynak Vadisi, Birecik	Dişi	741 cm
7. Birey	Demircik, Eyyübiye	Dişi	887 cm
8. Birey	Kapıkaya, Siverek	Dişi	822 cm
9. Birey	Kızılkuyu, Eyyübiye	Bilinmiyor	Bilinmiyor



Harita 4. 1. Bireylerin lokaliteleri. Numaralar birey kodlarını göstermektedir.

4. 2. Zehir Materyalinin Hazırlanması

Zehir sağımı yılanların parafin gerilmiş beherleri ısırtılması yolu ile elde edilmiştir. Zehirler soğukta 5000 x g hızında 5 dk. santrifüj edilmiştir ve hemen -80°C dondurucuya alınmıştır. Daha sonra dondurarak kurutma işlemi ile liyofilize edilmiştir.

4. 3. Protein Miktar Tayini

Liyofilize toz halindeki zehir örnekleri deiyonize su ile çözülmüştür. Protein miktar tayini Bradford yöntemiyle spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Spektrofotometre kuvvetlerine 20 µl örnek, üzerine 980 µl ticari olarak satın alınan Bradford reaktifi eklenmiştir (Thermo Scientific Pierce Coomassie Plus). Örneklerin boyayla reaksiyona girmesi için 15 dk. oda sıcaklığında inkübasyondan sonra spektrofotometrede (Perkin Elmer, Lambda 25) 595 nm’de ölçüm yapılmıştır. Standart olarak 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır (Pierce). Hem standartlar hem de örnekler üç tekrarlı olarak ölçülüp ortalamaları alınmıştır.

4. 4. SDS-PAGE

Çalışmada zehir proteinlerinin moleküler ağırlıklarına göre değerlendirilmesinde SDS-PAGE yöntemi için Bio-Rad marka Mini-Protean Tetra Cell dikey elektroforez sistemi

kullanılmıştır.

SDS-PAGE jeli için % 4 'lük toplama jeli ve %12'lik ayırma jeli Bio-Rad TGX FastCast kiti kullanılarak hazırlanmıştır. Örnekler 5X yükleme tamponu (içerik: 0.3 M Tris-HCl, %10 SDS, %50 gliserol, %0.03 bromofenol mavisi) (Fermentas) ve 20X indirgeyici ajan (2M DTT, Fermentas) ile uygun miktarda karıştırılarak 90 C°'de 2-3 dk. ısıtıldıktan sonra jele yüklenmiştir. Her bir kuyucuğa toplamda 40 µg protein olacak şekilde yükleme yapılmıştır. İzleme boyası jelin altına ulaşınca kadar 100 V elektrik altında elektroforez gerçekleştirilmiştir. Elektroforez yürütme tamponu için 3.03 g Trizma Base, 14.4 g glisin, 1 g SDS 1 litre distile suda çözülmüştür. Marker olarak Bio-Rad Precision plus Protein standard Unstained (Katalog 161-0363) kullanılmıştır.

Boyama için Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılmıştır. Boyamada "blue silver" protokolü uygulanmıştır [39]. İmaj analizi ImageJ programı kullanılarak yapılmıştır.

4. 5. Ters Faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (RP-HPLC)

Yılan zehirlerinde bulunan proteinlerin ters-faz HPLC (RP-HPLC) ile profilleri Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde Agilent 1220 Infinity HPLC cihazında elde edilmiştir. Bu amaçla protein ve peptit ayrımı için uygun olan C18 kolon kullanılmıştır (Agilent Poroshell 120 SB-C18 2.7 µm, 4.6 x 10 mm).

4 mg/ml zehir örneklerinden 20 µl enjeksiyon yapılmıştır. Proteinlerin ayrımında 0.8 ml/dk akış hızı ile doğrusal gradient metodu kullanılmıştır. A: Su + %0.1 TFA, B: Asetonitril + %0.1 TFA olmak koşuluyla İlk 1 dk %5 B, 20. dakikaya kadar %30 B, 50. dakikaya kadar %80 B, 54. dakikaya kadar %5 B, 55. dakikaya kadar %5 B gradient yapılmıştır.

Diode Array Dedector (DAD) ile 210, 215 ve 280 nm dalgaboyunda okuma yapılarak kromatogram elde edilmiştir ve en fazla pikin görüldüğü 215 nm okumasında elde edilen sonuçlar kullanılmıştır.

4. 6. PLA₂ Enzim Aktivitesi Tayini

PLA₂ enzim aktivite tayini için “Cayman secretory PLA₂ assay kit” üreticinin talimatlarına göre kullanılmıştır. Bu kitte enzim substratı olarak diheptanoly phosphatidlycoline 1,2 dithio analogu kullanılmaktadır. Bu maddenin PLA₂ enzimi ile hidrolizi sonucunda oluşan serbest tiol gruplarının 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) maddesi ile reaksiyona girmesiyle oluşan 5-thio-2-Nitrobenzoic asidin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle sonuç elde edilmektedir. Örneklerin ölçümü reaksiyon başlatıldıktan sonra birer dakika arayla 405 nm dalgaboyunda gerçekleştirilmiştir (Perkin Elmer, Victor3). Toplam 10 ölçüm yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak arı zehrinden elde edilen saf PLA₂ enzimi kullanılmıştır. Örnekler 3 teknik tekrarlı olarak çalışılmıştır ve ortalama değerler kullanılarak enzim aktivite değeri elde edilmiştir.

5.BÖLÜM

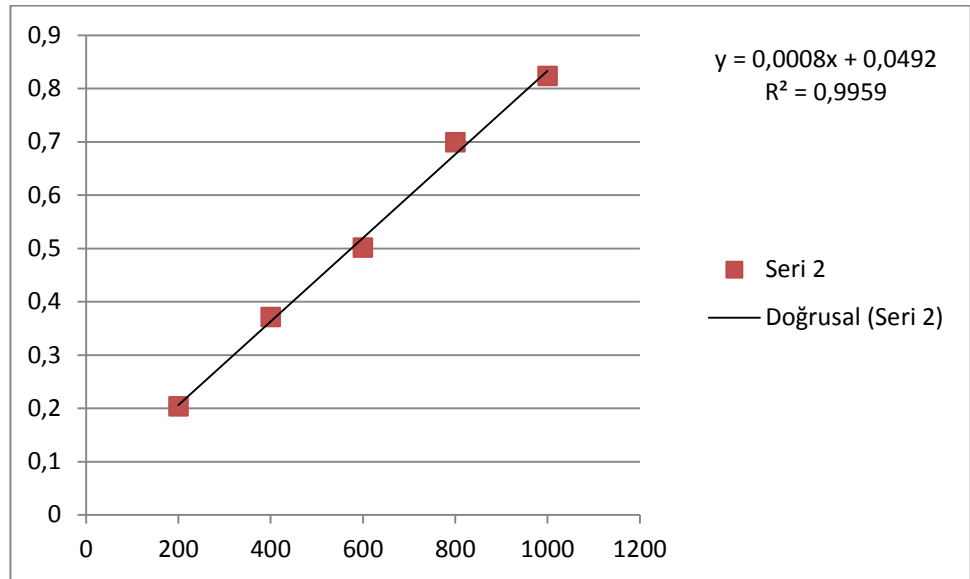
BULGULAR

5. 1. Protein Miktar Tayini Bulguları

Zehir örneklerinin protein miktarları Bradford yöntemi ile hesaplanmıştır. Standartlara ve örneklere ait değerler sırasıyla Tablo 5.1 ve Tablo 5.2’de verilmiştir. Bireyler arasında protein konsantrasyonu ve ham zehrin protein yüzdesi açısından farklılıklar görülmüştür. Protein konsantrasyonları 3,29 mg/ml (2. birey) ile 5,75 mg/ml (8. birey) arasında değişmiştir.

Tablo 5. 1. Bradford miktar tayininde kullanılan BSA standartlarına ait O.D. değerleri

Standartlar	1.tekrar	2.tekrar	3.tekrar	Ortalama
200µg/ml	0,203	0,203	0,204	0,203
400µg/ml	0,375	0,366	0,371	0,370
600µg/ml	0,492	0,500	0,512	0,501
800µg/ml	0,704	0,703	0,689	0,698
1000µg/ml	0,824	0,825	0,820	0,823

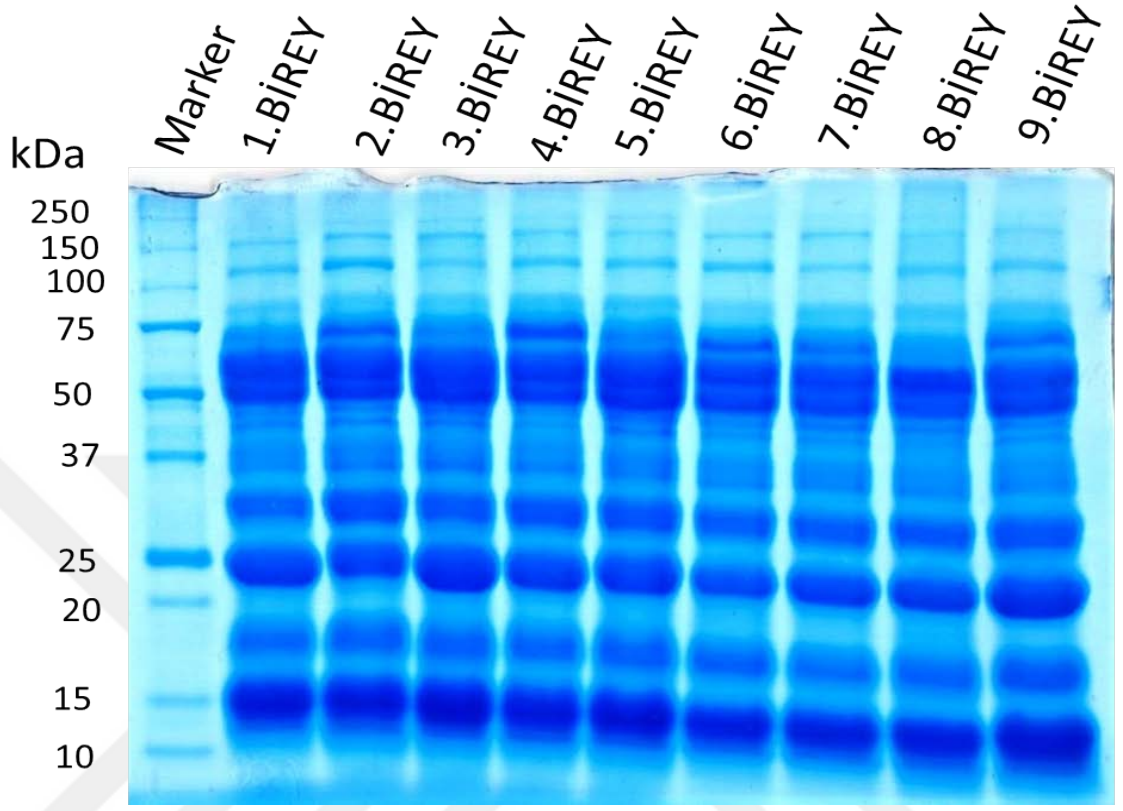


Tablo 5. 2. Zehir örneklerine ait O.D. değerleri ve standart grafiğine göre hesaplanan protein konsantrasyonları ile ham zehir protein yüzdeleri

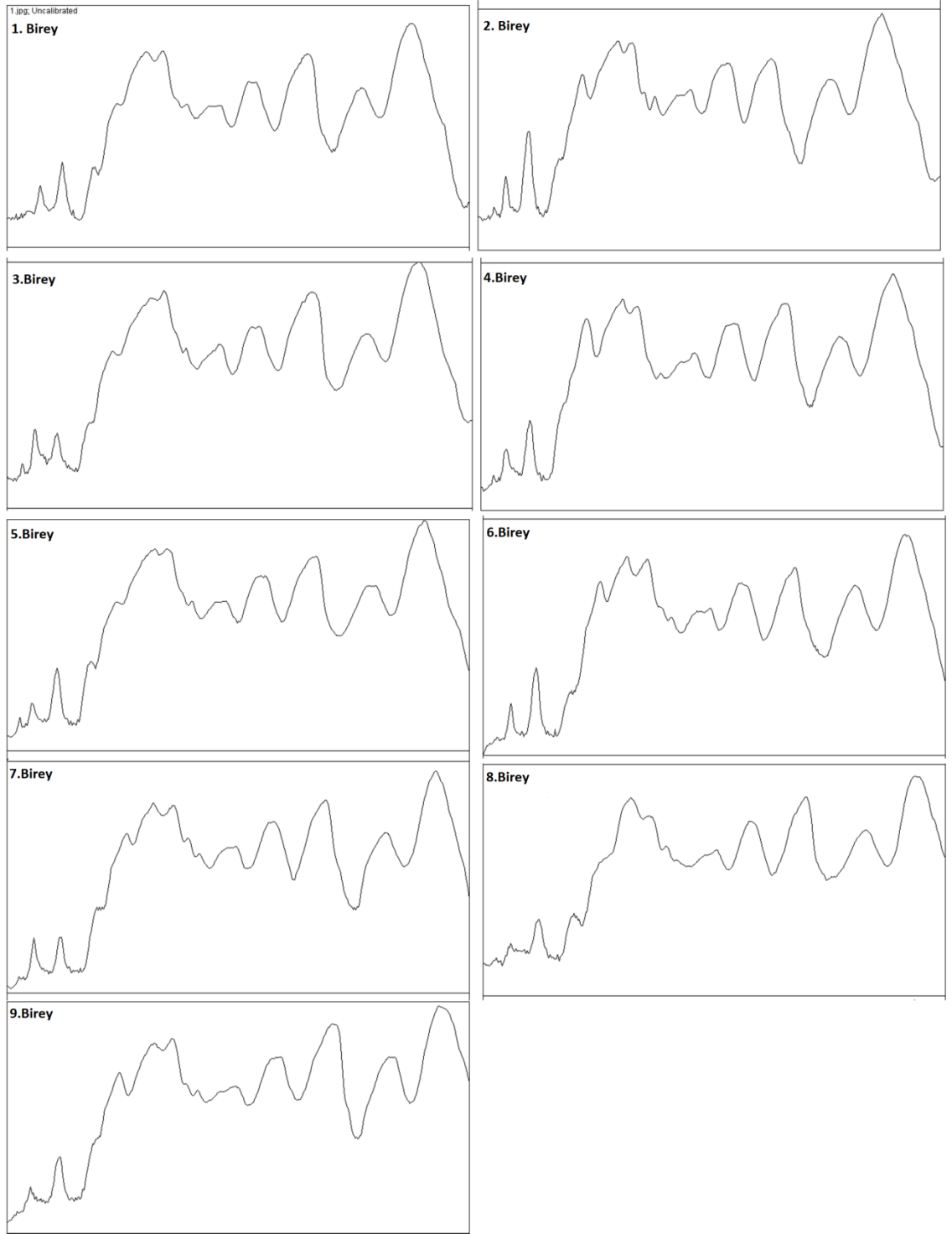
	1.Tekrar	2.Tekrar	3.Tekrar	Ortalama	Protein konsantrasyonu (mg/ml)
1.Birey	0,369	0,385	0,386	0,38	4,13
2.Birey	0,307	0,312	0,320	0,313	3,29
3.Birey	0,338	0,340	0,344	0,340	3,64
4.Birey	0,356	0,365	0,364	0,361	3,90
5.Birey	0,338	0,328	0,341	0,335	3,58
6.Birey	0,433	0,454	0,493	0,46	5,13
7.Birey	0,423	0,438	0,509	0,456	5,09
8.Birey	0,514	0,508	0,507	0,509	5,75
9.Birey	0,363	0,366	0,365	0,364	3,94

5. 2. SDS-PAGE Bulguları

Farklı bireylere ait zehirlerin SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen protein profillerine ait jel fotoğrafı Şekil 5.2’de verilmiştir. Jel fotoğrafının ImageJ programında elde edilen bant yoğunluk grafikleri ise Şekil 5.3’de görülmektedir. Zehir örneklerinde bulunan proteinlerin 150 kDa ile 10 kDa arasında dağılım gösterdiği görülmektedir, proteinlerin büyük kısmı ise 75 kDa altında görülmüştür (Şekil 5.2). Tüm örneklerde yaklaşık moleküler ağırlıkları 150, 120, 80, 70, 60, 50, 48, 45, 37, 30, 25, 18, ve 14 kDa olmak üzere 13 belirgin protein bandı tespit edilmiştir. Örnekler genel olarak bantların şekli açısından birbirine benzerlik göstermektedir ancak bazı bantların yoğunluklarında farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 5.2 ve Şekil 5.3). Örneğin 70 kDa civarındaki protein bandı 2, 4, 6, 7 ve 9 numaralı bireylerde diğerlerine göre daha yoğun olarak gözükmektedir. 100-150 kDa (yaklaşık 120 kDa) arasındaki bantta da örnekler arasında bir varyasyon görülmektedir.



Şekil 5. 2. *Macrovipera lebetina obtusa*'nın farklı bireylerine ait zehirlerin SDS-PAGE yöntemi ile elde edilmiş protein profilleri



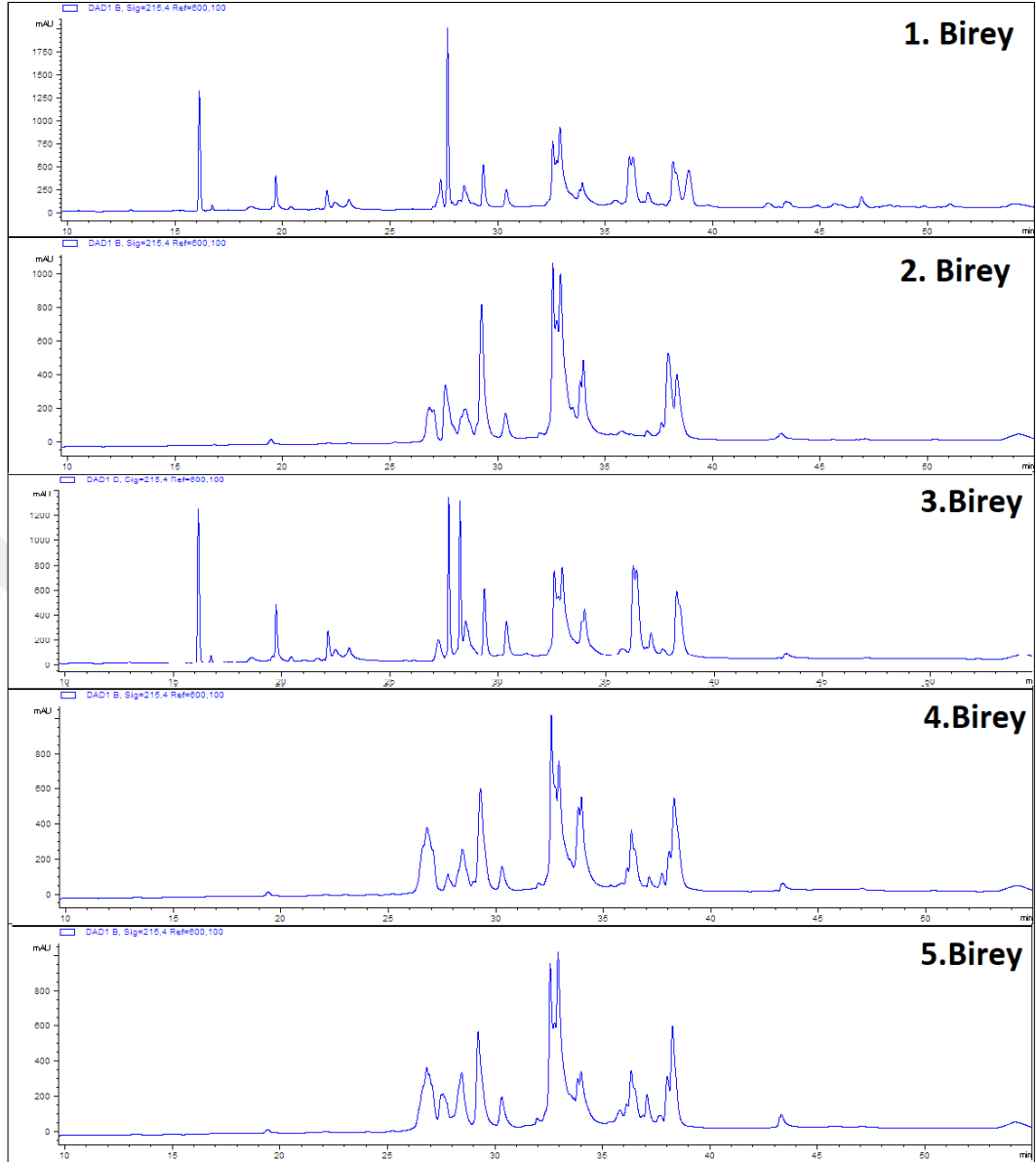
Şekil 5. 3. SDS-PAGE çalışması sonucunda elde edilen jel görüntüsündeki bantların yoğunluk grafiği

5. 3. Ters Faz HPLC Bulguları

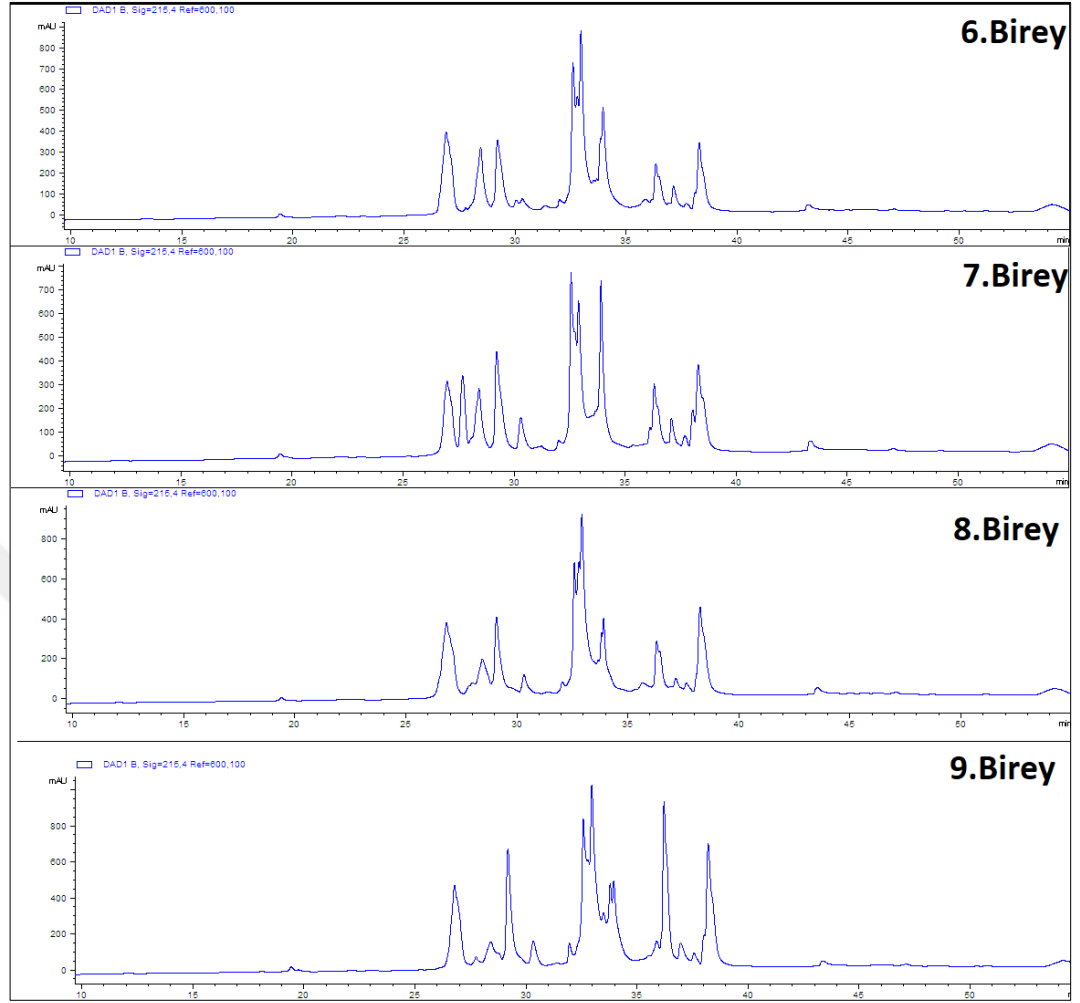
Çalışmada yılan zehirlerinde bulunan proteinlerin ters-faz HPLC (RP-HPLC) ile elde edilmiş kromatogram profilleri karşılaştırılmıştır. Farklı bireylerin zehir proteinleri C18 ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle HPLC sisteminde analiz edilmiştir ve 20'den fazla pik tespit edilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde kromatogramlardaki protein piklerinde kalitatif ve kantitatif bazı farklılıklar göze çarpmaktadır (Şekil 5.3 ve Şekil 5.4). Örneğin 1. birey ve 3. birey örneklerinde 16 ve 20. dk civarında belirgin bir şekilde görülen pikler diğer örneklerde bulunmamaktadır. Bu iki örnek genel kromatogram şekli olarak da diğer örneklerle göre farklıdır. Bunun dışında örneklerin kromatogramları benzerlik göstermektedir ancak piklerin şiddetlerinde farklılıklar görülmektedir. Örneğin 30. ve 35. Dakikada 7. bireyde çıkan pik diğer örneklerle göre daha yüksek değerde görülmektedir ve 27.5. dakikadaki pik tüm örneklerde varyasyon göstermektedir.

Genel olarak piklerin neredeyse tamamı kantitatif farklılık göstermiştir, ayrıca yukarıda bahsedilen bazı kalitatif farklılıklar da mevcuttur.



Şekil 5. 4. *Macrovipera lebetina obtusa* zehirlerine ait ters faz kromatogramları (1.Birey, 2.Birey, 3.Birey, 4.Birey, 5.Birey)



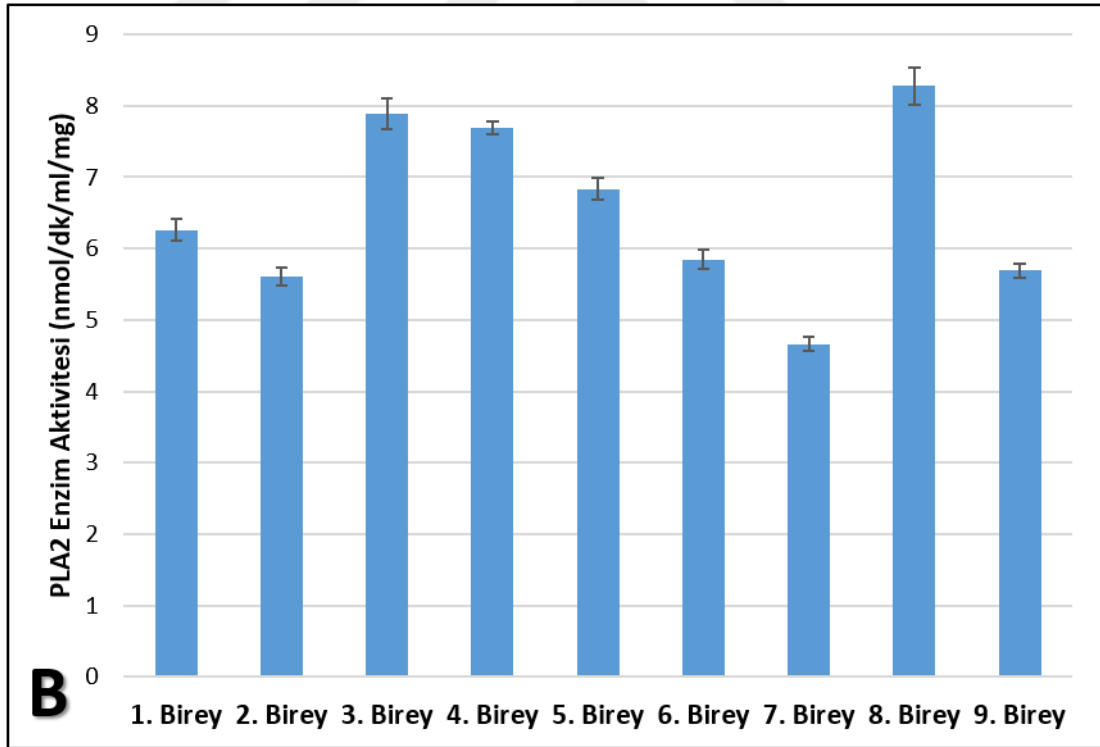
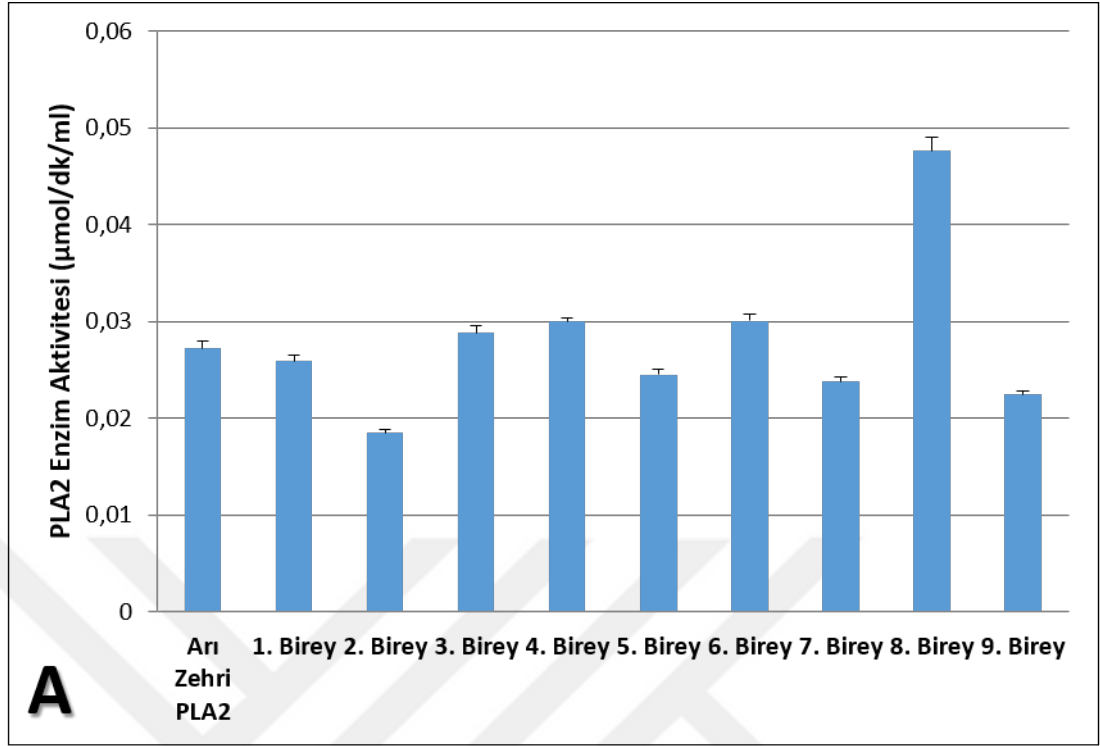
Şekil 5. 5. *Macrovipera lebetina obtusa* zehirlerine ait ters faz kromatogramları (6.Birey, 7.Birey, 8.Birey, 9.Birey)

5. 4. PLA₂ Enzim Aktivite Bulguları

Enzim aktivite tayini çalışması sonucunda zehir örneklerinin PLA₂ aktiviteleri öncelikle $\mu\text{mol/dk/ml}$ cinsinden hesaplanmıştır (Tablo 5.3). Arı zehri saf PLA₂ enzimi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Daha sonra, literatürle karşılaştırmalarda uyumlu olması açısından $\text{nmol/dk/ml/mg}(\text{protein})$ şekline dönüştürülmüştür (Tablo 5.3). Şekil 5.6'da elde edilen sonuçların bar grafikleri verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, nmol/mg şeklinde dönüştürülen PLA₂ aktivitelerinin 5,69-8,27 arasında değiştiği ve bireyler arasında varyasyon gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek aktiviteye sahip 8 numaralı birey ile en düşük aktiviteye sahip 7 numaralı birey arasında 2,58 nmol/mg kadar bir fark vardır.

Tablo 5. 3. Zehir örneklerine ait PLA₂ enzim aktivitesi değerleri

Örnek	PLA₂ Aktivitesi (μmol/dk/ml)	PLA₂ Aktivitesi (nmol/dk/ml/mg)
Arı zehri saf PLA ₂	0,0272 \pm 0,0007	
1.Birey	0,0258 \pm 0,0006	6,25 \pm 0,14
2.Birey	0,0184 \pm 0,0004	5,60 \pm 0,12
3.Birey	0,0287 \pm 0,0007	7,89 \pm 0,21
4.Birey	0,0300 \pm 0,0003	7,68 \pm 0,09
5.Birey	0,0244 \pm 0,0005	6,83 \pm 0,15
6.Birey	0,0300 \pm 0,0006	5,84 \pm 0,12
7.Birey	0,0237 \pm 0,0005	4,66 \pm 0,10
8.Birey	0,0476 \pm 0,0014	8,27 \pm 0,25
9.Birey	0,0224 \pm 0,0003	5,69 \pm 0,09



Şekil 5. 6. Fosfolipaz A₂ enzim aktivitesi sonuçlarının bar grafiği şeklinde gösterimi. A: µmol/dk/ml şeklinde gösterim, B: nmol/dk/ml/mg protein spesifik aktivite şeklinde gösterim

6.BÖLÜM

SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Yılan zehirlerinin peptit tabanlı ilaç keşfi olarak kaynak olması ve zehirli yılan ısırıklarının önemli bir sağlık sorunu olarak ele alınması sebebiyle son yıllarda dünya genelinde yılan zehri araştırmalarına verilen destek ve buna paralel olarak da yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Bu çerçevede Türkiye'nin vaka üretmesi açısından önemli bir türü olan Koca Engerek zehrinin bireysel varyasyonunu inceleyen çalışma ilk kez bu tez kapsamında yapılmıştır.

Tez kapsamında Türkiye'de yayılış gösteren *Macrovipera lebetina obtusa* (Koca Engerek)'nin Şanlıurfa ilinden toplanmış 9 bireyine ait zehirlerin SDS-PAGE ve RP-HPLC yöntemleriyle protein profilleri karşılaştırılmış ve PLA₂ enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

SDS-PAGE sonucunda 150-10 kDa arasında protein bantları görülmekle birlikte, 70 kDa altında 6 protein bandı daha yoğun olarak gözükmektedir. Bu bulgu literatür ile de uyumludur [1,26,27]. Bu bantlar yaklaşık 60, 50, 30, 25, 18 ve 14 kDa ağırlığındaki protein/proteinlerden oluşmaktadır. Literatürde şimdiye kadar *M. lebetina*'nın farklı alt türlerinin zehrinden saflaştırılan proteinler incelendiğinde; 60 ve 50 kDa'da metalloproteazlar ve serin proteazlar, 30 kDa'da serin proteazlar, 25 kDa metalloproteaz tipleri ve vasküler endotel büyüme faktörü, 18 kDa civarında C-tipi lektin ve yaklaşık 14 kDa ağırlığında PLA₂ enzimleri ve dimerik disintegrinler tanımlanmıştır [17,26]. Bunların dışında 120 kDa ve 150 kDa seviyesinde daha silik protein bantları gözükmektedir. Bantların yoğunluğunun az olması, bu proteinlerin zehirdeki miktarlarının da düşük olduğunu göstermektedir. Yine daha önce *M. lebetina* zehrinden yaklaşık 140 kDa ağırlığına sahip dimerik L-amino asit oksidaz, yaklaşık 120 kDa'da dimerik 5'-nükleotidaz/fosfodiesteraz saflaştırılıp karakterize edilmiştir [17]. Sonuçlarımız literatür verileri ile karşılaştırıldığında, incelenen *M. l. obtusa* zehirlerinden başlıca bulunan protein gruplarının serin ve metalloproteazlar, PLA₂, C-tipi lektin, disintegrin olduğu söylenebilir. L-amino asit oksidaz ve 5'-nükleotidaz daha az miktarda bulunmaktadır. Bu sonuç literatür verileri ile de uyumludur [26,27].

SDS-PAGE, örnekteki proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. *M. lebetina*'nın farklı bireylerine ait zehir örneklerinde bulunan protein profillerinin birbirine genel olarak benzer olduğu görülmüştür. Bu beklenen bir sonuçtur. Fakat bazı bantların yoğunluklarında görülen farklılıklar, zehirler arasında proteinler açısından kantitatif varyasyon bulunduğunu göstermektedir. Örneğin bu farklılıklardan biri yaklaşık 70 kDa ağırlığındaki bir bantta görülmektedir. Daha öne *M. lebetina* zehri üzerinde yapılan proteomik çalışmada bu ağırlığa sahip proteinler metalloproteaz olarak tanımlanmıştır [17,26]. Ayrıca yine varyasyon görülen yaklaşık 120 kDa ağırlığındaki bantta, literatür bilgileriyle karşılaştırıldığında fosfodiesteraz/5'-nükleotidaz enzimleri olabileceği görülmektedir [17]. Engerek zehirlerindeki proteazlar klinik açıdan da önemli proteinlerdir ve elde ettiğimiz sonuçlar proteazlar açısından bireysel varyasyonlar görülebileceğini ortaya koymaktadır. Bu durum ısırılma vakalarında oluşan klinik tablonun derecesini etkileyebilir.

Ters faz HPLC analizi sonuçları incelendiğinde de benzer şekilde örnekler arasında varyasyon görülmektedir. HPLC yöntemiyle protein profilindeki varyasyonlar daha hassas ve daha açık şekilde ortaya koyulabilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda da benzer şekilde, kromatografi sonuçlarının SDS-PAGE yöntemine göre daha hassas karşılaştırmaya olanak sağladığı belirtilmektedir [19,31]. Beklenen şekilde, örneklerin HPLC kromatogramları genel olarak birbirine benzemektedir ancak örnekler arasında gözle görülür kantitatif ve kalitatif farklılıklar tespit edilmiştir. Bazı pikler sadece bazı örneklerde gözükürken, piklerin şiddeti de genel olarak varyasyon göstermiştir. Özellikle bazı bireylere özgü olarak görülen piklerde hangi proteinlerin olduğunun tespiti için kütle spektrometresi yardımıyla protein tanımlama yapılması gerekmektedir.

Bireyler arasında aktivitesi karşılaştırılan fosfolipaz A₂ enzimleri gliserofosfolipidleri gliserol omurga serbestleştirici lizofosfolipitlerin ve yağ asitlerinin sn-2 pozisyonunda hidrolize eder. Yılan zehri PLA₂ enzimleri avın sindirimindeki olası rollerine ek olarak normal fizyolojik süreçlere müdahale ederek çok çeşitli farmakolojik etkiler sergilerler. Yılan zehirlerinin en zehirli ve etkili farmakolojik olarak aktif bileşenlerinden bazıları ya PLA₂ enzimleri ya da PLA₂ -protein kompleksleridir. Yılan zehirleri genellikle çok sayıda PLA₂ izoenzimini içerir. Bu izoenzimler farklı farmakolojik etkiler sergileyebilir [24]. PLA₂ 'nin fosfolipitler üzerindeki hidrolitik aktivitesinden dolayı inflamasyon ve ağrı dahil olmak üzere birçok patofizyolojik işlemde yer aldığı iyi bilinmektedir [40].

Daha önceki çalışmalarla *Macrovipera lebetina* zehrinden de PLA₂ enzimi tanımlanmıştır ve zehirde bol olarak bulunan başlıca protein gruplarından olduğu belirlenmiştir [1,17,25-27,38]. Bu çalışmadaki SDS-PAGE sonucuna göre de PLA₂ araştırılan bireylerin zehrinde bulunan başlıca protein grubudur.

Yukarıda bahsedilen önemli etkileri sebebiyle bireyler arasında PLA₂ enzim aktivitesinin varyasyonu da araştırılmıştır. Protein miktar tayini sonuçlarına göre, zehirlerin kuru ağırlığına göre toplam protein yüzdesi de varyasyon göstermektedir. Total protein oranı fazla olan zehir örneğinin enzim aktivite değerinin de yüksek olması beklenebilir. Bu nedenle enzim aktivite değeri hesaplanırken farklı protein yüzdeleri normalize edilerek nmol/mg protein şeklinde spesifik aktivite sonuçları da hesaplanmıştır ve literatürde yer alan verilerle karşılaştırma yapmak için de bu sonuçların kullanılması daha doğru olacaktır. Bireylere ait PLA₂ aktiviteleri 5,69-8,27 nmol/ml/mg arasında değişmektedir. Çalışılan türe yakın, cinsin diğer bir üyesi *Macrovipera mauritanica* türünün ham zehri üzerinde yapılan bir çalışmada da PLA₂ aktivitesi 7 nmol/ml/mg olarak bulunmuştur [41]. Bu açıdan sonuçlarımız literatür ile uyumludur. Elde edilen sonuçlar, bireylere ait zehirlerin PLA₂ enzim aktivitesi açısından da varyasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Görülen bu varyasyon da zehirlerin patolojisini etkileyecek bir durumdur.

Daha önce *M. lebetina* zehrinin proteomik karakterizasyonları yapılmış ve şu ailelere ait proteinler tespit edilmiştir: C-tipi lektin, sisteince zengin salgı proteinleri, disintegrin, L-amino asit oksidaz, fosfolipaz A₂, metalloproteaz, serin proteaz, damar endotel büyüme faktörü, bradikinin etkinleştirici peptitler, proteaz inhibitörü peptitler [26,27]. Bu çalışmada görülen varyasyon, bahsi geçen protein ailelerinin bir ya da birkaçında birden kalitatif ve kantitatif farklılıklar olduğunu göstermektedir. Ancak kesin olarak söyleyebilmek için proteomik analizler ile tanımlama yapılmalıdır.

Şimdiye kadar farklı türlerin zehri üzerinde yapılan çalışmalarda hem protein profilleri, hem enzim aktiviteleri, hem de toksik etkileri açısından bireysel varyasyon gösterebildiği ortaya koyulmuştur. Bu varyasyonun sebepleri farklı çalışmalarda yaş, beslenme, coğrafik izolasyon ve iklimsel faktörler olarak önerilmiştir [9,15,19,36]. Mojave çingiraklı yılanı üzerinde yeni yapılan bir çalışmada ise bireysel zehir varyasyonu detaylı olarak araştırılmış, varyasyonun beslenme ve popülasyon

seviyesindeki farklılıklardan daha çok çevresel faktörlerle korelasyon gösterdiği bulunmuştur [42].

Lourenço ve arkadaşları çalışmalarında Brezilya'da birbirine yakın noktalardan toplanan *Crotalus durissus terrificus* yılan zehirlerinin biyokimyasal, farmakolojik ve enzimatik özelliklerini değerlendirerek bireysel varyasyonlarını karakterize etmeyi amaçlamıştır [19]. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, SDS-PAGE ve RP-HPLC kullanılan yöntemler arasındadır. 315 birey ile yaptıkları SDS-PAGE analizleri sonucunda özellikle erişkin ve yeni doğmuş bireylerin zehirleri arasında daha belirgin farklılık görülmüştür, ancak erişkin bireyler arasında da belli bir derece varyasyon vardır. Yaptıkları RP-HPLC sonuçlarında bireyler arasındaki varyasyon daha belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır, bu bulgu bizim sonuçlarımız ile de uyumludur. Elde edilen bulgulara göre araştırmacılar aynı bölgede bulunan aynı tür olmasına rağmen zehirlerin aktivite ve protein profili açısından önemli ölçüde varyasyon gösterebildiği sonucuna varmışlardır [19]. Bu çalışma kapsamında zehri incelenen *M. lebetina* bireyleri de birbirine çok yakın noktalardan toplanmış olup, aralarında 300 metreden daha az mesafe bulunan bireylerin zehirlerinde dahi varyasyon görülebildiği tespit edilmiştir ve bu anlamda sonuçlar Lourenço ve arkadaşları tarafından başka bir türde yapılan çalışmayı destekler niteliktedir.

Menezes ve arkadaşları araştırmalarında cinsiyete dayalı on sekiz *Bothrops jararaca* kardeş arasında yılan zehri proteomunun bireysel varyasyonunu araştırmışlardır. Bu zehirlerin proteolitik aktivitelerini ölçmek için elektroforetik teknikler ve çeşitli protokoller kullanarak bireysel değişkenlik tespit etmişlerdir. Cinsiyete özgü proteomik benzerlikler ve kardeş yılanlar arasındaki farklılıkları vurgulamışlardır. Yapılan SDS-PAGE çalışmasında erkek zehirlerine özgü 100 kDa'lık protein bantları görülmüştür. Bu çalışmada kardeş yılanlarının zehir proteomunda cinsiyete dayalı farklılıklar gösterilmiştir. Hem dişi hem erkek zehirlerinde moleküler kütleleri 50, 20, 14, 10 kDa olan dört ana protein grubu tespit edilmiştir. Ancak 50 kDa'nın bileşenleri erkek zehirlerinde zayıf boyanmış ve bu zehirlerde bu toksinlerin daha az olduğunu göstermektedir [15].

Dos-Santos ve arkadaşları çalışmalarında Brezilya'da bulunan aynı coğrafi bölgeden altı adet *Crotalus durissus ruruima* yılan örneği zehirleri ayrı ayrı ana farmakolojik

özellikleri açısından test edilmiştir. Zehirlerin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri aileler ve yılan cinsleri arasında önemli farklılıklar gösterebilir. Bireysel örneklerin aynı popülasyondaki farklı örneklerden alınan zehirlerin hem kalitatif hem de kantitatif olarak aktivitelerinde değiştiği gösterilmiştir. Çalışmalarında %15'lik jel üzerinde SDS-PAGE proteinler karşılaştırılmıştır. Sonucunda protein bantları 14 kDa'da daha belirgin olarak gözükmemektedir ve protein profillerinde kalitatif ve kantitatif farklılıklar ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak *Crotalus durissus ruruima* zehirleri aynı yerde olsa bile bireysel varyasyon nedeniyle ısırılan hastalarda gözlenen semptomların niteliksel ve niceliksel çeşitliliğinde görülen varyasyonun rolü olabileceği önerilmiştir [43].

Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da Anadolu'da bulunan *M. lebetina obtusa* zehrinde hem proteomik profil açısından hem de zehrin etkisi açısından bireysel varyasyon görüldüğünü ilk kez ortaya koymuştur. Literatürde başka türlerde de benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Görülen zehir varyasyonları ile bireylerin cinsiyetleri veya boyları arasında belirgin bir korelasyon tespit edilememiştir. Ancak bu şekilde istatistiksel korelasyonların belirlenebilmesi için daha fazla sayıda örnek ile çalışma yapılabilir. Türün Türkiye'deki farklı coğrafik popülasyonlarından örneklemeler yapıp kütle spektrometresi tabanlı venomik yaklaşımıyla detaylı zehir analizlerinin gerçekleştirilmesi ve bulguların ekolojik analizler ile desteklenmesi, Anadolu'da bulunan *M. lebetina obtusa* zehir bireysel varyasyonunu daha kapsamlı olarak ortaya koyabilecektir. Tez bulguları ve devamı niteliğinde yapılabilecek çalışmalar hem Türkiye'de yapılan anti-serum üretimi çalışmaları için hem de ısırılma vakalarında klinik tablonun daha kapsamlı değerlendirilmesi için önemli bilimsel veriler sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. 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”, *Archives of Toxicology*, 86, 441-451, 2012.
2. Feroze, A., Malik, S., Qureshi, T., “Intraspecific variation in the venom electrophoretic profile of saw-scaled viper, *Echis carinatus* of central Punjab, Pakistan”, *The Internet Journal of Veterinary Medicine*, 6 (2), 1-7, 2008.
3. Shashidharamurthy, R., Jagadeesha, D.K., Girish, K. S., Kamparaju, K., “Variations in biochemical and pharmacological properties of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom due to geographical distribution”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 229, 93-101, 2002.
4. Queiroz, G. P., Pessoa, L. A., Portaro, F. C. V., Furtado M. F. D., Tambourgi, D. V., “Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bathrops* genus”, *Toxicon*, 52, 842-851, 2008.
5. Chippaux, J.-P., “Snake Venoms and Envenomations”, *Krieger Publishing Company*, Florida, 2006.
6. Arıkan, H., Kumlutaş, Y., Türkozan, O., Baran, İ., “Electrophoretic patterns of some viper venoms from Turkey”, *Turkish Journal of Zoology*, 27, 239-242, 2003.
7. Kelle, İ., “Terapötik Potansiyele Sahip Venom Peptidleri”, *Dicle Tıp Dergisi*, 33 (2), 113-126, 2006.
8. Magro, A. J., Da Silva, R. J., Ramos, P. R. R., Cherubini, A. L., Hatayde, M. R., “Intraspecific variation on the venom electrophoretic profile of recently captured *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes”, *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 7 (2), 276-301, 2001.
9. Arıkan, H., Göçmen, B., İğci, N., Akman, B., “Age-dependent variations in the venom proteins of *Vipera kaznakovi* Nikolsky, 1909 and *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae)”, *Turkish Journal of Zoology*, 38 (2), 216-221, 2014.

- 10 Özen, M. O., İğci, N., Yalçın, H.T., Göçmen, B., Nalbantsoy, A., “Screening of cytotoxic and antimicrobial activity potential of anatolian *Macrovipera lebetina obtusa* (Ophidia: Viperidae) crude venom” *Frontiers in Life Science*, 8, 363-370, 2015.
11. Nalbantsoy, A., Hempel, B. F., Petras, D., Heiss, P., Göçmen, B., İğci, N., Yıldız, M. Z., Süßmuth, R. D., “Combined venom profiling and cytotoxicity screening of the Radde’s mountain viper (*Montivipera raddei*) and mount bulgar viper (*Montivipera bulgardaghica*) with potent cytotoxicity against human A549 lung carcinoma cells”, *Toxicon*, 135, 71-83, 2017.
- 12 Süzergöz, F., İğci, N., Çavuş, C., Yıldız, M. Z., Coşkun, M. B., Göçmen, B., “In vitro cytotoxic and proapoptotic activities of Anatolian *Macrovipera lebetina obtusa* (Dwigubski, 1832) crude venom on cultured K562 human chronic myelogenous leukemia cells”, *UHOD International Journal of Hematology and Oncology*, 26 (1), 37-46, 2016.
- 13 Petras,D., Hempel, B. F., Göçmen, B., Karis, M., Whiteley, G., Wagstaff, S. C., Heiss, P., Casewell, M. R., Nalbantsoy, A., Süßmuth, R. D., “Intact protein mass spectrometry reveals intraspecies variations in venom composition of a local population of *Vipera kaznakovi* in North eastern Turkey”, *Journal of Proteomics*, 199, 31-50, 2019.
14. Vonk, F. J., Jackson, K., Doley, R., Madaras, F., Mirtschin, P. J., Vidal, N., “Snake venom: from fieldwork to the clinic”, *Bioessays*, 33, 269-279, 2011.
15. Menezes, M. C., Furtado, F. M., 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.
16. Vija, H., Samel, M., Siigur, E., Aaspõllu, A., Trummal, K., Tõnismagi, K., Subbi, J., Siigur, J., “Purification, characterization and cDNA cloning of acidic platelet aggregation inhibiting phospholipases A2 from the snake venom of *Vipera lebetina* (Levantine viper)”, *Toxicon*, 54 (4), 429-439, 2009.
- 17 Siigur J., Aaspõllu, A., Siigur, E., “Biochemistry and pharmacology of proteins and peptides purified from the venoms of the snakes *Macrovipera lebetina* subspecies”, *Toxicon*, 158, 16-32, 2019.

18. Gutierrez, M. J., Lomonte, B., Leon, G., Alape-Girion, A., Flores-Diaz, M., Sanz, L., Angula, Y., Calvete, J. J., "Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming", *Journal of Proteomics*, 72, 165-182, 2009.
19. Lourenço, A. Jr., Zorzella Creste, C. F., de Barros, L. C., Delazari dos Santos, L., Pimenta, D. C., Barraviera, B., Ferreira, R. S. Jr, "Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: crotoamine assessment and captivity evaluation on the biological activities", *Toxicon*, 69, 75-81, 2013.
- 20 Rima, M., Naini, S. M. A., Karam, M., Sadek, R., Sabatier, J. M., Fajloun, Z., "Vipers of the middle East: A rich source of bioactive molecules", *Molecules*, 23 (10), 2721, 2018.
- 21 Kelle, İ., "Kanser Tedavisinde Biyotoksinler" *Dicle Tıp Dergisi*, 34 (3), 226-232, 2007.
- 22 Lynch V. J., "Inventing an Arsenal: adaptive evolution and neofunctionalization of snake venom phospholipase A₂ genes", *BMC Evolutionary Biology*, 7, 2, 2007.
23. Ghazaryan, N. A., Ghulikyan, L., Kishmiryan, A., Andreeva, T. V., Utkin, Y. N., Tsetlin, U. I., Lomonte, B., Ayvazyan, N. M., "Phospholipases A₂ from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms", *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 1848 (2), 463-468, 2015.
24. Kini, R. M., "Excitement ahead: structure function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes", *Toxicon*, 42 (8), 827-840, 2003.
- 25 Bazaia, A., Pasquier, E., Defilles, C., Limam, I., Kessentini-Zouari, R., Kallech-Ziri, O., El Battari, A., Braguer, D., El Ayeb, M., Marrakchi, N., Luis, J., "MVL-PLA₂, a-snake venom phospholipase A₂ inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions", *PLoS One*, 5(4), e10124, 2010.
- 26 İğci, N., "Türkiye'de yayılış gösteren *Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758), *Montivipera xanthina* (Gray, 1849) ve *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) zehirlerinin karşılaştırmalı proteomik karakterizasyonu, koagülasyon üzerindeki

- etkilerinin ve sitotoksitelerinin belirlenmesi”, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi*, Ankara, 2015.
- 27 Sanz, L., Ayvazyan, N., Calvete, J. J., “Snake venomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei*”, *Journal of Proteomics*, 71 (2), 198-209, 2008.
 - 28 Demiröz, T., Albayrak, G., Nalbantsoy, A., Göçmen, B., Baykan, S., “Anti-inflammatory properties of *Centaurea calolepis* Boiss and cnicin against *Macrovipera lebetina obtusa* (Dwigubsky, 1832) and *Montivipera xanthina* (Gray,1849) venoms in rat”, *Toxicon*, 152, 37-42, 2018.
 - 29 Budak, A., Göçmen, B., “Herpetoloji”, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, İzmir, 2008.
 - 30 Özel Demiralp F. D., İğci, N., Peker, S., Ayhan, B., “Temel Proteomik Stratejiler”, *Ankara Üniversitesi Yayınevi*, Ankara, 2014.
 - 31 Barber, C. M., Madaras, F., Turnbull, R. K., Morley, T., Dunstan, N., Allen, L., Kuchel, T., Mirtschin, P., Hodgson, W. C., “Comparative studies of the venom of a new taipan species, *Oxyuranus temporalis*, with other members of its genus”, *Toxins*, 6, 1979-1995, 2014.
 - 32 Arıkan, H., Keskin Alpagut, N., Çevik, İ. E., Ilgaz, Ç., “Age-dependent variations in the venom proteins of *Vipera xanthina* (Gray, 1849) (Ophidia: Viperidae)”, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30 (2), 163-165, 2006.
 - 33 Gündüz, T., “Kromatografi ve Elektroforez”, *Gazi Kitabevi*, Ankara, 2014.
 - 34 Namiranian, S., Hider, R. C., “Use of HPLC to demonstrate variation of venom toxin composition in the Thailand cobra venoms *Naja naja kaouthia* and *Naja naja siamensis*”, *Toxicon*, 30, 47-61, 1992.
 - 35 Francischetti, I. M., Gombarovits, M. E. C., Valenzuela, J. G., Carlini, C. R., Guimaraes, J. A., “Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Cratales durissus terrificus*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 127, 23-36, 2000.

36. Aguilar, I., Guerrero, B., Maria Salazar, A., 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.
37. Yücel, A. F., “*Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758) (Reptilia: Viperidae) Zehrinin Farelerin Bazı Dokuları Üzerine Toksik Etkileri”, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Çanakkale, 2013.
38. Bazaa, A., Marrakchi, N., El Ayebe, M., Sanz, L., Calvete, J. J., “Snake venomomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*”, *Proteomics*, 5, 4223–4235, 2005.
39. Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P. G., “Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis”, *Electrophoresis*, 25 (9), 1327-1333, 2004.
40. Zambelli, V. O., Picolo, G., Fernandes, C. A. H., Fontes, M. R. M., Cury, Y., “Secreted phospholipases A₂ from animal venoms in pain and analgesia”, *Toxins*, 9 (12), 406, 2017.
41. Oukkache, N., Lalaoui, M., Ghalim, N., “General characterization of venom from the Moroccan snakes *Macrovipera mauritanica* and *Cerastes cerastes*”, *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18 (4), 411-420, 2012.
42. Zancolli, G., Calvete, J. J., Cardwell, M. D., Greene, H. W. Hayes, W. K., Hegarty, M. J., Herrmann, H.-W., Holycross, A. T., Lannutti, D. I., Mulley, J. F., Sanz, L., Travis, Z. D., Whorley, J. R., Wüster, C. E., Wüster, W., “When one phenotype is not enough: divergent evolutionary trajectories govern venom variation in a widespread rattlesnake species”, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286, doi: 10.1098/rspb 2735.2018.
43. Dos-Santos M. C., Asis, E. B., Moreira, T. D., Pinheiro, J., Fortes-Dias, C. L., “Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* from the amazonian region”, *Toxicon*, 46, 958-961, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

Şeyma EROĞLU 01.01.1991 tarihinde Kayseri’de doğdu. İlk, orta ve lise öğretimini Kayseri’de tamamladı. 2010 yılında Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. Bu bölümden 2014 yılında mezun oldu. Akabinde formasyon eğitimi aldı. 2017 yılında özel eğitim kurumlarında çalışmaya başladı.



