

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

MONTIVIPERA RADDEI (RADDE DAĞ ENGEREĞİ) ZEHİRİ
FİBRİNOJENOLİTİK AKTİVİTESİNİN POLİAKRİLAMİT JEL
ELEKTROFOREZİ VE HPLC YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

Tezi Hazırlayan
Fikriye ATASOY

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Aralık 2021
NEVŞEHİR

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

MONTIVIPERA RADDEI (RADDE DAĞ ENGEREĞİ) ZEHİRİ
FİBRİNOJENOLİTİK AKTİVİTESİNİN POLİAKRİLAMİT JEL
ELEKTROFOREZİ VE HPLC YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

Tezi Hazırlayan
Fikriye ATASOY

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Aralık 2021
NEVŞEHİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ danışmanlığında Fikriye ATASOY tarafından hazırlanan “*Montivipera raddei* (Radde Dağ Engereği) Zehri Fibrinojenolitik Aktivitesinin Poliakrilamit Jel Elektroforezi ve HPLC Yöntemleri ile Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

10/12/2021

JÜRİ

Başkan : Doç. Dr. Can ÖZEN

Üye : Doç. Dr. Ümit KUMBIÇAK

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ

ONAY:

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

.../.../2021

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak 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.

Fikriye ATASOY

TEŞEKKÜR

Engin tecrübesi ve bilgisiyle ışık tutan, sabırlı ve anlayışlı yaklaşımıyla sorunların üstesinden gelmemde bana yardımcı olup inanç aşıl原因 ve laboratuvar olanaklarından en üst düzeyde yararlanmamı sağlayan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ'ye,

Analiz hizmetinde gereken ilgiyi gösteren Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (BTUAM),

ABAP20F28 numaralı proje ile çalışmalarını destekleyen Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne,

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı çerçevesinde yüksek lisans çalışmam boyunca bana bursiyerliği layık gören TÜBİTAK BİDEB'e,

Laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Prof. Dr. Aslıhan KARATEPE'ye (Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü),

Örneklerin elde edildiği arazi çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Bayram GÖÇMEN (merhum), Prof. Dr. Mehmet Zülfü YILDIZ (Adıyaman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), Dr. Öğr. Üyesi Bahadır AKMAN (İğdır Üniversitesi İğdır Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu Ormancılık Bölümü), Dr. Öğr. Üyesi M. Anıl OĞUZ (Maltepe Üniversitesi Temel Bilimler Bölümü) ve Dr. Konrad MEBERT'e (İsviçre),

Bugüne kadar bana katkısı ve emeği olan tüm hocalarıma, arkadaşlarıma ve sevdiklerime; her daim yanımda olduğunu hissettiren, bana inanan ve varlığıyla güç veren canım aileme

TEŞEKKÜR EDERİM.

Fikriye ATASOY

Aralık 2021, NEVŞEHİR

***MONTIVIPERA RADDEI* (RADDE DAĞ ENGEREĞİ) ZEHİRİ
FİBRİNOJENOLİTİK AKTİVİTESİNİN POLİAKRİLAMİT JEL
ELEKTROFOREZİ VE HPLC YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fikriye ATASOY

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

Aralık 2021

ÖZET

Engerek zehirlerinde bulunan fibrinojenolitik enzimler kan sulandırma (antikoagülan) potansiyelleri nedeniyle bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve klinikte kalp krizi, derin ven trombozu ve iskemik şok gibi pıhtılaşma hastalıklarında tedaviye yönelik araştırmalar son zamanlarda artış göstermiştir. *Montivipera raddei*, Viperidae ailesine dâhil bir engerek türü olup zehri üzerinde daha önce genel proteomik çalışmalar yapılmıştır. *M. raddei* zehri enzimlerinin fibrinojenolitik aktivitesi SDS-PAGE, zimogram SDS-PAGE ve HPLC yöntemleri kullanılarak ilk kez bu tez çalışmasıyla ortaya çıkarılmıştır. Zehir enzimleri fibrinojenin A α zincirini parçalamıştır. Zehirde bulunan fibrinojenolitik enzim(ler)in protein grubunu belirlemek için EDTA, aprotinin, 1,10-fenantrolin ve PMSF proteaz inhibitörleri kullanılmıştır. Fibrinojenolitik aktivite, metalloproteinaz inhibitörleri olan EDTA ve 1,10-fenantrolin tarafından baskılanmıştır. Bu bulgular, *M. raddei* zehrinin fibrinojenolitik aktiviteye sahip metalloproteinazlar içerdiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Fibrinojen, HPLC, SDS-PAGE, zimogram jel, engerek zehri*

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ

Sayfa Adeti: 74

**DETERMINATION OF THE FIBRINOGENOLYTIC ACTIVITY OF
MONTIVIPERA RADDEI (RADDE'S MOUNTAIN VIPER) VENOM BY
POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS AND HPLC METHODS
(MSc Thesis)**

Fikriye ATASOY

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

December 2021

ABSTRACT

Fibrinogenolytic enzymes in viper venoms have attracted the attention of scientists due to their blood thinning (anticoagulant) potential, and research on the treatment of coagulation diseases such as heart attack, deep vein thrombosis and ischemic shock has recently increased. *Montivipera raddei* is a species of viper belonging to the Viperidae family and general proteomic studies have been performed on its venom before. The fibrinogenolytic activity of *M. raddei* venom enzymes was revealed for the first time in this thesis by SDS-PAGE, zymogram SDS-PAGE and HPLC methods. The venom enzymes cleaved the A α chain of fibrinogen. EDTA, aprotinin, 1,10-phenanthroline and PMSF protease inhibitors were used to determine the protein group of the fibrinogenolytic enzyme(s) found in the venom. Fibrinogenolytic activity was inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline, which are specific metalloproteinase inhibitors. These findings indicate that *M. raddei* venom contains metalloproteinases with fibrinogenolytic activity.

Keywords: Fibrinogen, HPLC, SDS-PAGE, zymogram gel, viper venom

Thesis Supervisor: Asst. Prof. Naşit İĐCI

Page Number: 74

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	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. BÖLÜM.....	1
GİRİŞ	1
1.1 Amaç ve Tez Gerekçesi.....	1
2. BÖLÜM.....	2
GENEL BİLGİLER	2
2.1 Hemostaz.....	2
2.1.1 Birincil hemostaz.....	2
2.1.2 İkincil hemostaz.....	3
2.2 Fibrinojen	4
2.3 Yılan Zehirleri ve İçerikleri.....	6
2.3.1 Viperidae (Engerekler ve çingiraklı yılanlar) zehirleri	7
2.3.2 Fibrinojenolitik sisteme etki eden zehir proteinleri.....	7
2.3.2.1 Yılan zehri serin proteinazları.....	8
2.3.2.2 Yılan zehri metalloproteinazları	9
2.4 Türkiye'deki Yılanlar	10

2.5	<i>Montivipera raddei</i> (Boettger, 1890)	11
2.5.1	Sistematik	11
2.5.2	Coğrafi dağılış ve ekoloji	11
2.5.3	Morfoloji.....	11
2.6	<i>Montivipera raddei</i> Zehri ile İlgili Yapılan Çalışmalar	12
2.7	Yılan Zehirlenmeleri	15
2.8	Tanı ve Tedavi Alanında Yılan Zehri Fibrinojenolitik Enzimleri.....	15
3.	BÖLÜM.....	16
	MATERYAL VE METOT	16
3.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	16
3.2	Kullanılan Alet ve Gereçler.....	16
3.3	Zehir Sağımı ve Saklanması.....	16
3.4	Protein Miktar Tayini	17
3.5	Poliakrilamit Jel Elektroforezi.....	17
3.5.1	Standart SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi.....	17
3.5.2	Fibrinojen zimogram SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi.....	19
3.5.3	Proteaz inhibitörlerinin zehirdeki fibrinojenolitik enzimler üzerindeki etkisinin belirlenmesi.....	20
3.6	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	21
4.	BÖLÜM.....	24
	BULGULAR.....	24
4.1	Protein Miktar Tayini	24
4.2	Poliakrilamit Jel Elektroforezi.....	25
4.2.1	Standart SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi.....	25

4.2.2	Fibrinojen zimogram SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi.....	27
4.2.3	Proteaz inhibitörlerinin zehirdeki fibrinojenolitik enzimler üzerindeki etkisinin belirlenmesi.....	30
4.3	HPLC Bulguları.....	32
5.	BÖLÜM.....	40
	TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
	KAYNAKLAR	47
	EKLER.....	54
	EK-1 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler	55
	EK-2 Deneylerde kullanılan alet ve gereçler	57
	ÖZGEÇMİŞ	58

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Standart SDS-PAGE yönteminde kullanılan deney grupları ve yapılan işlemler.....	18
Tablo 3.2. Proteaz inhibitörleri içeren SDS-PAGE yönteminde kullanılan deney grupları ve yapılan işlemler.....	21
Tablo 3.3. HPLC deneyi için kullanılan kimyasalların miktarları ve son derişimleri....	22
Tablo 3.4. Gradyent akışı içeren HPLC metodu (A: Ultra saf su, B: Asetonitril)	23
Tablo 4.1. Bradford protein miktar tayini sonucu elde edilen OD değerleri.....	24

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Hemostaz yolağı (Düz ok, aktivasyonu; kesikli düz ok, inhibisyonu; kavisli ok, dönüştürmeyi ve çift başlı ok, bağlamayı ifade eder). Kaynak: [10] (Yayıncının izniyle kullanılmıştır).....3
- Şekil 2.2.** İnsan fibrinojeninin üç boyutlu yapısı: (a) Fibrinojen molekülünün, X-ışını kristalografisi ile belirlenen atomik çözünürlük yapısı (PDB Girişi: 3GHG), (b) Fibrinojenin polipeptit zincirlerinin şematik diyagramı. Kaynak: [12] (Yayıncının izniyle kullanılmıştır).....4
- Şekil 2.3.** Fibrin polimerizasyonunun şematik diyagramı. Kaynak: [12] (Yayıncının izniyle kullanılmıştır).....6
- Şekil 2.4.** *M. raddei* zehir proteinleri ve peptitlerinin grafiği (%). Kaynak: [26]..... 13
- Şekil 2.5.** *M. raddei* zehir proteinleri ve peptitlerinin grafiği (%). Kaynak: [28]..... 13
- Şekil 4.1.** Protein miktar tayininde standartlar ve örnekler kullanılarak elde edilen Bradford standart eğri grafiği.....24
- Şekil 4.2.** *M. raddei* zehrinin farklı zaman aralıklarındaki fibrinojenolitik aktivitesini gösteren jel görüntüsü26
- Şekil 4.3.** *M. raddei* zehrinin farklı zaman aralıklarındaki fibrinojenolitik aktivitesini gösteren jel görüntüsündeki bantların yoğunluk grafikleri, (a): F-60, (b): FV-10, (c): FV-30, (d): FV-60 ve (e): FV-120 sütunlarına aittir.....27
- Şekil 4.4.** *M. raddei* ile *M. lebetina* zehri fibrinojenolitik aktivitelerinin zimogram jel görüntüsü.....29
- Şekil 4.5.** (a), (b), (c): *M. raddei* ile (d), (e), (f): *M. lebetina* zehri fibrinojenolitik aktivitelerinin zimogram jel görüntüsündeki bantların yoğunluk grafikleri 30
- Şekil 4.6.** Farklı inhibitörlerin *M. raddei* zehri fibrinojenolitik enzim aktivitesi üzerinde etkisini gösteren jel görüntüsü (VF: zehir ile fibrinojen; VEF: zehir, EDTA ile

fibrinojen; VAF: zehir, aprotinin ile fibrinojen; V1F: zehir, 1,10-fenantrolin ile fibrinojen; VPF: zehir, PMSF ile fibrinojen) (Ayrıca Tablo 3.2.ye bakınız).....	31
Şekil 4.7. Farklı inhibitörlerin <i>M. raddei</i> zehri fibrinojenolitik enzim aktivitesi üzerinde etkisini gösteren jel görüntüsüne ait yoğunluk grafikleri, (a): VF, (b): VEF, (c): VAF, (d): V1F ve (e): VPF sütunlarına aittir. (Ayrıca Tablo 3.2.ye bakınız)	32
Şekil 4.8. C18 kolonundan geçirilen intakt fibrinojenden (İntakt FIB60) elde edilen kromatogram (215 nm)	34
Şekil 4.9. C18 kolonundan geçirilen intakt fibrinojenden (İntakt FIB60) elde edilen kromatogram (280 nm)	35
Şekil 4.10. C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB5) ve fibrinojen-zehir (FV5) örneklerinden elde edilen kromatogram (215 nm).....	36
Şekil 4.11. C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB5) ve fibrinojen-zehir (FV5) örneklerinden elde edilen kromatogram (280 nm).....	37
Şekil 4.12. C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB60) ve fibrinojen-zehir (FV60) örneklerinden elde edilen kromatogram (215 nm).....	38
Şekil 4.13. C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB60) ve zehir-fibrinojen (FV60) örneklerinden elde edilen kromatogram (280 nm).....	39

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. *M. raddei* türü ergin dişi birey (Yer: Aydıncavak-Kağızman/Kars, Fotoğraf: Naşit İGÇİ)..... 12



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
AEBSF	4-(2-aminoetil) benzensülfonil florid hidroklorid
APS	Amonyum persülfat
BPP	Bradikinin-güçlendirici peptit
BSA	Sığır serum albümini
Ca ²⁺	Kalsiyum iyonu
CLP	C-tipi lektin proteini
cm	Santimetre
C-NP	C-natriüretik peptit
CRISP	Sisteince-zengin salgı proteini
DFP	Diizopropil florofosfat
dk.	Dakika
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IAA	İyodoasetamid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
l	Litre
LAO	L-amino asit oksidaz

LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
mM	Milimolar
NGF	Sinir büyüme faktörü
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PLA ₂	Fosfolipaz A ₂
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
RP-HPLC	Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sa.	Saat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
SVMP	Yılan zehri metalloproteinazı
SVSP	Yılan zehri serin proteinazı
SVTLE	Yılan zehri trombin-benzeri enzimi
TEMED	Tetrametiletildiamin
TF	Doku faktörü
TFA	Trifloroasetik asit

TLE	Trombin benzeri enzim
UV	Ultraviyole (mor ötesi)
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
v/v	Hacim/hacim
V	Volt
vWF	von Willebrand Faktör
w/v	Ağırlık/hacim
w/w	Ağırlık/ağırlık

1. BÖLÜM

GİRİŞ

1.1 Amaç ve Tez Gerekçesi

Pıhtılaşma (tromboz) sonucu kalp krizi (miyokard infarktüsü), felç, iskemik şok ve derin ven trombozu gibi hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Küresel Hastalık Yüğü, Yaralanmalar ve Risk Faktörleri (GBD) 2010 Çalışmasına göre dünyada dört ölümden biri iskemik kalp hastalıkları ve felç sonucu meydana gelmektedir. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan çeşitli kan sulandırıcı (antikoagölan) ilaçlar mevcuttur [1].

Klinikte güncel olarak kullanılan ilaçların bazıları yılan zehri protein ve peptitlerinden yola çıkılarak geliştirilmiştir [2]. Özellikle engerek (Viperidae) zehirlerindeki fibrinolitik enzimlerin (metalloproteinazlar ve serin proteinaz yapılı trombin-benzeri enzimler) kan plazmasındaki fibrinojen seviyesini dolaylı yoldan normalin altında tutarak pıhtı oluşumu önleyip kalp krizi ve derin ven trombozu riskini en aza indirme potansiyelleri mevcuttur. Ayrıca yılan zehirlerindeki bu enzimler kan pıhtılaşma bozukluklarının tanısında da kullanılmaktadır (ör: Reptilase®) [2–4]. Tanı ve tedavide kullanım potansiyelleri nedeniyle yılan zehirlerinden yeni fibrinolitik enzimlerin karakterize edilmesi önem arz etmektedir.

Bu tez çalışması ile Türkiye sınırlarında da yaşayan bir engerek türü olan *Montivipera raddei* (Radde Dağ Engereği) zehrinde bulunması muhtemel fibrinolitik enzimlerin varlığı ve aktivitesinin SDS-PAGE, zimogram SDS-PAGE ve HPLC yöntemleriyle ilk kez ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Ayrıca farklı proteaz inhibitörleri kullanılarak zehirde tespit edilecek fibrinolitik aktivitenin hangi enzim ailesinden kaynaklandığının belirlenmesi de tez çalışmasının bir diğer amacıdır.

2. BÖLÜM GENEL BİLGİLER

2.1 Hemostaz

Hemostaz, bir yaralanmadan dolayı oluşabilecek kan kaybını önlemek amacıyla koagülasyonu başlatan ve kan akışını yeniden sağlamak için mevcut pıhtıyı fibrinoliz yoluyla temizleyen işlemlerin bütünüdür. Kısacası hemostaz, kan akışının olağan şekilde sürmesi için gerekli reaksiyonların gerçekleştirildiği bir fizyolojik denge sürecidir. Hemostaz; birincil ve ikincil hemostaz olmak üzere iki adımda gerçekleşir [5–7].

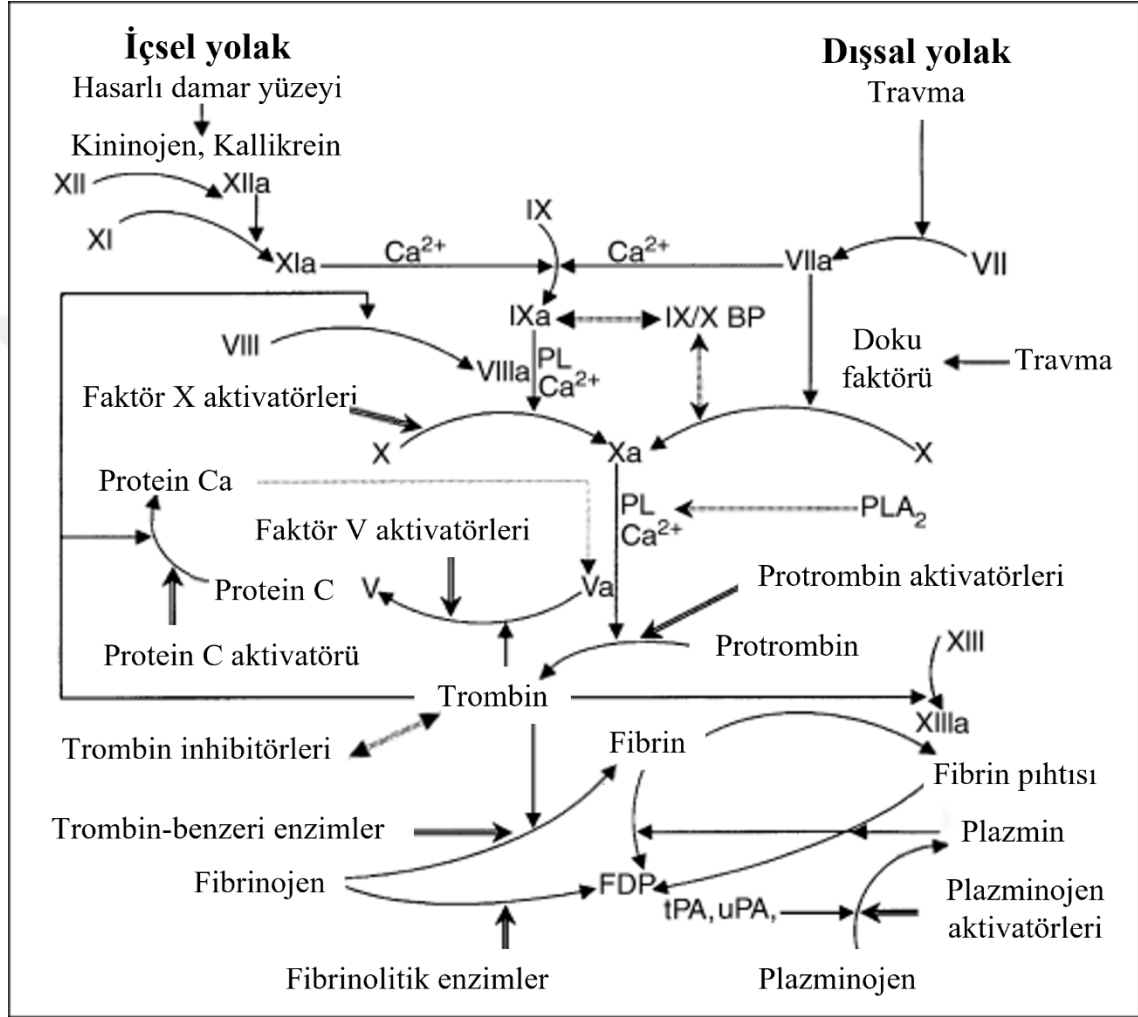
2.1.1 Birincil hemostaz

Damardaki endotel tabakasının hasarıyla açığa çıkan subendotelial tabaka ile kanın teması sonucu hemostaz başlatılır. Plateletlerin subendotelial tabakadaki kolajenlere ve buradan salgılanan von Willebrand faktöre bağlanmasıyla aktivasyonu gerçekleşir [6, 8]. Aktif plateletler serotonin salgılar. Serotonin, vasküler spazmın gerçekleşmesine yardımcı olur. Vasküler spazm ayrıca bölgesel ağrı reseptörü ve endotel hücrelerden salgılanan maddelerin tetiklemesiyle de ortaya çıkar. Böylelikle kan plazmasındaki hücrelerin hasarlı damarlardan dışarı çıkması olabildiğince azaltılır. Bu esnada bölgede koagülasyon faktörlerinin birikimi sağlanır. Aktif plateletler protrombin aktivatörlerini salgılar [6, 7].

Plateletlerin birbirlerine ve endotele yapışmasıyla plateletler kümeleşir ve nihayetinde platelet tıkaçı oluşur. Ayrıca plateletler bölgeye daha fazla platelet çağırmak için ADP ve tromboksan A₂'yi salgılar. Bu sayede platelet tıkaçının oluşumu ve yayılımı hız kazanır [5, 8, 9].

Doku faktörleri (TF), endotelial hücreler ve kan hücreleri hariç tüm transmembran hücrelerin yüzeyinde bulunur. Kanın damar sistemi dışına sızması gibi durumlarda TF salınımı gerçekleşir. TF'nin salınımı, koagülasyon başlangıcının ilk adımıdır. TF, faktör VII'ye bağlanır. TF-VIIa kompleksi antihemofilik faktör B'yi (IX) ve protrombin aktivatörünü (X) aktive eder (IXa ve Xa). Faktör IXa; faktör VIIa, kalsiyum ve

fosfolipit yardımı ile faktör X'i aktiveştirir. Karaciğerde K vitamini desteği ile üretilen protrombin (II), faktör Xa ve faktör Va etkisiyle trombine (IIa) dönüşerek aktif hale gelir. Trombin üretimi hemostazın en mühim aşamasıdır [7].



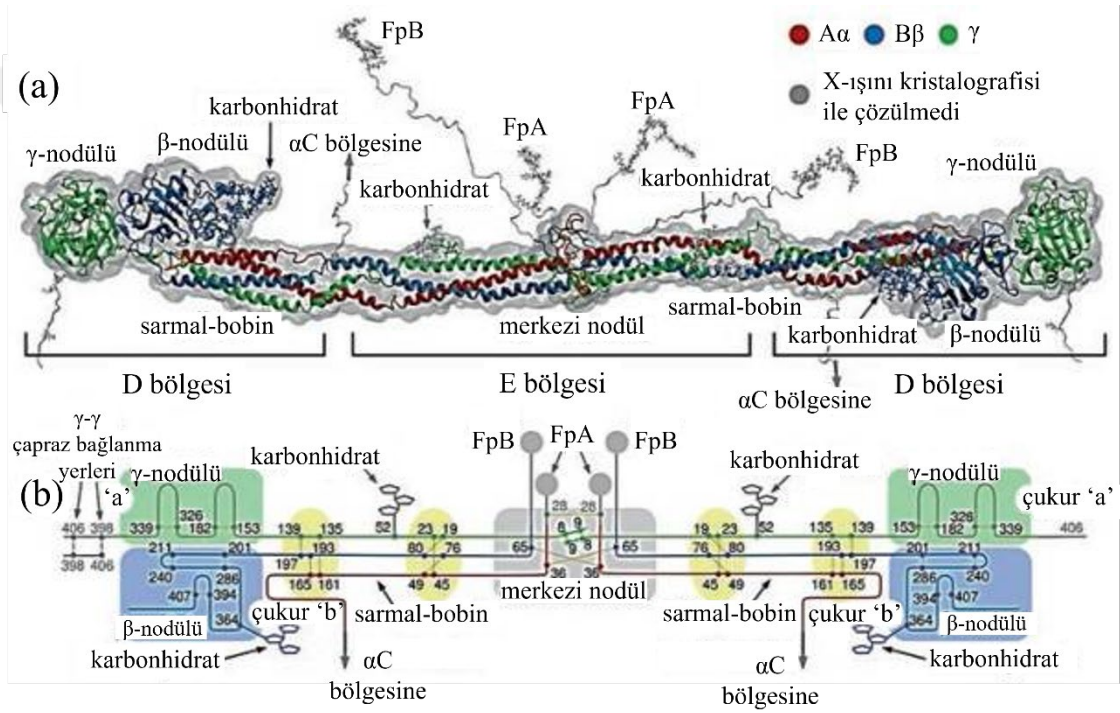
Şekil 2.1. Hemostaz yolağı (Düz ok, aktivasyonu; kesikli düz ok, inhibisyonu; kavisli ok, dönüştürmeyi ve çift başlı ok, bağlamayı ifade eder). Kaynak: [10] (Yayıncının izniyle kullanılmıştır)

2.1.2 İkincil hemostaz

Trombin fibrinojeni fibrin monomerlerine dönüştürür. Fibrin monomerlerinin kendi aralarında bağ yapmasıyla fibrin polimerizasyonu gerçekleşir. Fibrin stabilize edici faktör (XIII) fibrin polimerleri arasında çapraz bağ kurma suretiyle pıhtıyı çözünmez hale getirir. Fibrinin platelet tıkaçına dâhil olmasıyla sağlam bir pıhtı oluşur [11, 12]

2.2 Fibrinojen

Fibrinojen α -helikal sarmal-bobin yapılı ipliksi (fibröz) bir glikoproteindir. 340 kDa'lık ağırlığa sahip olup 2-5 nm çapında ve 45 nm uzunluğundadır [12, 13]. İnsandaki 4. kromozomda birbiriyle bağlantılı bulunan FGA, FGB ve FGG genlerinin ifade edilmesiyle $A\alpha$, $B\beta$ ve γ polipeptit zincirlerinden meydana gelir (post-translasyonel modifikasyona uğramadan önceki moleküler ağırlıkları sırasıyla 66,5; 52,0 ve 46,5 kDa'dur) [12, 14, 15].

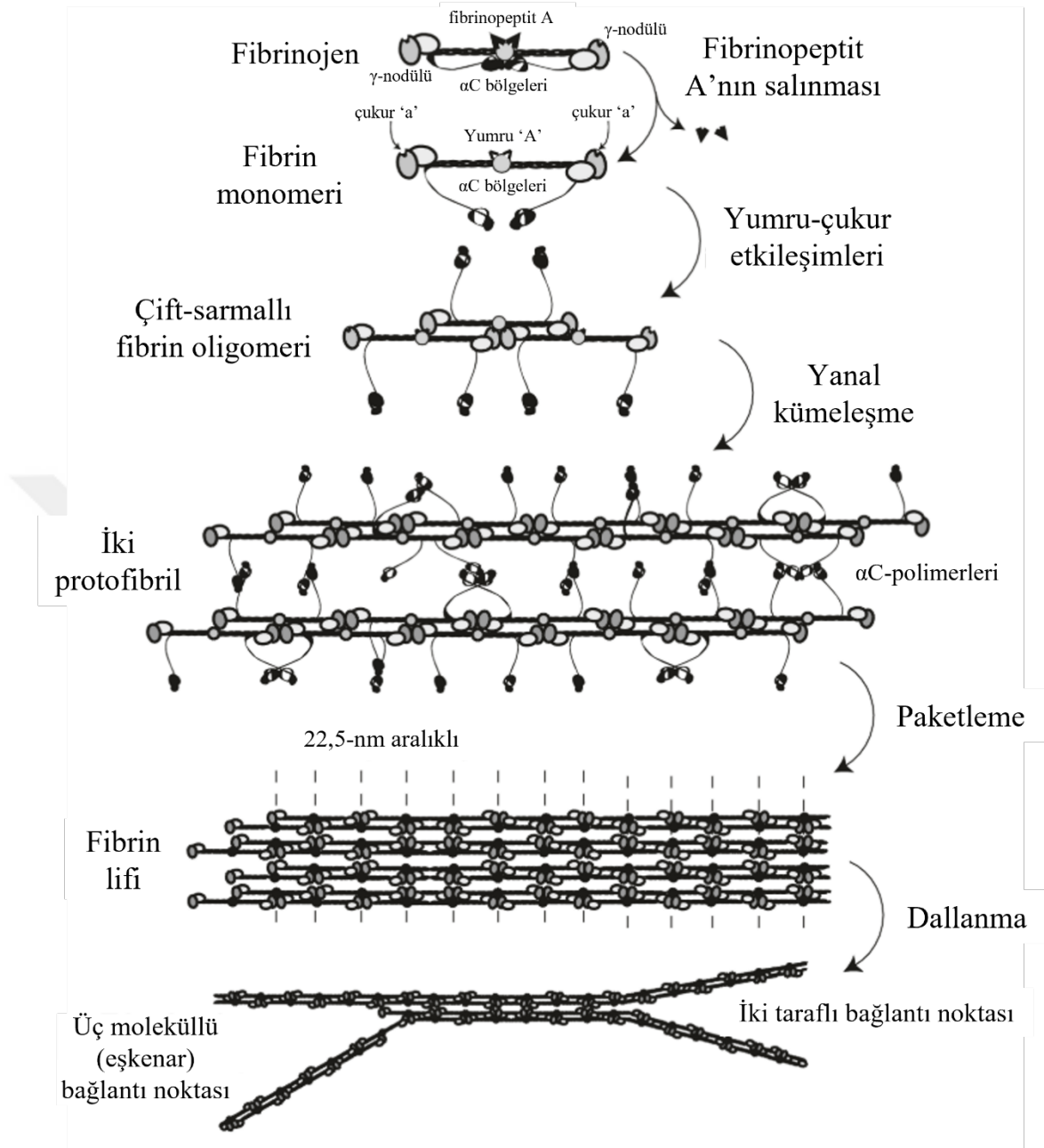


Şekil 2.2. İnsan fibrinojeninin üç boyutlu yapısı: (a) Fibrinojen molekülünün, X-ışını kristalografisi ile belirlenen atomik çözünürlük yapısı (PDB Girişi: 3GHG), (b) Fibrinojenin polipeptit zincirlerinin şematik diyagramı. Kaynak: [12] (Yayıncının izniyle kullanılmıştır)

Fibrinojen, karaciğer hepatosit hücresinde üretilir. İnsan kan plazmasında yaklaşık 1,5-4 g/L derişimde bulunur ve hemostaz, yara iyileşmesi, yangı ve damarlanma (anjyogenez) gibi bazı biyolojik fonksiyonlarda önemli bir yere sahiptir [12].

Fibrinojen normal durumlarda kan dolaşımında inaktif yani çözünebilir halde bulunur ancak yaralanma gibi fizyolojik durumlarda trombin devreye girer. Trombin, fibrinojenin $A\alpha$ ve $B\beta$ zincirlerinin N-terminal kısımlarından tercihen sırayla

fibrinopeptit A ve fibrinopeptit B'yi ayırırken γ zincirden peptit bölemez [12]. Fibrinopeptitlerin ayrılmasıyla oluşan fibrin monomerlerinin N-terminal sekansları değişip bu bölgede yumrular (knob A ve knob B) meydana gelir. Bu yumrular, bir başka fibrin monomerinin γ -nodülünde ve β -nodülünde bulunan çukurlar (hole a ve hole b) ile anahtar-kilit uyumu gibi birbirini tamamlar. Bu kuvvetli bağlara “A-a yumru-çukur” ve “B-b yumru-çukur” etkileşimi adı verilir. Bu etkileşimlerin daha fazla sayıda fibrin monomeri arasında cereyan etmesi sonucunda fibrin polimerleri oluşturmaktadır [12, 16]. Faktör XIIIa, en son oluşan fibrin polimerleri arasında çapraz bağlar oluşturarak çözünmez sağlam pıhtıyı meydana getirmektedir. Oluşan pıhtı yara iyileşmesine katkıda bulunur. Yara iyileşmesi tamamlandıktan sonra fibrin pıhtıları fibrinolitik sistem tarafından parçalara ayrılır [11, 12].



Şekil 2.3. Fibrin polimerizasyonunun şematik diyagramı. Kaynak: [12] (Yayıncının izniyle kullanılmıştır)

2.3 Yılan Zehirleri ve İçerikleri

Dünyada 3.921 adet yılan türü bulunmaktadır [17]. Yılanların yaklaşık 600 türünün zehirli olduğu düşünülmektedir [6, 18]. Zehirli yılanlar Elapidae (Mercan yılanları ve kobralar), Viperidae (Engerekler ve çingiraklı yılanlar), Colubridae (Kırbaç yılanları), Hydrophiidae (Deniz yılanları) ve Lamprophiidae olmak üzere beş ailede incelenir [6,

18]. Hydrophiidae genellikle Elapidae ailesi içerisinde tutulmaktadır. Elapidae ve Viperidae ailesine mensup olan yılanların zehirleri tıbbi açıdan önemlidir [18].

Yılan zehirleri, proteinler, peptitler, amino asitler, lipitler, karbonhidratlar, metal iyonları ve diğer bileşenlerinden oluşan heterojen bir karışımdır [18]. Zehir bileşimi farklı türler arasında [19], aynı tür içindeki bireyler arasında [18, 20], hatta aynı yılan için bile yaşa bağlı olarak [18] veya yılın farklı zamanlarında çeşitlilik göstermektedir [18, 21]. Ayrıca beslenme (diyet) [22, 23], coğrafya [24] ve cinsiyet [20, 25] gibi faktörler de zehir bileşimi üzerinde etkilidir.

Yılanlar kendilerini savunmak, avı hareketsiz kılmak veya öldürmek ve ön sindirim yapmak amacıyla zehir zerk etmektedirler [18, 26].

2.3.1 Viperidae (Engerekler ve çingiraklı yılanlar) zehirleri

Viperidae ailesine mensup 200'ün üzerinde yılan türü bulunmaktadır. Hepsisi zehirli olup büyük ön dişlere sahiptir. Bu dişler menteşelidir ve damağa doğru geri katlanmaktadır [18]. Afrika, Avrupa ve Asya'da yaşarlar [27].

Viperidae zehirleri hemotoksik ve miyotoksik etkilere sahiptir. Engerek zehirlerinde enzimatik aktivite gösteren protein aileleri fosfolipaz A₂ (PLA₂), yılan zehri metalloproteinazı (SVMP), yılan zehri serin proteinazı (SVSP), hyaluronidaz ve L-amino asit oksidazlardır (LAO). Enzimatik aktivite göstermeyen protein ailelerinde ise Kunitz-tipi proteinaz inhibitörleri, C-tipi lektin proteinleri (CLP), 5'-nükleotidaz, disintegrinler, miyotoksinler, vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF), sinir büyüme faktörleri (NGF), bradikinin-güçlendirici peptitler (BPP), sisteince-zengin salgı proteini (CRISP) ve natriüretik peptitler bulunur [4, 26, 28, 29].

2.3.2 Fibrinolitik sisteme etki eden zehir proteinleri

Viperidae ve Elapidae ailesine mensup yılanların zehirleri hemostatik sistem ile etkileşim halinde olan fibrinolitik enzimlere sahiptir. Kan pıhtılaşmasını etkileyen

enzimlerin çoğu serin proteinaz ve metalloproteinaz grubu proteolitik enzimlerdir [3, 6, 30, 31].

Yılan zehrindeki toksinlerin avın kan dolaşımında dağılabilmesi için bir tıkanıklık olmaması, yani dolaşımın yeterince açık olması gerekmektedir. Yılan zehri fibrinojenolitik enzimleri, kan plazmasındaki fibrinojen miktarını azaltarak bu durumu kolaylaştırmaktadır. Enzimlerin bu özellikleri bazı bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. İlk olarak 18. yüzyıla yaklaşırken Fontana, yılan zehrinden ölen bir canlının kanının hala akışkan olduğunu gözlemlemiştir [31, 32].

Mitchell ve Reichert 19. yüzyılın sonlarında *Crotalus* türü (çingiraklı yılan) zehri ile deney yapmışlardır. Bazı hayvanların yılan zehrine olan maruziyet sıklığının artması, o hayvanlarda kanamaya yatkınlığı beraberinde getirmiştir. Ayrıca bu durum, hayvanların ölümünü de ötelemiştir [31, 33, 34].

Fibrinojenolitikler aktivasyonları için herhangi bir faktöre gereksinim duymaz, doğrudan fibrinojen üzerinde etki gösterirler [31]. Fibrinojenolitik enzimler, fibrinojendeki farklı amino asit sekanslarını bölmeleri ve çalışma mekanizmalarındaki ayrımlar nedeniyle yılan zehri serin proteinazları ve yılan zehri metalloproteinazları olmak üzere iki protein grubu içerisinde incelenmektedir [31].

2.3.2.1 Yılan zehri serin proteinazları

Viperidae, Elapidae ve Colubridae ailesinden yılanların zehirlerinde rastlanır. Serin proteinazlar PMSF, aprotinin, 4-(2-aminoetil) benzensülfonil florid hidroklorid (AEBSF) ve diizopropil florofosfat (DFP) gibi proteaz inhibitörleri tarafından inhibe edilirler [30, 35].

Yılan zehri serin proteinazlarına dâhil olup fibrinojenolitik aktivitesini trombine benzer şekilde gösteren enzime yılan zehri trombin-benzeri enzim (SVTLE) denir [36]. SVTLE'ler, trombin gibi fibrinojeni fibrine dönüştürmektedir ancak bunu yaparken genelde fibrinojenden fibrinopeptit A veya fibrinopeptit B'yi tek başına ayırmaktadır. Nadiren her iki fibrinopeptiti birlikte ayırdığı görülmektedir. Bu nedenle SVTLE'ler

kendi ayırdıkları fibrinopeptitlere göre isim alırlar: venombin A, venombin B ve venombin AB [31, 35, 37]. SVTLE'lerin etkinliği prokoagölan olarak görölmeye rağmen SVTLE'ler *in vivo* ortamda fibrinojeni fibrine dönuştürerek fibrinojen sayısını azaltmaktadırlar. Plazmadaki fibrinojenin sayısı azalınca (defibrinojenasyon) pıhtılaşma süresi uzamaktadır. Ayrıca SVTLE'ler trombin gibi Faktör XIII'i aktiveştirmeyince dolaylı fibrinler arası çapraz bağlar oluşmaz. Böylece sağlam yapılmayan fibrinler, fibrinolitik sistem tarafından kan dolaşımından kolayca atılırlar. SVTLE'lerin bu antikoagölan özelliğinden dolaylı pıhtılaşmaya meyilli kişilerde yılan zehri proteinlerinden türevlenen bazı kan sulandırıcı ilaçların kullanımını yönünde çalışmalar yapılmaktadır [30].

Yılan zehri trombin-benzeri enzimlerinin büyük kısmı, trombinin inhibe eden heparin, antitrombin-III ve hirudinden genellikle etkilenmezler. Antitrombin-III'ün *Calloselasma rhodostoma* türü engerekten elde edilen ancrod'u inhibe ettiği istisna olarak kaydedilmiştir [4, 35, 38]. Bu özellikleri sebebiyle tedavide kullanım potansiyelleri arttığı gibi heparin gibi antikoagölan maddeler kullanan kişilerde kanama zamanıyla ilgili ölçümlerin yapılmasına olanak sağlamakta ve tanı alanında da önemli hale gelmektedir [30, 39].

2.3.2.2 Yılan zehri metalloproteinazları

Viperidae (Engerekler ve çingiraklı yılanlar) ailesine mensup yılan zehirlerinde bolca rastlanan, hemostazda etkili proteinlerdir. Viperidae zehrindeki proteinlerin %11-65'ini metalloproteinazlar oluşturmaktadır. Elapidae ailesi yılanları da metalloproteinazlar içermekle birlikte miktarları Viperidae ailesine kıyasla fazla değildir. Yılan zehri metalloproteinazının (SVMP) aktif bölgesinde çinko-bağımlı HEXXHXXGXXHD konsensüs dizisi bulunmaktadır. SVMP'ler çok fonksiyonlu enzimler olup bazal membranı tahrip edip kan plazmasının dağılmasına neden olan hemorajik aktiviteye veya kan plazmasındaki fibrinojeni azaltıcı yönde etkili olan fibrinojenolitik aktiviteye sahip olabilir; protrombin aktivatörleri, faktör X aktivatörleri veya kandaki serin proteinaz inhibitörlerinin (serpinler) inaktivatörleri olarak rol oynayabilirler. SVMP'ler boyutları/moleküler ağırlıkları ve domain yapılarına göre üç farklı sınıfta incelenirler [30, 33].

P-I sınıfı SVMP'ler küçük boyutludur. Moleküler ağırlıkları 20-30 kDa'dur. Bir pro domain ve bir proteinaz domainine sahiptirler. P-II sınıfı SVMP'ler orta boyutludur. Moleküler ağırlıkları 30-60 kDa'dur. Bir pro domain, bir proteinaz domain ve bir disintegrin domainine sahiptirler. P-III sınıfı SVMP'ler geniştirler. Moleküler ağırlıkları 60-100 kDa'dur. Bir pro domain, bir proteinaz domain, bir disintegrin-benzeri domain ve bir sisteince-zengin domainine sahiptirler. P-IV sınıfı, P-III sınıfındakilere ek olarak bir lektin-benzeri domain içerir ancak bu sınıfa ait herhangi bir mRNA transkripti bildirilmediğinden ve P-III yapısının post-translasyonel modifikasyona uğramış hali olabileceği düşünüldüğünden dolayı mevcut sınıflandırmalarda P-III sınıfı içerisinde değerlendirilmektedir [30].

Fibrinolitik aktiviteye sahip SVMP'ler genellikle fibrinojenin A α zincirine (bazen düşük aktivite ile B β zincirine de) etki etmekle birlikte bazılarının önceliği B β zincire karşı olabilmektedir [31]. Metalloproteinazların aktivitesi, EDTA ve 1,10-fenantrolin gibi proteaz inhibitörleri etkisiyle baskılanır [30, 40].

2.4 Türkiye'deki Yılanlar

Türkiye'de en az 13 tür *Vipera* cinsi yılan bulunmaktadır [27, 41]. Bunlar *Vipera ammodytes* (Boynuzlu engerek), *Montivipera xanthina* (Şeritli engerek), *Macrovipera lebetinus* (Koca engerek), *Montivipera raddei* (Radde dağ engereği), *Vipera kaznakovi* (Kafkas engereği), *Montivipera wagneri* (Wagner Engereği), *Vipera berus* (Kutup engereği), *Daboia palaestinae* (Filistin engereği) [42], *Vipera renardi (eriwanensis)* (Küçük engerek), *Vipera sakoi*, *Vipera anatolica* (Anadolu çayır engereği) [43], *Montivipera bulgardaghica* (Bolkar engereği) ve *Vipera darevskii* (Yayla engereği)'dir. [41]. Özellikle Anadolu ve Kafkaslardaki engereklerin sistematikleri ve tür sınırlarının belirlenmesi üzerine çalışmalar devam etmekte olup yeni çalışmalarla mevcut bilgiler güncellenecektir.

2.5 *Montivipera raddei* (Boettger, 1890)

2.5.1 Sistematik

Montivipera raddei (Radde Dağ Engereği) Viperidae ailesine dâhil zehirli bir yılan türüdür. Ülkemiz sınırları içerisinde *M. raddei raddei* nominant alt türü yaşamaktadır [44]. Eskiden *Vipera xanthina* tür kompleksi olarak ele alınan gruptaki diğer türlerden (ve dolayısıyla ülkemizde dağılışı gösteren *Montivipera* türlerinden) gözle supraocular plak arasında pul bulunmasıyla ayrılmış ve “*raddei* tür grubu” şeklinde ayrı bir soy olarak ele alınmıştır.

2.5.2 Coğrafi dağılışı ve ekoloji

Ermenistan, Azerbaycan, İran, Irak ve ülkemizde Ağrı, Iğdır, Kars, Van ve Hakkari’de yayılışı göstermektedir. 1.000-2.000 m yükseltideki çalılık, kayalık alanlar ve ormanlarda yaşamaktadır [44]. Hareketleri yavaş olup gündüzleri taşların altına gizlenmektedir ve geceleri aktiftir [27].

Küçük memeli türleri, kertenkele, kuş ve böcek türleri ile beslenmektedir. Kış uykusundan çıktıktan sonra çekirgeye yöneldikleri görülmektedir [26, 45].

Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında aktiftirler [45]. Ovovivipar bir hayvandır, yani dişi vücudu içerisinde yumurtalar gelişir ve üç ila dokuz yavru doğurur. Zehri insan üzerinde etkilidir [27].

2.5.3 Morfoloji

Vücut uzunlukları 100 cm’ye ulaşabilmektedir [27, 44]. İnce bir boyna sahiptir ve baş kısmı gözle görülür biçimde üçgendir. Başın yanında siyaha çalan renkte temporal bantlar bulunmaktadır. Başın üst kısmı küçük ve karinalı pullar ile örtülüdür. Gözlerinin üzerinde kenarları köşeli olan bombeli plaklar (supraocular) bulunmaktadır. Ayrıca göz ile bu plak arasında bir sıra küçük pul bulunmaktadır.

Sırtın ortasından sarımsı tuğla veya tamamen siyah renkte uzunlamasına zikzak veya dalgalı bir şerit geçmektedir. Gövdenin yanlarında birer sıra siyah leke göze çarpmaktadır. Tabanı sarımsı-beyaz ve küçük siyah noktalı veya lekelidir [27].

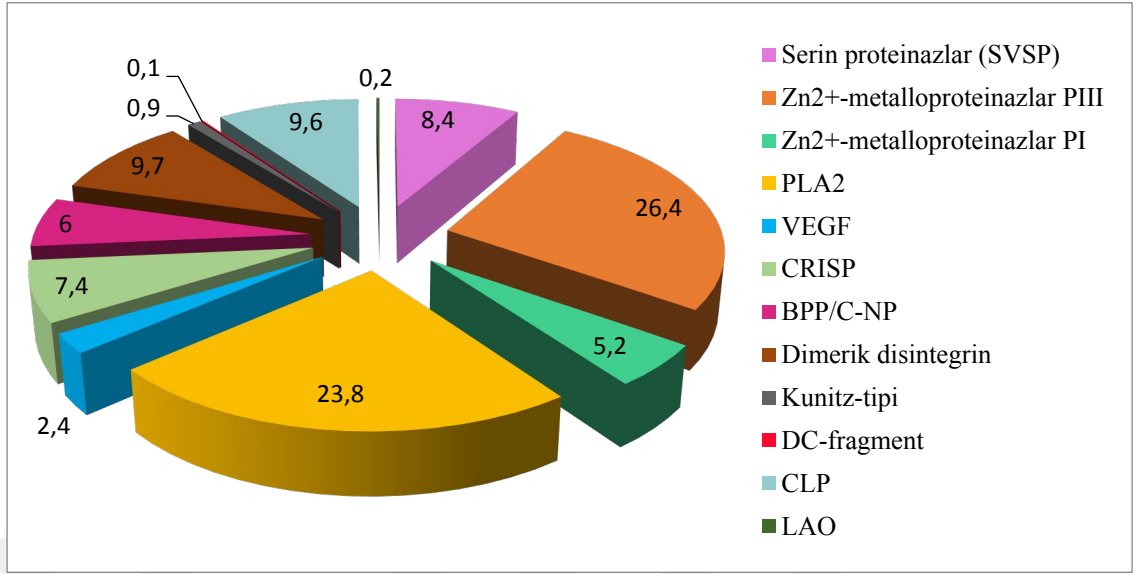


Resim 2.1. *M. raddei* türü ergin dişi birey (Yer: Aydınkavak-Kağızman/Kars, Fotoğraf: Naşit İĞCİ)

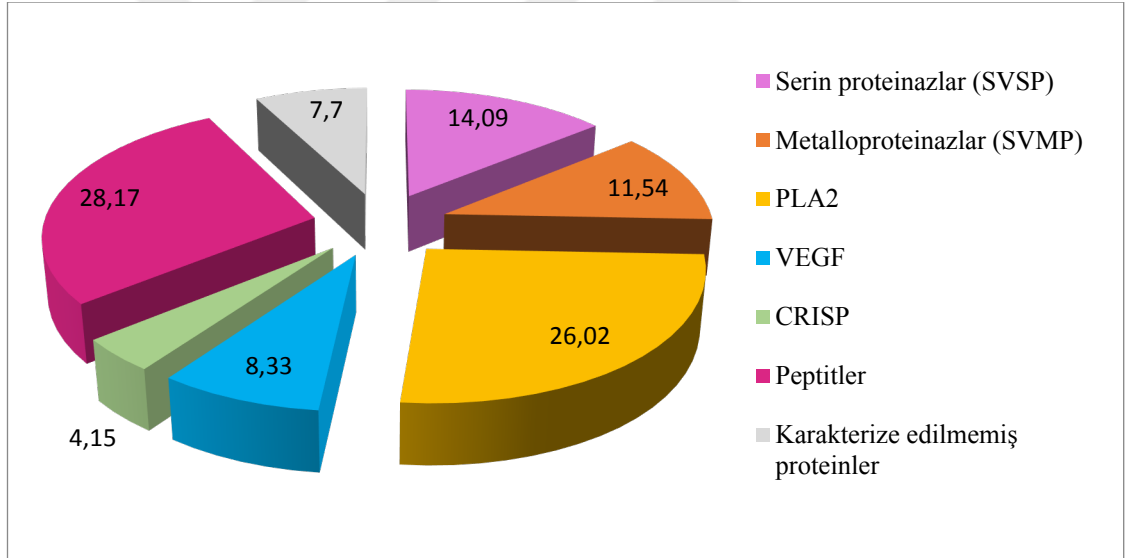
2.6 *Montivipera raddei* Zehri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Montivipera raddei zehri ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Daha önce gerçekleştirilen iki farklı proteomik çalışma ile [26, 28] protein ailesi bazında genel karakterizasyon yapılmıştır. Ayrıca biyolojik aktiviteleri ile ilgili de birkaç yayın yapılmıştır.

Sanz ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre *M. raddei* zehrinde SVSP'ler, Zn^{2+} -bağımlı SVMP'ler, PLA₂, LAO, CLP, Kunitz-tipi serin proteinaz inhibitörleri, VEGF, dimerik disintegrin, CRISP, BPP/C-NP ve DC-fragmentleri bulunmaktadır. (Şekil 2.2.) [26]. Metalloproteinazların toplam proteine oranı %31,60'tır.



Şekil 2.4. *M. raddei* zehir proteinleri ve peptitlerinin grafiği (%). Kaynak: [26]



Şekil 2.5. *M. raddei* zehir proteinleri ve peptitlerinin grafiği (%). Kaynak: [28]

Nalbantsoy ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmada, RP-HPLC ayırma, SDS-PAGE, triptik sindirim ve LC-MS/MS (*de novo* dizileme) yöntemleri kullanılarak kısmen *M. raddei* zehrinin içeriği ve proteomik karakterizasyonu ortaya çıkarılmıştır. Buna göre elde edilen verilere bakıldığında *M. raddei* zehrinde hemostazda etkili olabilecek enzimler tespit edilmiş olmasına rağmen etkileriyle ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmaya göre metalloproteinazların toplam proteine oranı %11,54'tür. Veriler

incelendiğinde *M. raddei* zehir içeriğinde metalloproteinazların önemli bir yeri vardır (Şekil 2.3.) [28].

Bu iki çalışmada, *M. raddei* zehrinde fibrinojenolitik enzimlerin bulunabileceği ortaya koyulmuştur ancak fonksiyonel aktivite çalışmaları ile bu etki kanıtlanmamış ve fibrinojenin hangi alt birimleri üzerinden etki ettiği gösterilmemiştir [26, 28].

Vipera ammodytes zehrine spesifik antiserumun *M. raddei* zehri üzerindeki paraspesifikliği araştırılmıştır. Antiserum, zehrin ölümcül toksisitesini ve hemorajisini nötralize etmede etkili iken metalloproteinazları inhibe etmede düşük kapasite göstermiştir [46].

M. raddei zehri hemotoksik özelliktedir ve yapılan bir deneyde tavşanlardaki organlarda histopatolojik etkilere neden olduğu saptamıştır [47].

Siyatik siniri kesilen sıçanlarda *M. raddei* zehrinin nörodejenerasyona karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Sıçanların yaralı bölgelerindeki bazı sinirlerinin dört hafta boyunca her gün düşük doz zehirle (0,08 mg/kg) uyarılması, sağlam bölgelerindeki internöron ve motor nöron yanıtlarının restorasyonunu sağlamıştır. Böylece *M. raddei* zehrinin, hasarlı bazı sinirlerin yenilenmesinde rol alabileceği ortaya çıkarılmıştır [48].

M. raddei zehrinin, sıçanlardaki farklı dokuların (beyin, karaciğer ve kas) doğal lipitlerinden elde edilen membranlarının plastik özellikleri (geçirgenlik, mikroviskozite, kalınlık) üzerine etkisini anlamak amacıyla hem *in vivo* hem *in vitro* ortamda deney yapılmıştır [49].

M. raddei zehri disintegrin-benzeri bileşenlerinin antitümör aktivitesi ilk kez Amiryanyan'ın çalışması ile ortaya çıkarılmıştır. Bu bileşenler, MDA-MB-435 (insan meme kanseri) hücre hatları üzerindeki integrinleri bloke edip meme kanseri hücrelerinin hücre dışı matrise yapışmasını engellemiştir. Ayrıca disintegrin-benzeri bileşenlerin kanser invazyonunu sağlayan hücre hareketliliği inhibe edilmiştir. Bu şekilde kanser hücrelerinin metastaz kapasitesi ciddi oranda azaltılmaktadır [50].

2.7 Yılan Zehirlenmeleri

Her yıl ortalama 5,4 milyon yılan ısırığı vakasından 2,7 milyonu zehirlenme ile sonuçlanmaktadır. Zehirlenen insanların yaklaşık 81.000 ila 138.000'i hayatını kaybetmektedir. Hayatta kalan 400.000 kişide kanama bozuklukları, böbrek yetmezliği, uzuv amputasyonu gibi kalıcı hasarlar meydana gelmektedir. En çok vaka Afrika, Asya ve Latin Amerika'da ve tropikal ve subtropikal bölgelerde gerçekleşmektedir. Özellikle kırsal kesimlerde yaşayan tarım işçileri ve çocuklar zehirlenmeden daha kolay etkilenmektedir [51]. Her zehirli yılanın ısırığı, zehirlenmeye sebep olmamaktadır. Isırık vakalarının %25'inden fazlasının 'kuru' ısırık olduğu düşünülmektedir [18].

2.8 Tanı ve Tedavi Alanında Yılan Zehri Fibrinojenolitik Enzimleri

Yılan zehri peptit ve proteinleri model alınarak geliştirilmiş ve günümüzde de kullanılan çeşitli ilaçlar ve tanı kitleri bulunmaktadır. Bunlar özellikle engerek zehirlerinden keşfedilerek ilaç (ör: eptifibatide, tirofiban) veya tanı ürünü haline gelmiş ve kan pıhtılaşması üzerinde etkili moleküllerdir [52, 53]. Bu konuda çalışmalar devam etmektedir ve yılan zehri fibrinojenolitik enzimleri de odak noktalarından biridir. Kan pıhtılaşması sonucu meydana gelen felç, derin ven trombozu, serebral ve miyokard infarktüsü hastalıklarını tedavi etme amacıyla yılan zehirlerinde bulunan fibrinojenolitik enzimlerden faydalanılmaktadır. Bu alandaki önemli örneklerden biri *Bothrops atrox* zehrindeki trombin-benzeri serin proteinazlarının saflaştırılmasıyla elde edilen ve piyasada Reptilase® ismiyle satışa sunulmakta olan hemokoagülaz enzimidir [2-4]. Yine *Bothrops* cinsi yılanlardan elde edilmiş benzer özellikte bir serin proteinaz olan Batroxobin ise Defibrase® adıyla satılmaktadır [52]. Özellikle tanı laboratuvarlarında heparin içeren kan örneklerindeki fibrinojen seviyesini ölçmek amacıyla da kullanılmaktadır [30].

3. BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Proteomiks ve Hayvan Zehirleri Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyde kullanılan kimyasal maddelerin listesi EK-1'de yer almaktadır. Tüm materyaller moleküler biyoloji çalışmalarında kullanıma uygundur.

3.2 Kullanılan Alet ve Gereçler

Deneyde kullanılan alet ve gereçlerin listesi EK-2'de yer almaktadır. Tüm alet ve gereçler kullanım kılavuzu takip edilerek titizlikle kullanılmıştır.

3.3 Zehir Sağımı ve Saklanması

Tez çalışmasında, tez danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ tarafından daha önceki çalışmaları kapsamında Aydıncavak-Kağızman/Kars coğrafik konumundan toplanmış dört ergin dişi *Montivipera raddei* bireyinden elde edilen liyofilize zehir örnekleri kullanılmıştır. Bazı deneylerde karşılaştırma materyali olarak kullanılan *Macrovipera lebetina* zehir örneği ise Şanlıurfa'dan toplanan beş bireyin zehri havuzlanarak elde edilmiştir. Daha önce gerçekleştirilmiş olan yılanlardan zehir elde etme ve saklama aşamaları burada belirtilmiştir.

Yılanların, üzeri parafinle örtülü steril beherleri ısırmasıyla zehirleri toplanmış ve buz içine koyulmuştur. Örneklerin içindeki kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla 2000 x g ve 4 °C'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazları alınarak liyofilizasyon (dondurarak kurutma yöntemi) yoluyla zehirler kuru toz haline getirilmiş ve muhafazası -20 °C'deki dondurucuda devam etmiştir. Zehir bileşiminin tür içi bireysel farklılıklarının azaltılması amacıyla kuru zehir örnekleri ile 5 mg'lık bir havuz

oluşturulmuştur [54]. Ardından 100 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl pH 7,8, tamponu ile çözdürülüp 5 mg/ml derişimde stok zehir çözeltisi hazırlanmıştır.

3.4 Protein Miktar Tayini

Zehirdeki proteinlerin miktarının belirlenmesi için Bradford yöntemi tercih edilmiştir [55]. Bu yöntemde kullanılmak üzere *M. raddei* zehri stok çözeltisinden seyreltilerek 1 mg/ml çözelti hazırlanmıştır. Standart olarak 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml derişimlerdeki sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır. Boya/örnek oranı 49:1 (v/v) olarak belirlenmiştir. Spektrofotometre küvetlerine 20 µl örnek ve 980 µl ticari olarak satın alınan Bradford reaktifi eklenmiştir. Örneklerin boya ile bağlanması için 15 dk. inkübasyona bırakılmış ve UV/VIS spektrofotometre cihazında (PerkinElmer, Lambda 25) 595 nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır. Örnekler üç tekrarlı olarak ölçülüp OD değerlerinin ortalamaları baz alınarak standart eğri grafiği oluşturulmuştur.

3.5 Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Çalışmada zehir proteinlerinin fibrinojenolitik aktivitesinin belirlenmesinde kullanılacak olan SDS-PAGE yöntemleri için Bio-Rad marka Mini-Protean Tetra Cell dikey elektroferez cihazı kullanılmıştır. Deneylede kullanılmak üzere 5 mg/ml insan plazma fibrinojeni stok çözeltisi, 100 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl pH 7,8, tamponu ile çözdürülüp hazırlanmıştır. *M. raddei* üzerindeki fibrinojen sindirim kinetiği, Edgar ve Prentice tarafından tarif edilen yöntemle değerlendirilmiştir [56].

3.5.1 Standart SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi

SDS-PAGE jeli için %4'lük toplama jeli (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, akrilamid-bisakrilamid %40, %10 SDS, ultra saf su, %10 APS, TEMED) ve %12'lik ayırma jeli (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, akrilamid-bisakrilamid %40, %10 SDS, ultra saf su, %10 APS, TEMED) kullanılmıştır [57].

Fibrinojen/zehir oranı 20:1 (w/w) olacak şekilde ayarlanmıştır. Eşit hacimde alınan 125 µg/ml *M. raddei* zehri ile 2,5 mg/ml insan plazma fibrinojeni, 37 °C'de farklı zaman aralıklarında (10, 30, 60 ve 120 dk.) inkübe edilmiştir.

Reaksiyonlar, her ikisi de 1X'e seyreltilerek kullanılan 0,313 M Tris-HCl pH 6,8, %10 SDS (w/v), %0,05 bromofenol mavisi (w/v) ve %50 gliserol (v/v) içeren 5X yükleme tamponu ve 2 M DTT içeren 20X indirgeyici ajan ile durdurulmuştur. Ardından örnekler 95 °C'de 5 dk. sıcak su banyosu yaptırılmış ve örnekler 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenmiştir. İndirgeme ve denatürasyondan sonra numuneler, jele yüklenmiştir. Moleküler belirteç olarak Precision Plus Unstained Protein Standards (Bio-Rad) kullanılmıştır. Elektroforez tankı içerisine 10X Tris-Glisin SDS koşturma tamponu [0,25 M Trizma base, 1,92 M Glisin ve %1 SDS (w/v)] [57], 1X'e seyreltilip eklenmiş ve güç kaynağı ilk 15 dk. 80 V'de, daha sonra 120 V'de çalıştırılmıştır. İzleme boyasının jelin altına ulaşmasıyla proteinlerin koşturulması sona ermiştir.

Elektroforez işleminden sonra bir kaba alınan jel, 80 rpm hızındaki çalkayıcı üzerinde distile su ile 3 x 10 dk. yıkanmıştır. Bu işlemden sonra jel, fiksatif çözeltisi [%30 metanol (v/v), %2 orto-fosforik asit (v/v)] [58] ile 30 dk. muamele edilmiş ve ardından %0,12'lik Coomassie Parlak Mavisi G-250 (w/v) [%10 amonyum sülfat (w/v), %10 orto-fosforik asit (v/v), %20 metanol (v/v)] ile 14 sa. boyanmıştır. Jel, görüntüsü istenilen berraklığa ulaşıncaya değin distile su ile temizlenmiş ve akabinde görüntü elde edilmiştir.

Tablo 3.1. Standart SDS-PAGE yönteminde kullanılan deney grupları ve yapılan işlemler

Kısaltmalar	Açılımı	Yapılan işlemler
F-10	Fibrinojen-10	Fibrinojenin 10 dk. inkübasyonu
FV-10	Fibrinojen ile zehir-10	Fibrinojen ile zehrin 10 dk. inkübasyonu
F-30	Fibrinojen-30	Fibrinojenin 30 dk. inkübasyonu
FV-30	Fibrinojen ile zehir-30	Fibrinojen ile zehrin 30 dk. inkübasyonu
F-60	Fibrinojen-60	Fibrinojenin 60 dk. inkübasyonu
FV-60	Fibrinojen ile zehir-60	Fibrinojen ile zehrin 60 dk. inkübasyonu
F-120	Fibrinojen-120	Fibrinojenin 120 dk. inkübasyonu
FV-120	Fibrinojen ile zehir-120	Fibrinojen ile zehrin 120 dk. inkübasyonu

3.5.2 Fibrinojen zimogram SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi

SDS-PAGE jeli için %4'lük toplama jeli (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, akrilamid-bisakrilamid %40, %10 SDS, ultra saf su, %10 APS, TEMED) ve %12'lik ayırma jeli (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, akrilamid-bisakrilamid %40, %10 SDS, ultra saf su, %10 APS, TEMED) kullanılmıştır [57]. Zimogram jel için ilk olarak falkon tüp içerisinde toz fibrinojen tartılmıştır. Üzerine %12'lik ayırma jeli çözeltisi eklenip çözdürülmüştür. Çözelti içindeki fibrinojenin son derişimi 1 mg/ml'dir.

Bu deneyde *M. raddei* zehrindeki fibrinojenolitik enzimlerin aktivitesini kıyaslayabilmek amacıyla fibrinojenolitik enzim aktivitesi yüksek olduğu bilinen ve fibrinojenin A α ve B β zincirlerini hidrolize eden metalloproteinazlara sahip *M. lebetina* zehri tercih edilmiştir [59, 60]. Bir jel üzerinde üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

M. raddei ve *M. lebetina* yükleme örnekleri, indirgeyici ajan içermeyen 5X yükleme tamponu [0,313 M Tris-HCl pH 6,8, %10 SDS (w/v), %0,05 bromofenol mavisi (w/v) ve %50 gliserol (v/v)] ile karıştırılmıştır. Yükleme örneklerine 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıldıktan sonra örnekler jele yüklenmiştir. İlk kuyucuğa Precision Plus Unstained Protein Standards (Bio-Rad) moleküler belirteci yüklenmiştir. İlk üç tekrarlı örnek *M. raddei*'ye sonraki üç tekrarlı örnek ise *M. lebetina*'ya aittir. Jel kuyucuklarına yüklenen örneklerin protein miktarı *M. raddei* için 13,51 μ g, *M. lebetina* için 12,29 μ g'dır.

10X Tris-Glisin SDS koşturma tamponu [0,25 M Trizma base, 1,92 M Glisin ve %1 SDS (w/v)] [57], 1X'e seyreltilip elektroforez tankına ilave edilmiştir. Tankın etrafı buz aküleriyle çevrelenmiş ve ilk 15 dk. 80 V'de, daha sonra 1 sa. 120 V'de proteinler koşturulmuştur.

Proteinler koşturulduktan sonra jel, bir kabın içine alınıp yıkama tamponu (%2,5 Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 1 μ M ZnCl₂) ilavesiyle 80 rpm hızdaki çalkayıcıda 2 x 30 dk. yıkanmıştır [61]. 37 °C'lik etüv içindeki jel, çalkalayıcıda ilk 10 dk. inkübasyon tamponu (%1 Triton X-100, 50 mM Tris HCl pH

7,5, 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 1 µM ZnCl₂) ile karıştırıldıktan sonra inkübasyon tamponu değiştirilerek taze eklenmiş ve 20 sa. inkübasyon yapılmıştır [61]. Boyama tamponu [%40 metanol, %10 asetik asit, %0,05 Coomassie Parlak Mavisi G-250 w/v)] kullanılmadan önce manyetik karıştırıcıda balıkla karıştırılmıştır. Distile su ile 2 x 5 dk. çalkalayıcıda yıkanan jel, boyama tamponu ile çalkalayıcıda 1 sa. boyunca boyanmıştır. Sonra tekrar distile su ile birkaç sefer yıkama yapılmıştır [61]. Jel, üzerindeki fazla boya akana kadar destaining tamponu (%40 metanol, %10 asetik asit) ile inkübe edilmiştir. Yaklaşık 4 sa. sonunda jel görüntülenmiştir [61].

3.5.3 Proteaz inhibitörlerinin zehirdeki fibrinolitik enzimler üzerindeki etkisinin belirlenmesi

SDS-PAGE jeli daha önce tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır. *M. raddei* zehrindeki fibrinolitik enzimlerin hangi protein grubuna ait olduğunu tespit etmek amacıyla proteaz inhibitörlerinden yararlanılmıştır. Metalloproteinaz inhibitörü olarak EDTA ve 1,10-fenantrolin; serin proteinaz inhibitörü olarak aprotinin ve PMSF bileşikleri tercih edilmiştir. Fibrinojen/zehir oranı 20:1 (w/w) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deney iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada 45 µl, 250 µg/ml zehir ile 5 µl hacimdeki inhibitörler oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edilmiştir. Ardından içlerine 45 µl, 5 mg/ml fibrinojen ilavesiyle 37 °C'lik etüvde 60 dk. boyunca inkübasyona devam edilmiştir. Pozitif kontrol olarak inhibitör içermeyen zehir ve fibrinojen örneği kullanılmıştır. İnhibitörlerin final konsantrasyonları 5 mM EDTA, 5 mM 1,10-fenantrolin, 0,5 mM aprotinin ve 5 mM PMSF'dir.

Etüvden çıkarılan örneklere 0,313 M Tris-HCl pH 6,8, %10 SDS (w/v), %0,05 bromofenol mavisini (w/v) ve %50 gliserol (v/v) içeren 5X yükleme tamponu ve 2 M DTT içeren 20X indirgeyici ajanı 1X'e seyreltilip ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Ardından örneklere 95 °C'de 5 dk. sıcak su banyosu yaptırılmış ve örnekler 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenmiştir. 10X Tris-Glisin SDS koşuturma tamponu [0,25 M Trizma base, 1,92 M Glisin ve %1 SDS (w/v)] [57], 1X'e seyreltilip elektroforez tankına ilave edilmiştir. Proteinler ilk 15 dk. 80 V, sonra 55 dk. 120 V'de

koşturulmuştur. Ardından daha önce tarif edildiği şekilde jel boyaması gerçekleştirilmiş ve görüntü alınmıştır.

Tablo 3.2. Proteaz inhibitörleri içeren SDS-PAGE yönteminde kullanılan deney grupları ve yapılan işlemler

Kısaltmalar	Açılımı	Yapılan işlemler
VF	Zehir ile fibrinojen	Zehir ile fibrinojenin inkübasyonu
VEF	Zehir, EDTA ile fibrinojen	Zehir ile EDTA ardından fibrinojenin inkübasyonu
VAF	Zehir, aprotinin ile fibrinojen	Zehir ile aprotinin ardından fibrinojenin inkübasyonu
V1F	Zehir, 1,10-fenantrolin ile fibrinojen	Zehir ile 1,10-fenantrolin ardından fibrinojenin inkübasyonu
VPF	Zehir, PMSF ile fibrinojen	Zehir ile PMSF ardından fibrinojenin inkübasyonu

3.6 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC genel olarak belli bir basınç altında bir örneğin bileşenlerinin, kolondaki sabit faz maddesiyle farklı kuvvette fizikokimyasal etkileşimler sonucu değişkenlik gösteren alıkonma zamanlarına göre ayrılması ve dedektörlerce algılanması sonucu grafiklerde pik şeklinde veri olarak elde edilmesi yöntemidir [62].

Fibrinojenin parçalanma ürünlerinin takibi kalitatif olarak ters faz HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Deneyde Agilent 1220 marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Kolon olarak Poroshell 120 EC-C18 [3,0 mm ID (inner diameter= iç çap) x 50 mm L (length= uzunluk), 2,7-mikron parçacık boyutu (particle size)] tercih edilmiştir.

Fibrinojen içeren örnekler yine DTT ile indirgenmiş ancak kolonda yeniden disülfid bağları kurabileceği tahmin edildiği için yapılan optimizasyon çalışmalarında DTT içeren örneklerle iyodoasetamid eklenmesinin sonuçları iyileştirdiği görülmüştür. İyodoasetamid bir alkilleyici ajan olup, disülfid bağlarına alkil grubu ekleyerek sistein amino asitlerinin yeniden bağ kurmasını engeller. Bu nedenle çalışmada iyodoasetamid final konsantrasyonu 30 mM olarak kullanılmıştır. Burada optimizasyon çalışmaları sonrası oluşturulan HPLC deneyinin metodu verilmiştir. Farklı deney tüpleri için kullanılan malzemeler ve son derişimleri Tablo 3.3.de görülmektedir.

Deneye başlamadan önce etüvler 37 °C ve 55 °C'ye ayarlanıp ısıtılmıştır. 2,5 mg/ml fibrinojen stok çözeltisi PBS tamponu pH 8,0 ile çözündürülüp hazırlanmıştır. 1,5 M taze iyodoasetamid (IAA) çözeltisi ve 8 M üre çözeltisi hazırlanmıştır.

Fibrinojen/zehir oranı 20:1 (w/w) olarak belirlenmiştir. İlk olarak içerisinde sadece fibrinojen ile PBS tamponu (toplam 60 µl) ve fibrinojen ile *M. raddei* zehri (toplam 60 µl) bulunduran örnek tüpleri hazırlanmıştır (Sadece intakt FIB60 örneğinin hacmi 70,5 µl'dir). 37 °C'lik etüvde FIB5 ile FV5 örnekleri 5 dk.; intakt FIB60, FIB60 ile FV60 örnekleri 60 dk. boyunca inkübe edilmiştir.

Tablo 3.3. HPLC deneyi için kullanılan kimyasalların miktarları ve son derişimleri

Materyaller	Kullanılan hacim	Son derişim
İntakt FIB60 örneği için: (indirgenmemiş fibrinojen)		
2,5 mg/ml fibrinojen	30 µl	75 µg
PBS tampon pH 8,0	40,5 µl	-
8 M üre	79,5 µl	4,24 M
	150 µl (Toplam hacim)	
FIB5 ve FIB60 örnekleri için: (5 ve 60 dk. inkübasyon ardından indirgenmiş fibrinojen)		
2,5 mg/ml fibrinojen	30 µl	75 µg
PBS tampon pH 8,0	30 µl	-
2 M DTT	7,5 µl	0,1 M
8 M üre	79,5 µl	4,24 M
1,5 M IAA	3 µl	30 mM
	150 µl (Toplam hacim)	
FV5 ve FV60 örnekleri için: (5 ve 60 dk. zehir ile birlikte inkübasyon ardından indirgenmiş fibrinojen)		
2,5 mg/ml fibrinojen	30 µl	75 µg
125 µg/ml <i>M.raddei</i> zehri	30 µl	3,75 µg
2 M DTT	7,5 µl	0,1 M
8 M üre	79,5 µl	4,24 M
1,5 M IAA	3 µl	30 mM
	150 µl (Toplam hacim)	

İntakt FIB60 örneği hariç, etüvden çıkan tüplere hemen 2 M DTT ilave edilmiştir. Ardından tüm örneklere 8 M üre eklenip vorteks yapılmıştır. Sonra tüm örnekler 55 °C'lık başka bir etüvde 2 sa. inkübe edilmişlerdir. Etüvden çıkarılan tüpler yaklaşık 5 dk. kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında intakt FIB60 örneği hariç diğer örneklere IAA eklenip vorteks yapılmış ve tüpün etrafı folyo ile sarılmıştır. Tüm örnekler oda sıcaklığındaki karanlık bir ortamda 30 dk. bekletilmiştir.

Tüm tüpler 12.500 rpm hızında 5 dk. santrifüj edilmiştir. Tüpteki örnekler insert içeren HPLC viyallerine aktarılmıştır. Enjeksiyon hacmi 5 µl olarak belirlenmiştir. Deney boyunca akış hızı 0,500 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Mobil faz olarak %0,1 TFA içeren %100 Asetonitril (B çözücüsü) ve %0,1 TFA içeren ultra saf su (A çözücüsü) kullanılarak gradiyent akış tercih edilmiştir (Tablo 3.2.). Kromatografi işlemi 12 dk. ile sınırlandırılmıştır.

Tablo 3.4. Gradiyent akışı içeren HPLC metodu (A: Ultra saf su, B: Asetonitril)

Zaman (dk)	A (%)	B (%)	Akış (ml/dk)
0,00	95,0	5,0	0,500
1,00	95,0	5,0	0,500
8,00	80,0	20,0	0,500
10,00	20,0	80,0	0,500
12,00	95,0	5,0	0,500

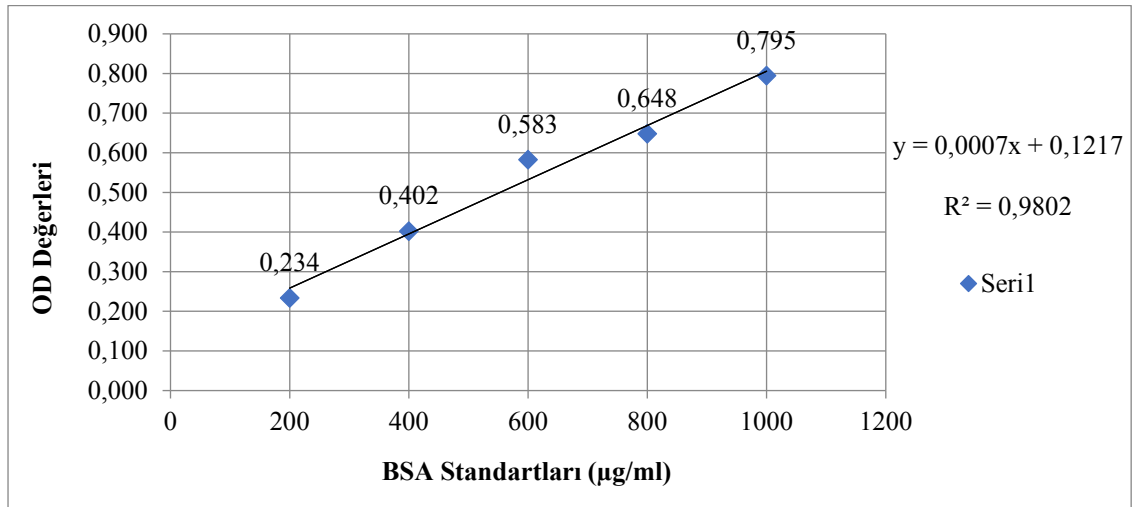
4. BÖLÜM BULGULAR

4.1 Protein Miktar Tayini

Spektrofotometrede BSA standartlarının OD değerleriyle standart eğri grafiği oluşturulmuştur (Tablo 4.1.). R^2 değerinin 1'e yakın olması standartların düzgün çalıştığını göstermektedir. Grafiğe ait $y = 0,0007x + 0,1217$ eğim denkleminde y yerine *M. raddei* zehir örneğinin ortalama OD değerinin yazılmasıyla x değeri yani protein miktarı bulunmuştur (Şekil 4.1.). Buna göre çözdürülerek hazırlanan ve çalışmalarda kullanılan 1 mg/ml *M. raddei* zehir stoğundaki protein miktarı 540,43 µg olarak saptanmıştır. Aynı deney *M. lebetina* zehri için de tekrarlanmıştır. 1 mg/ml *M. lebetina* zehrinde 491,75 µg protein bulunmuştur.

Tablo 4.1. Bradford protein miktar tayini sonucu elde edilen OD değerleri

	BSA standart derişimleri (µg/ml)					<i>M. raddei</i> zehri
	200	400	600	800	1000	derişimi (µg/ml)
1. tekrar	0,227	0,385	0,553	0,697	0,818	0,505
2. tekrar	0,240	0,419	0,612	0,599	0,771	0,494
3. tekrar	0,244	0,432	0,596	0,684	0,806	0,543
Ortalama	0,234	0,402	0,583	0,648	0,795	0,500



Şekil 4.1. Protein miktar tayininde standartlar ve örnekler kullanılarak elde edilen Bradford standart eğri grafiği

4.2 Poliakrilamit Jel Elektroforezi

Tüm SDS-PAGE deneylerinden elde edilen jel görüntüleri, ilgili alt başlıklar içinde değerlendirilmiştir. Jel görüntülerindeki bantların yoğunluk grafikleri Gel Analyzer isimli program aracılığıyla ortaya çıkarılmıştır.

4.2.1 Standart SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi

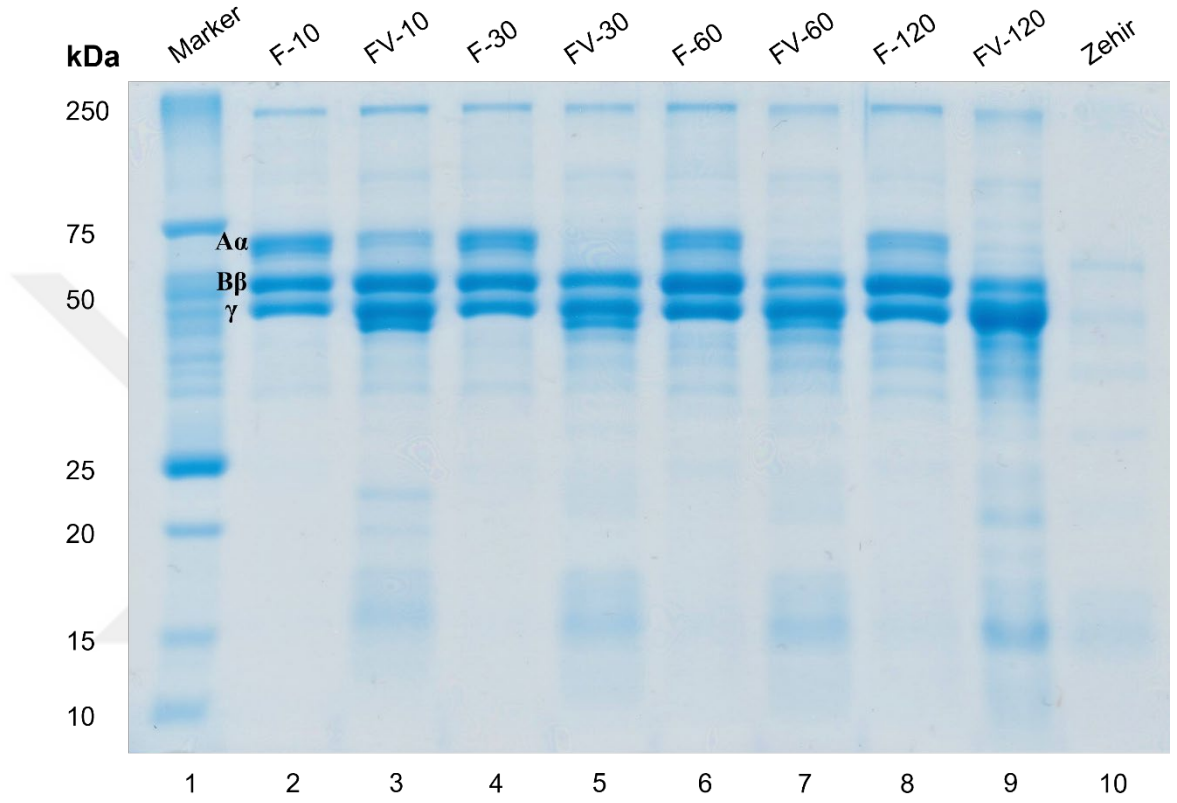
Fibrinojen ve zehir inkübasyonunun karşılaştırılması ve dolayısıyla fibrinojen zincirlerindeki değişiklikleri gözlemlemek için tek başına fibrinojen içeren F-10, F-30, F-60 ve F-120 örnekleri kullanılmıştır. FV-10, FV-30, FV-60 ve FV-120 isimleri fibrinojen ile zehir içeren örnekleri, sayılar ise dakikaları ifade etmektedir (Kısaltmaların açıklamaları için Tablo 3.1.e bakınız).

Şekil 4.2.de verilen SDS-PAGE sonucu incelendiğinde zehrin fibrinojenin A α zinciri üzerindeki etkisi 10. dk.da jeldeki bantta (FV-10) hafif bir bulanıklık olarak görülmektedir. Fibrinojen ile zehir inkübasyonunun 30. dk.sında fibrinojenin A α zincirinin bandının (FV-30) büyük ölçüde ortadan kalktığı fark edilmektedir. 60 ve 120. dk. ise (FV-60 ve FV-120) A α zincirin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Buna göre zehir, fibrinojenin A α zincirini 30. dk.dan itibaren önemli ölçüde ve 60. dk.dan itibaren tamamen parçalamıştır (Şekil 4.2.). Bununla birlikte, fibrinojenin B β zinciri ve γ zinciri üzerinde *M. raddei* zehrinin gözle görülür bir etkisi yoktur. Tüm bu sonuçlar ışığında *M. raddei* zehrinin α -fibrinojenaz enzimleri içerdiği söylenebilir.

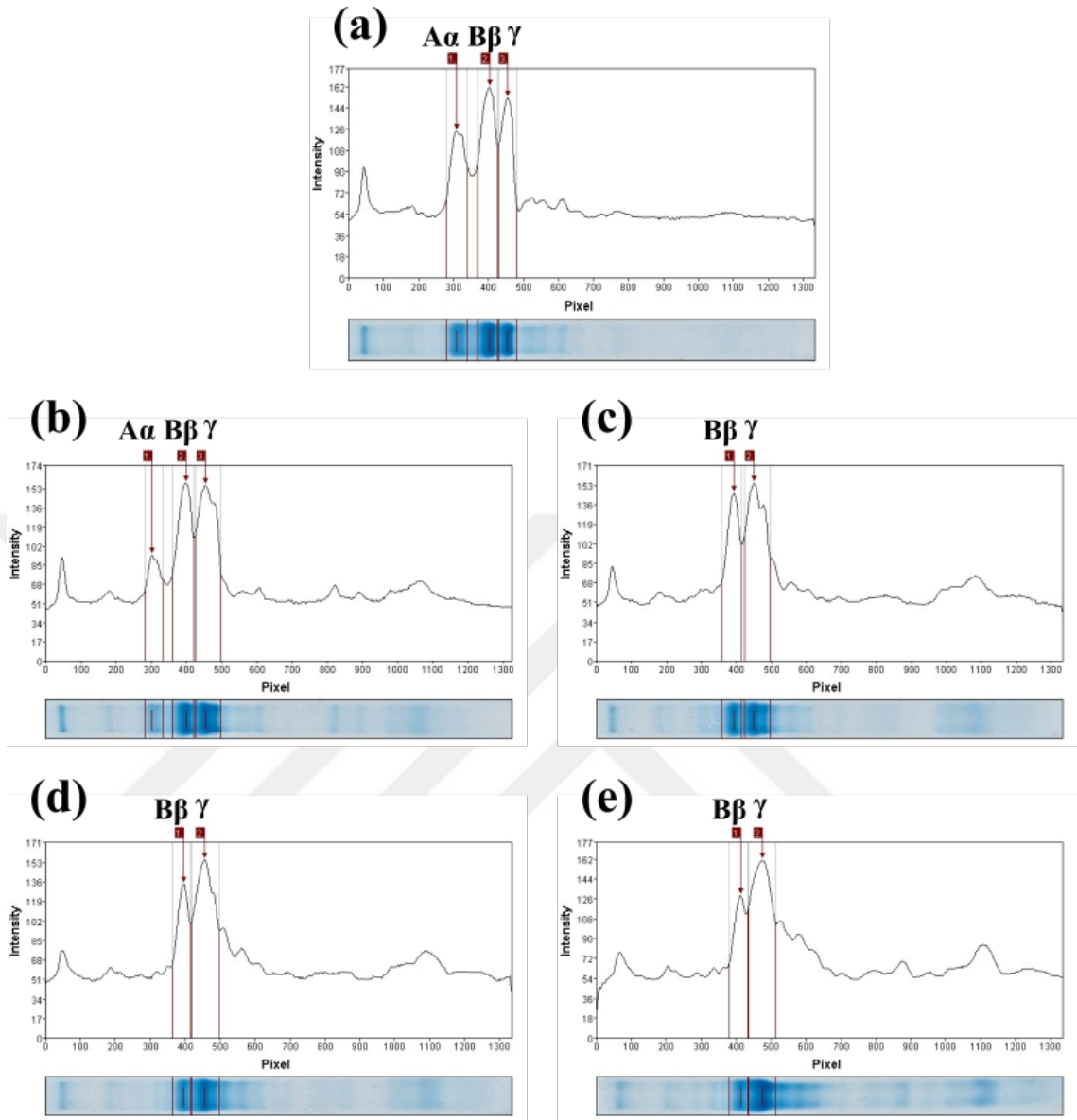
Şekil 4.2.'de en sağdaki kuyucuğa sadece zehir örneği yüklenmiştir. Ancak yüklenen miktar, fibrinojen ve zehir inkübasyonunun yapıldığı diğer tüplerde bulunan zehir protein miktarı ile aynıdır. Buradaki amaç zehrin protein profilini elde etmek değil, örnekler içinde bulunan zehrin, sonuçları etkileyecek derecede bantlar oluşturup oluşturmadığını test etmektir. Elde edilen sonuca göre tüplerdeki zehir örneğinin fibrinojen bantlarının yoğunluğunu etkileyecek bir bant oluşturmadığı görülmüştür.

Şekil 4.3.te, *M. raddei* zehrinin farklı zaman aralıklarındaki fibrinojenolitik aktivitesini gösteren jeldeki (Şekil 4.2.) bazı sütunlara ait yoğunluk grafikleri verilmiştir. Sadece

fibrinojen içeren sütuna ait grafikte (a grafiği) fibrinojenin her üç alt zinciri de yoğun bir şekilde görülmektedir. Zehir ile fibrinojenin inkübasyon süresi b grafiğinden e grafiğine doğru arttığından, fibrinojen A α zincirinin yoğunluğu da giderek azalmaktadır.



Şekil 4.2. *M. raddei* zehrinin farklı zaman aralıklarındaki fibrinojenolitik aktivitesini gösteren jel görüntüsü



Şekil 4.3. *M. raddei* zehrinin farklı zaman aralıklarındaki fibrinojenolitik aktivitesini gösteren jel görüntüsündeki bantların yoğunluk grafikleri, (a): F-60, (b): FV-10, (c): FV-30, (d): FV-60 ve (e): FV-120 sütunlarına aittir.

4.2.2 Fibrinojen zimogram SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi

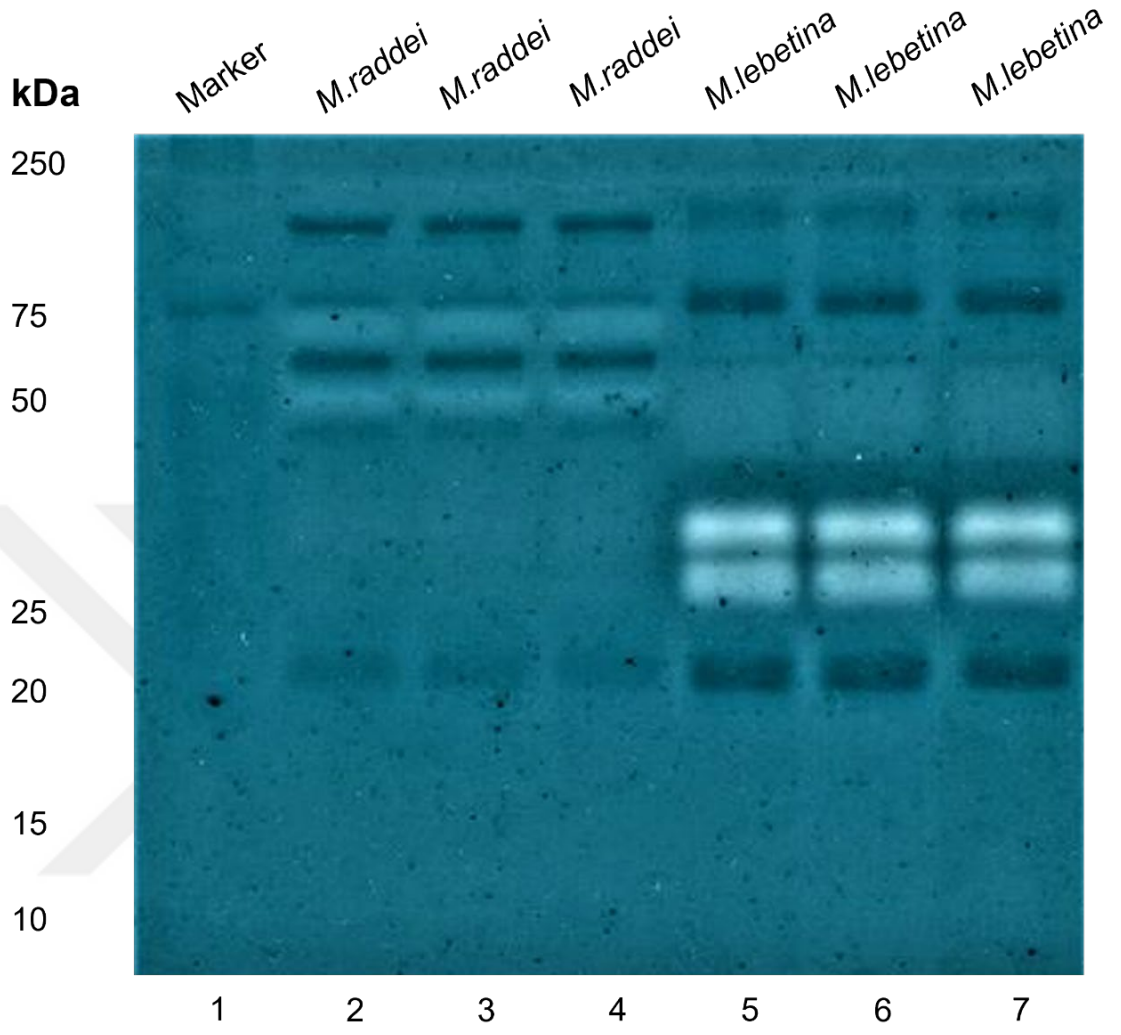
Fibrinojen zimografi, matris metalloproteinazları gibi fibrinojenolitik enzimlerin aktivitesini tespit eden bir metottür. Enzimlerin aktif formunun korunması için deneyde indirgeyici ajan (DTT) kullanılmamıştır. Poliakrilamid jel içine eklenen substratın (fibrinojen), ilgili enzimlerce (fibrinojenazlar) parçalanması esasına dayanmaktadır. Boyamanın ardından jelde parçalanmış substrat bölgeleri açık renkte görünürken, kalan

kısımlar koyu bir arka plan oluşturmaktadır. Bu şekilde, fibrinojen substratına özgü fibrinojenolitik enzimler, ilgili proteinleri tükettiği için jel üzerinde açık renkli bantlar oluşmuştur.

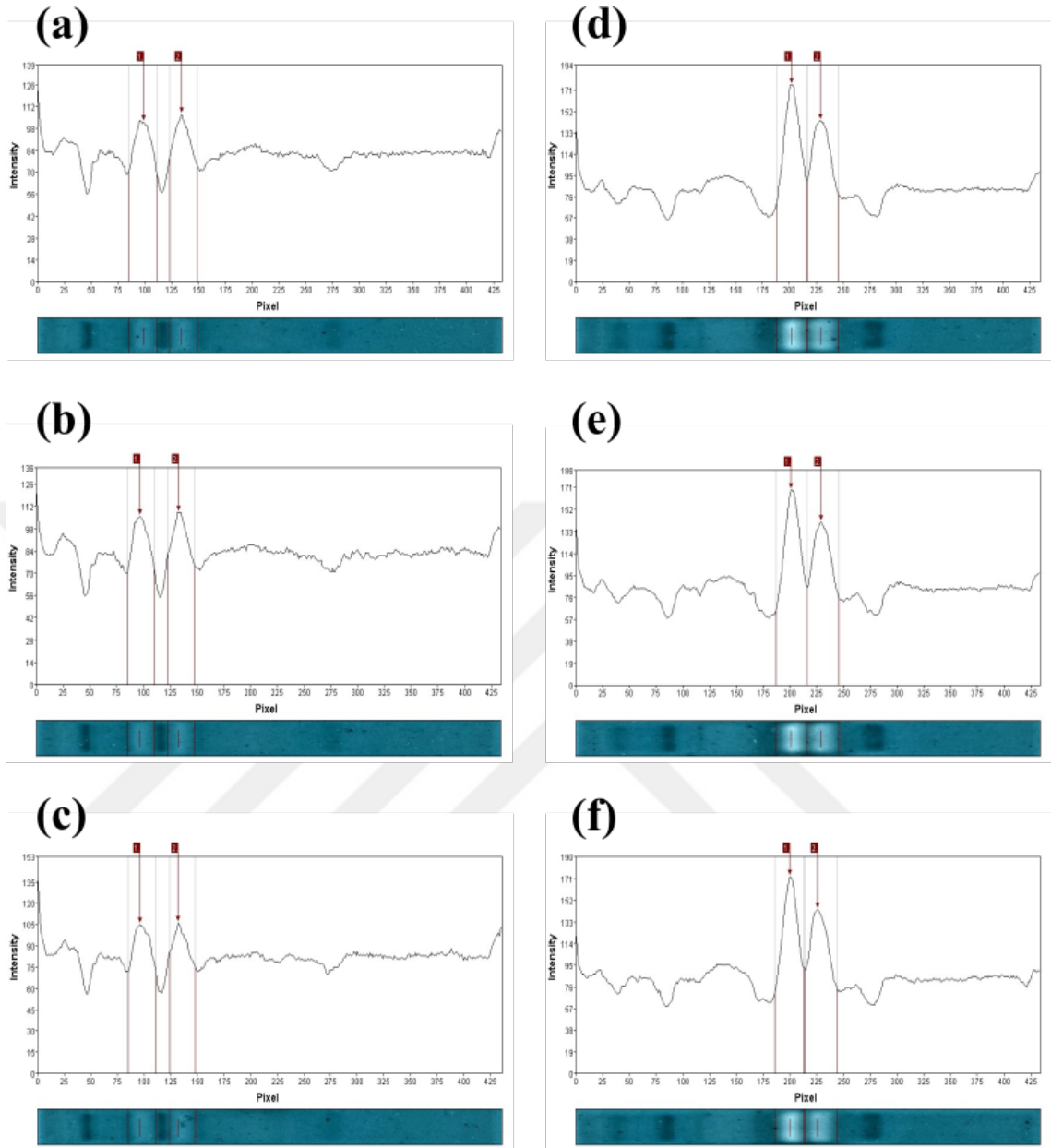
M. raddei ve *M. lebetina* zehir örneklerinin jel üzerindeki bant görüntüleri kıyaslandığında, farklı moleküler ağırlığa sahip fibrinojenolitik enzimlere sahip oldukları görülmektedir (Şekil 4.4.). Bu deneyde fibrinojenolitik özelliği iyi bilinen *M. lebetina* zehri karşılaştırma materyali (pozitif kontrol) olarak kullanılmıştır. En yüksek aktivite gösteren *M. raddei* zehri fibrinojenolitik enzimleri yaklaşık 50 ve 75 kDa, *M. lebetina* fibrinojenolitik enzimleri ise yaklaşık 37 kDa ağırlığındadır. Dolayısıyla her iki türe ait zehirdeki fibrinojenolitik enzimlerin farklı moleküler ağırlıklara sahip olmaları, onların farklı protein gruplarına veya aynı protein grubu içerisinde farklı sınıflara dâhil olduklarına işaret etmektedir.

Elde edilen bulgulara göre *M. lebetina*'daki fibrinojenolitik enzimler substratı daha iyi parçaladığı için enzim aktiviteleri, *M. raddei* fibrinojenolitik enzimlerine göre daha fazladır (Şekil 4.4). Bu sonuca Şekil 4.5.te verilen grafiklerden de ulaşılabilir. Grafikler oluşturulurken arka plan koyu olarak seçildiğinden, piklerin tepe noktası yüksek olan örneklerin fibrinojeni daha fazla parçaladığı yani ilgili bantlarda daha az fibrinojen bulunduğu göz önüne alınmalıdır. Grafiklere bakıldığında, *M. raddei* zehir örneği içeren a, b ve c grafiklerindeki bantların pikleri, *M. lebetina* zehir örneği içeren d, e ve f grafiklerindeki bantların piklerine göre daha kısadır. Çünkü *M. lebetina* zehir örneği, *M. raddei* zehir örneğine göre fibrinojeni daha çok parçalamıştır. Bir diğer deyişle *M. lebetina* zehri fibrinojenolitik aktivitesi, *M. raddei* zehrine göre daha yüksektir.

Ancak deneyin asıl amacınının *M. raddei* zehri fibrinojenolitik aktivitesini belirlemek olduğu göz önüne alınır, yaklaşık 50 ve 75 kDa ağırlığındaki iki enzimde bu aktivitenin görüldüğü belirlenmiştir ve önceki çalışma teyit edilerek fibrinojenolitik enzimlerin moleküler ağırlıkları hakkında veri elde edilmiştir.



Şekil 4.4. *M. raddei* ile *M. lebetina* zehri fibrinojenolitik aktivitelerinin zimogram jel görüntüsü



Şekil 4.5. (a), (b), (c): *M. raddei* ile (d), (e), (f): *M. lebetina* zehri fibrinojenolitik aktiviteilerinin zimogram jel görüntüsündeki bantların yoğunluk grafikleri

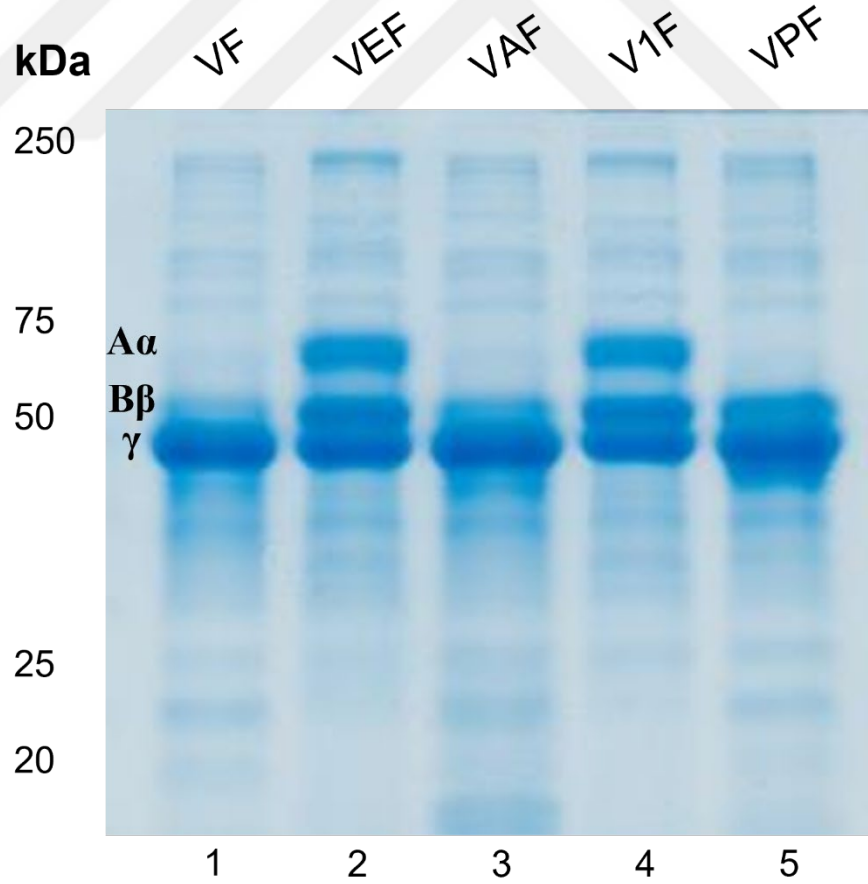
4.2.3 Proteaz inhibitörlerinin zehirdeki fibrinojenolitik enzimler üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Deney gruplarının kısaltmaları ve yapılan işlemlerin açıklamaları Tablo 3.2.de yer almaktadır. Deney sonucundaki jel görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.6.), zehir ile fibrinojen (VF); zehir, aprotinin ile fibrinojen (VAF); zehir, PMSF ile fibrinojen (VPF) içeren örneklerde fibrinojen A α zincirinin kaybolduğu açıkça görülmektedir.

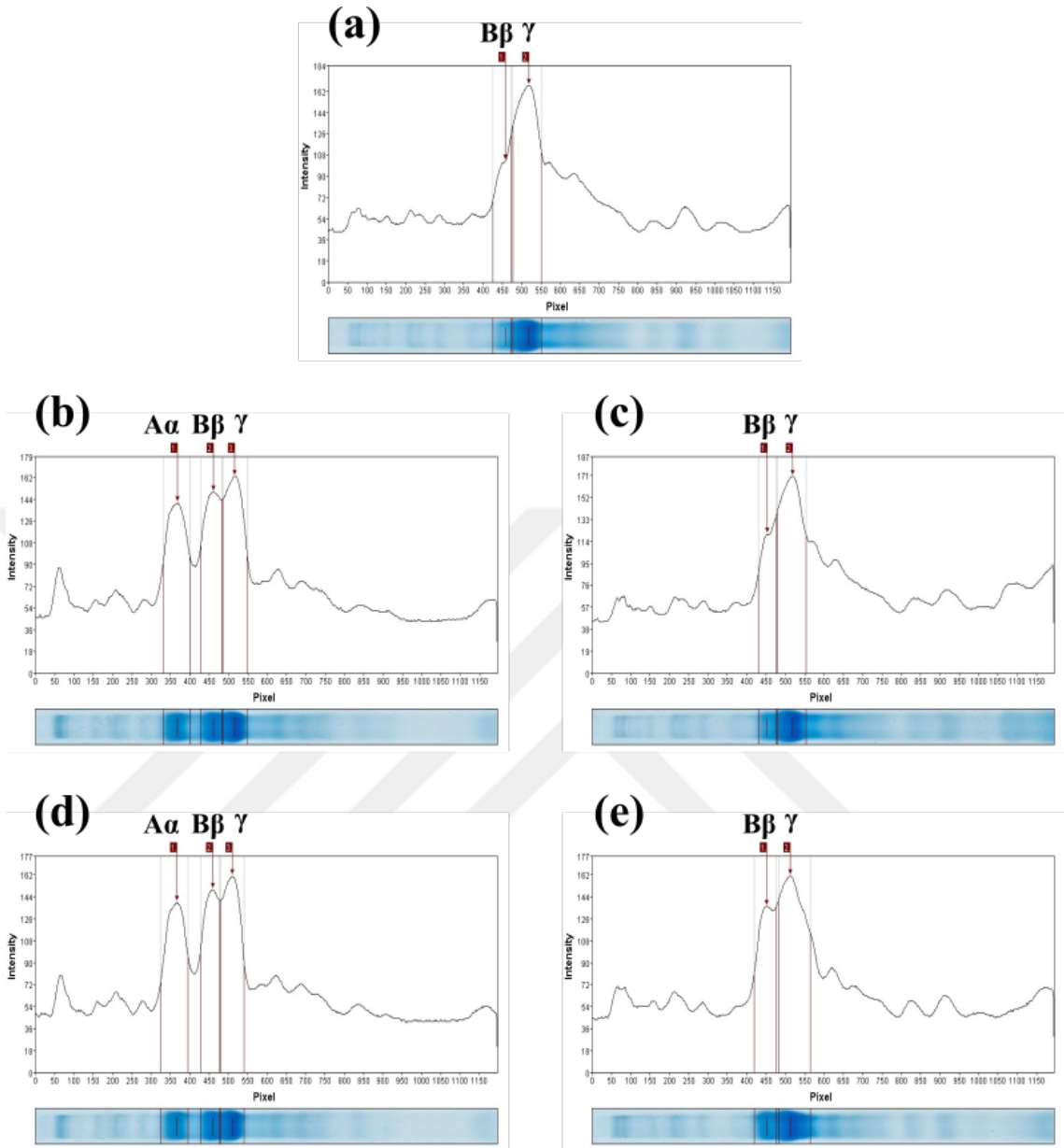
Dolayısıyla aprotinin ve PMSF'nin, *M. raddei* zehri fibrinolitik aktivitesini engellemediği ortaya çıkmaktadır.

Zehir, EDTA ile fibrinojen (VEF); zehir, 1,10-fenantrolin ile fibrinojen (V1F) örnekleri ise fibrinojen A α zincire etki etmemiştir. A α zincir diğer örneklerin aksine parçalanmadan kalmış ve jelde bant oluşturmuştur. Başka bir deyişle, burada kullanılan inhibitörler tarafından *M. raddei* zehrindeki fibrinolitik enzimler inhibe edilmiştir. Bu sonuçlar Şekil 4.7.de verilen bant yoğunluk grafiklerinde de açıkça görülmektedir.

M. raddei zehrinin EDTA ve 1,10-fenantrolin metalloproteinaz inhibitörleri tarafından inhibe edilmesi yani fibrinojen üzerindeki etkisinin baskılanması, zehirdeki fibrinolitik enzimlerin metalloproteinazlara ait olduğu bulgusunu ortaya çıkarmaktadır.



Şekil 4.6. Farklı inhibitörlerin *M. raddei* zehri fibrinolitik enzim aktivitesi üzerinde etkisini gösteren jel görüntüsü (VF: zehir ile fibrinojen; VEF: zehir, EDTA ile fibrinojen; VAF: zehir, aprotinin ile fibrinojen; V1F: zehir, 1,10-fenantrolin ile fibrinojen; VPF: zehir, PMSF ile fibrinojen) (Ayrıca Tablo 3.2.ye bakınız)

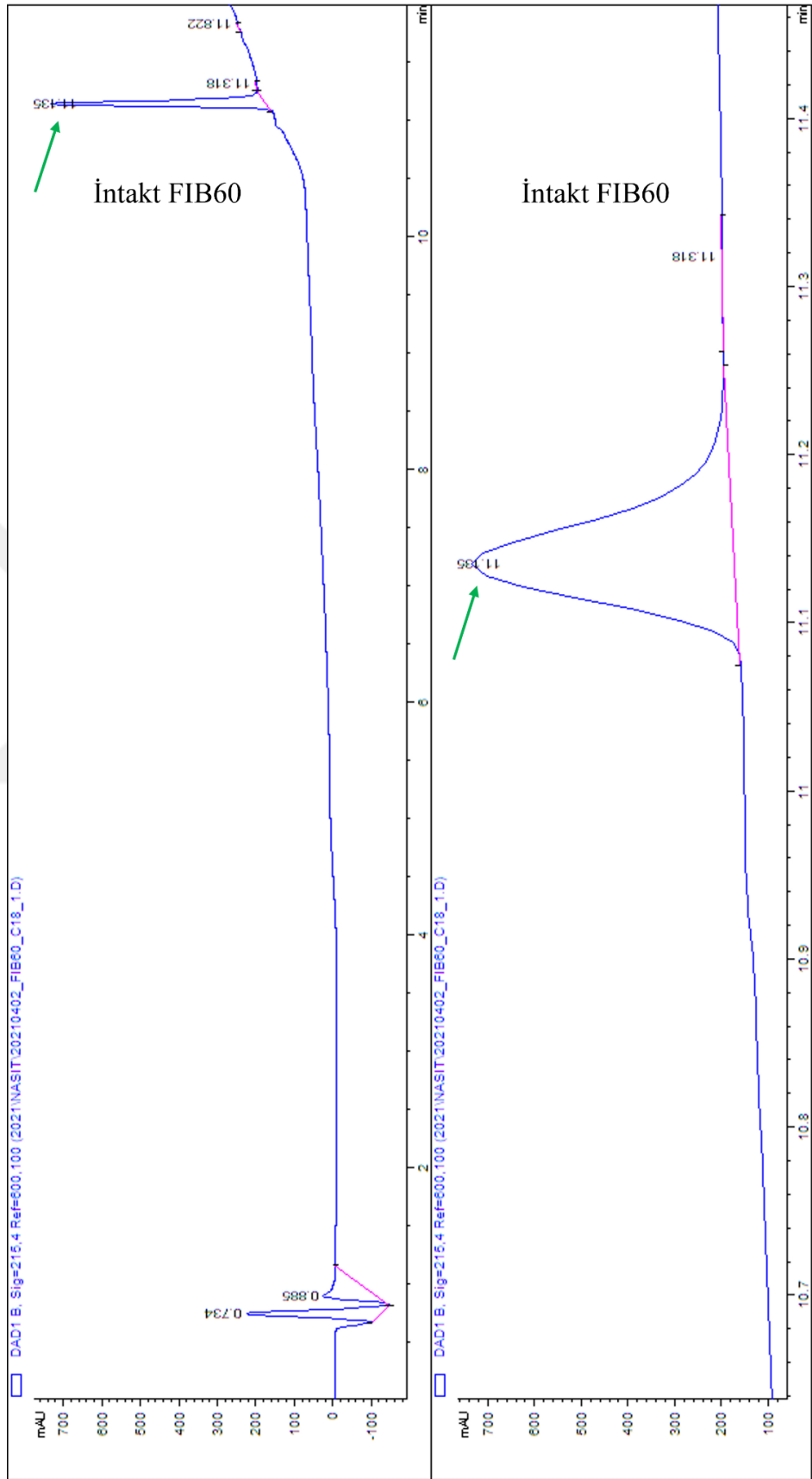


Şekil 4.7. Farklı inhibitörlerin *M. raddei* zehri fibrinojenolitik enzim aktivitesi üzerinde etkisini gösteren jel görüntüsüne ait yoğunluk grafikleri, (a): VF, (b): VEF, (c): VAF, (d): V1F ve (e): VPF sütunlarına aittir. (Ayrıca Tablo 3.2.ye bakınız)

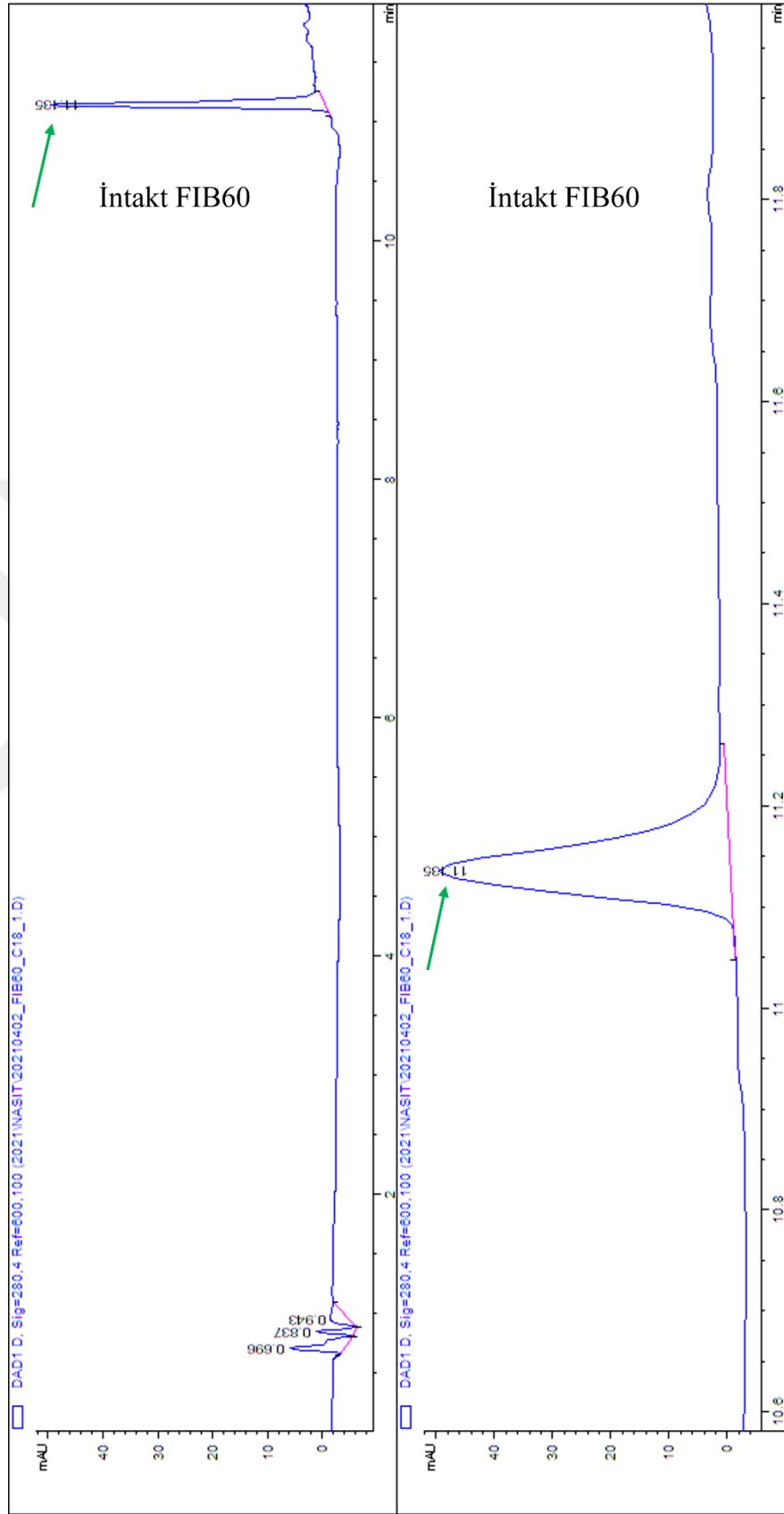
4.3 HPLC Bulguları

SDS-PAGE ile *M. raddei* zehrindeki fibrinojenolitik enzimlerin değerlendirilmesinin yanı sıra, HPLC yöntemi de bulguları doğrulamak için ek bir yöntem olarak kullanılmıştır. Deney bulguları olarak peptit ve proteinlerin tespit edilmesi amacıyla 215 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyonlarını içeren kromatogramlar kullanılmıştır.

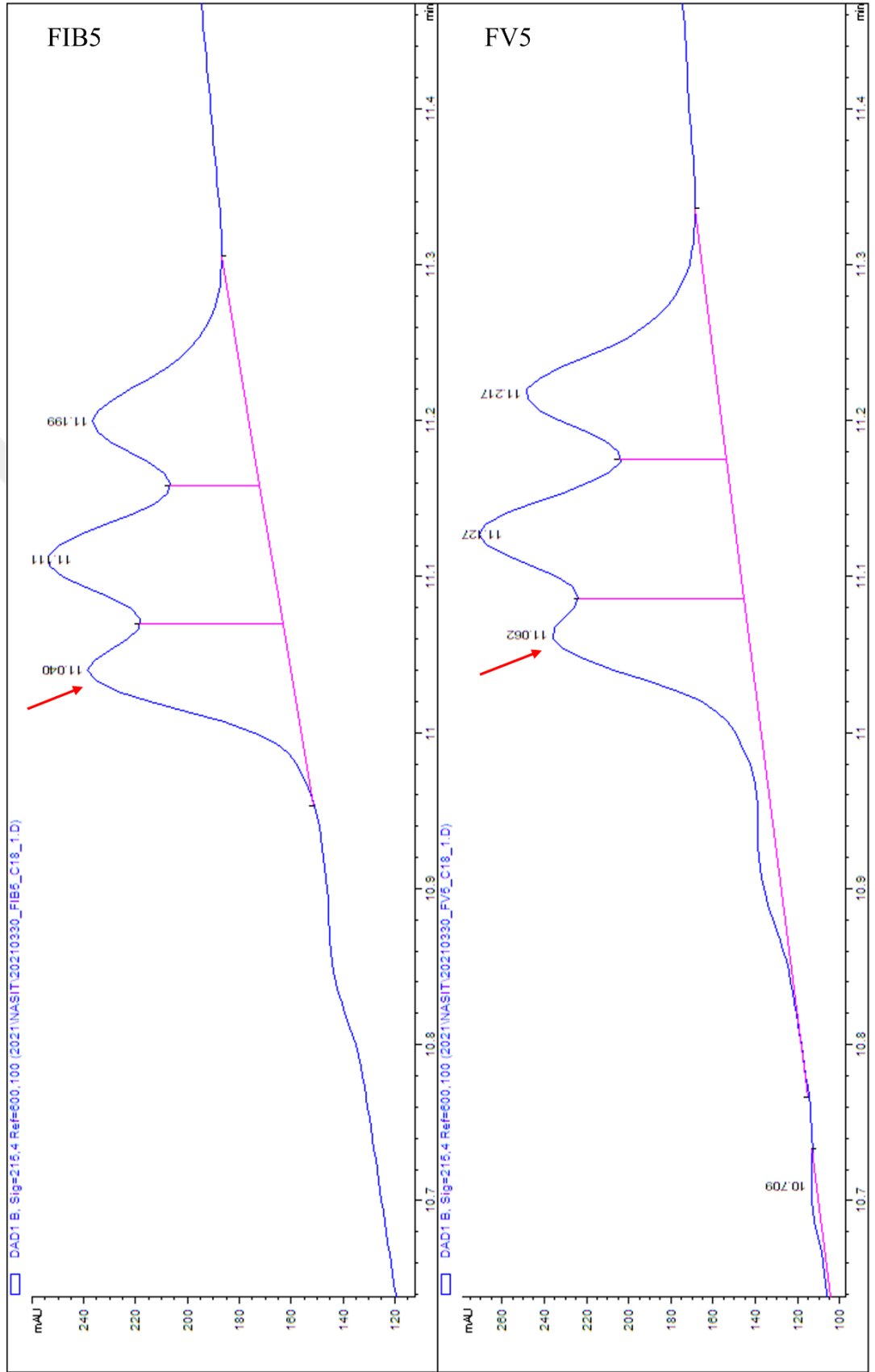
İntakt FIB60 (herhangi bir indirgenme yapılmamış fibrinojen) örneğine ait kromatogramlar Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.da gösterilmektedir. Her iki şekilde de 11,1. dk.da gelen pikler indirgenmemiş saf fibrinojene aittir. Dolayısıyla tek bir pik olarak görünmektedir. Şekil 4.10. ile Şekil 4.11.de yer alan FIB5-FV5 örnekleri ve Şekil 4.12. ile Şekil 4.13.te yer alan FIB60-FV60 örneklerine ait kromatogramlarda kırmızı ok ile belirtilen pikin fibrinojenin A α zincirine ait olduğu düşünülmektedir. Çünkü intakt FIB60 örneğinin kromatogramında 11,1. dk.da ortaya çıkan tek bir pikin, bu örnekler için yine aynı dk.larda üç farklı pike ayrıldığı görülmektedir ve indirgenmeden sonra görülen bu durumun fibrinojene ait üç zincirden kaynaklandığı düşünülmektedir. Zehir ile fibrinojen örneklerinin etüvdeki inkübasyon süresi arttıkça, zehirdeki fibrinojenotilik enzimlerin fibrinojenin A α zincirini parçaladığı bilinmektedir. Bu parçalama zehir ile fibrinojen inkübasyonuna ait SDS-PAGE jellerinde 60. dk.da net bir şekilde görülmektedir. SDS-PAGE sonuçlarıyla birlikte düşünüldüğünde bu bulgu, *M. raddei* zehri fibrinojenolitik enzimlerinin, fibrinojenin A α zincirini parçaladığını göstermektedir.



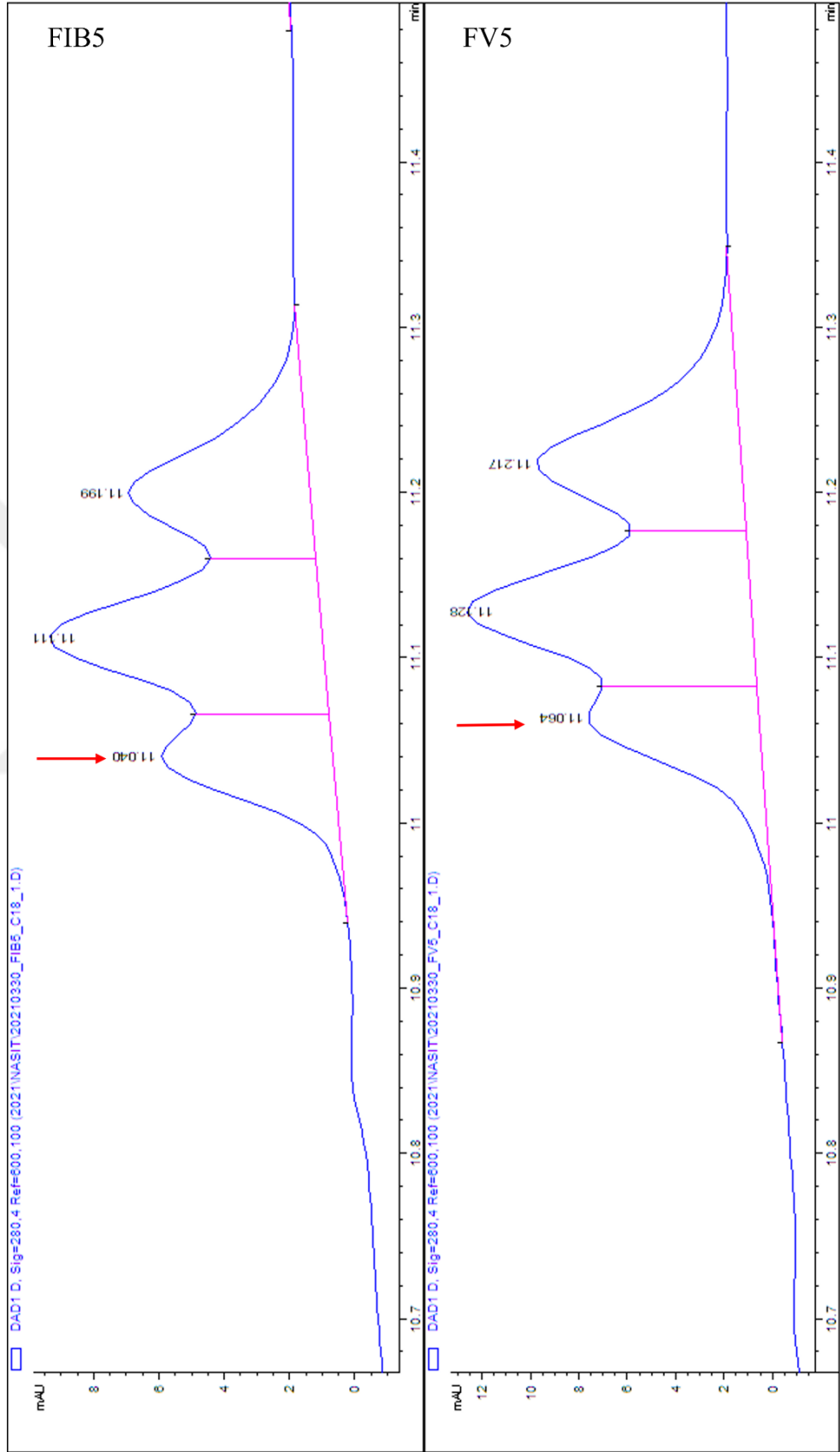
Şekil 4.8. C18 kolonundan geçirilen intakt fibrinojenden (İntakt FIB60) elde edilen kromatogram (215 nm)



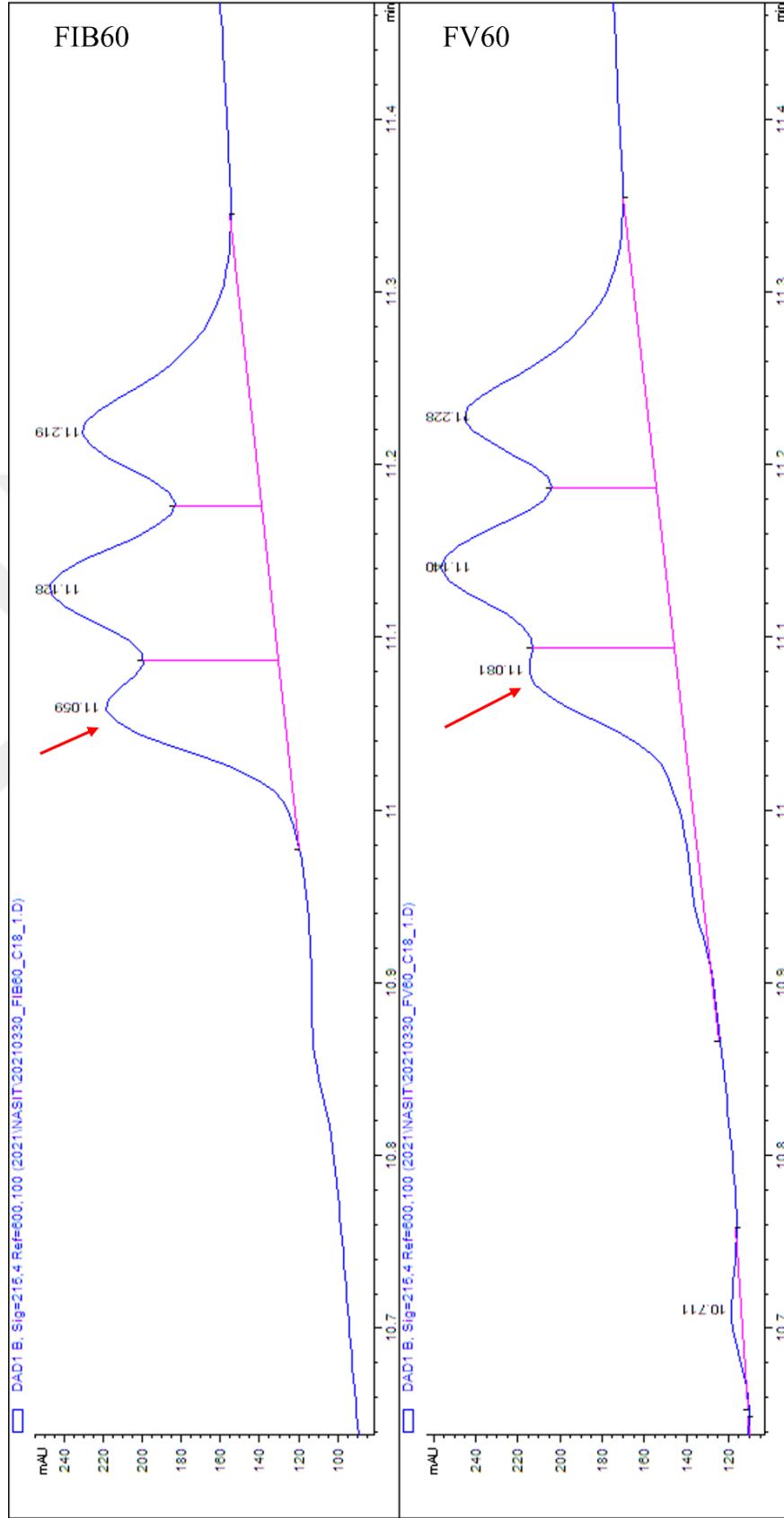
Şekil 4.9. C18 kolonundan geçirilen intakt fibrinojenden (İntakt FIB60) elde edilen kromatogram (280 nm)



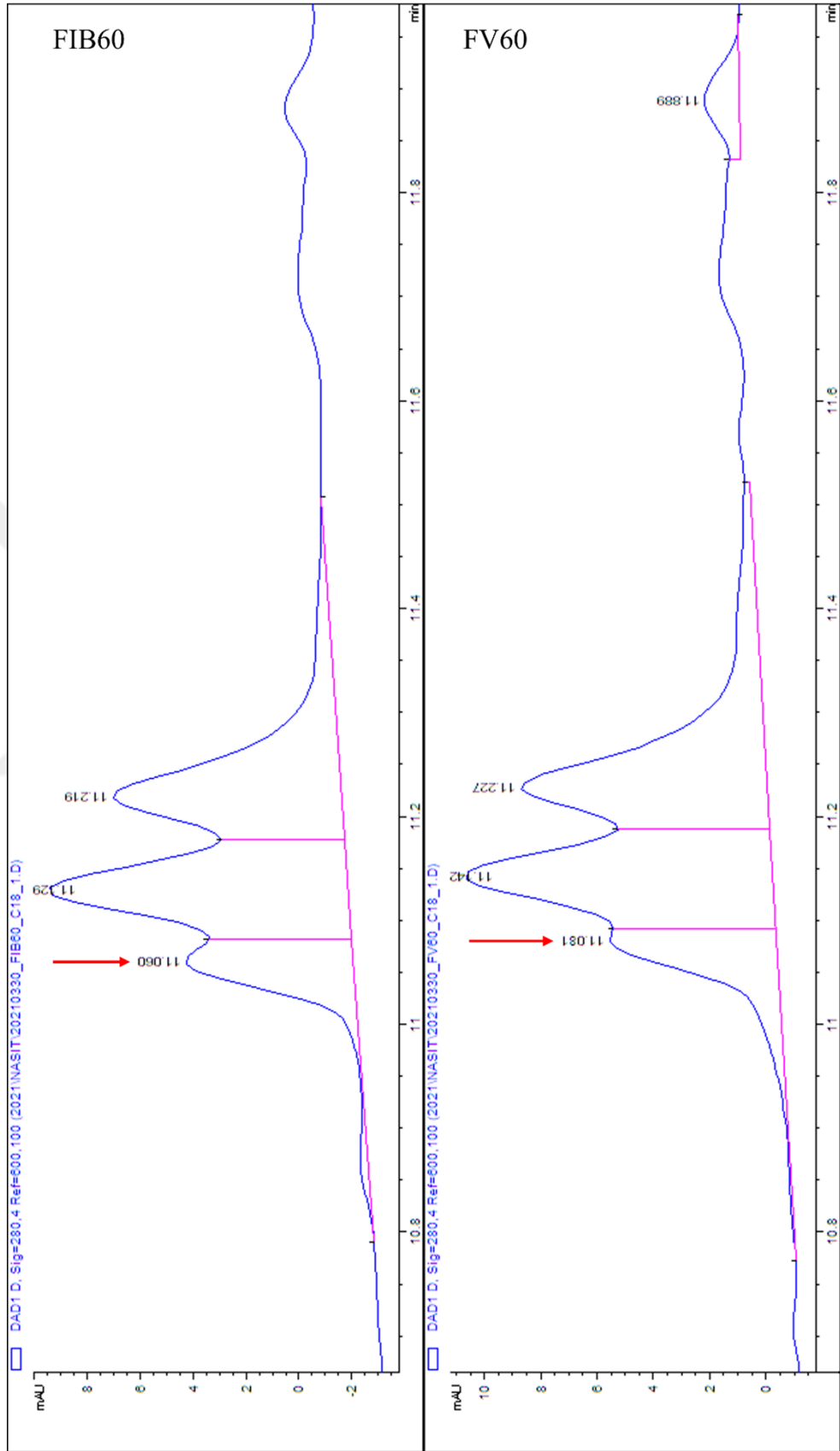
Şekil 4.10. C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB5) ve fibrinojen-zehir (FV5) örneklerinden elde edilen kromatogram (215 nm)



Şekil 4.11. C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB5) ve fibrinojen-zehir (FV5) örneklerinden elde edilen kromatogram (280 nm)



Şekil 4.12. C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB60) ve fibrinojen-zehir (FV60) örneklerinden elde edilen kromatogram (215 nm)



Şekil 4.13. C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB60) ve zehir-fibrinojen (FV60) örneklerinden elde edilen kromatogram (280 nm)

5. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Küresel Hastalık Yüğü, Yaralanmalar ve Risk Faktörleri (GBD) 2010 Çalışması verilerine bakılacak olursa, dünyada her dört ölümden biri iskemik kalp hastalıkları ve felç sonucu meydana gelmektedir. Tromboz sonucu gelişen kalp krizi (miyokard infarktüsü), felç, iskemik şok ve derin ven trombozu gibi hastalıkların tedavisinde kan sulandırıcı (antikoagülan) ilaçlar yer almaktadır [1]. Bu ilaçlardan bir kısmı yılan zehri fibrinojenolitik enzimlerden veya onların rekombinant ürünlerinden oluşmaktadır. Tüm bu gelişmelere bakarak, yılan zehri fibrinojenolitik enzimlerin önemi her geçen gün artmaktadır. İlaç talebine yeterli hale gelebilmek adına yılan zehri çalışmaları hız kazanmalı ve mümkün olabildiği kadar doğanın bize sunduğu doğal bileşiklerden yararlanılmalıdır. Bu hedefe ulaşmak için farklı türlerin zehirleri şimdiye kadar çalışılmamış yönleriyle araştırılmalıdır.

Yukarıda bahsedilen kapsam çerçevesinde planlanan bu tez çalışması, *Montivipera raddei* zehrinin fibrinojenolitik aktivitesi üzerine yapılan ilk çalışmadır. Daha önce gerçekleştirilen iki farklı proteomik çalışmadaki [26, 28] protein ailesi bazında yapılan genel karakterizasyonda, bu yönde proteinlerin bulunabileceği (metalloproteinazlar, serin proteinazlar) ortaya koyulmuştur ancak fonksiyonel aktivite çalışmaları ile bu etki kanıtlanmamış ve fibrinojenin hangi alt zincirleri üzerinden etki ettiği gösterilmemiştir. Yılan zehri metalloproteinaz ve yılan zehri serin proteinazlarının hepsinde fibrinojenolitik aktivite gözlenmez, bu nedenle bu enzim grupları *M. raddei* zehrinde daha önce tanımlanmış olsa bile fibrinojenolitik aktivitenin fonksiyonel çalışmalarla gösterilmesi gerekir. Ayrıca fibrinojenolitik aktiviteye sahip bir enzim de *M. raddei* zehrinden bugüne kadar izole edilmemiştir. Bu açıdan tez çalışması, zehrinin fibrinojenolitik aktivitesini işlevsel anlamda ilk kez belirlemesi ve daha sonraki saflaştırma çalışmalarına ışık tutması bakımından özgün ve yaygın etkisi yüksek bir çalışmadır.

Bu çalışmada SDS-PAGE, zimogram SDS-PAGE, proteaz inhibitörleri çalışması ve HPLC yöntemlerinin kullanılmasıyla *Montivipera raddei* zehrinin fibrinojenolitik aktivitesi ortaya koyulmuş, enzimin ait olduğu protein grubu belirlenmiş ve moleküler

ağırlığı hakkında bilgi edinilmiştir. İlk olarak standart SDS-PAGE yöntemi ile fibrinolitik aktivitenin belirlenmesi deneyi yapılmıştır. Bu deneyle *M. raddei* zehrinin fibrinojen ile 37 °C’de 10, 30, 60 ve 120 dk. inkübasyonları, fibrinojenin tek başına 37 °C’de 10, 30, 60 ve 120 dk. inkübasyonu ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.2.). İnkübasyon süresinin fibrinojen üzerindeki olası etkilerini görmek için fibrinojen tek başına farklı sürelerde inkübe edilmiştir ancak fibrinojenin 37 °C’de 120 dk.ya kadar inkübe edilmesi alt zincirlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır. Fibrinojen ile zehir inkübasyonları sonucunda fibrinojen parçalanması geçen her dakika artarak devam etmiştir. En son 60 ve 120. dk. örneklerinde fibrinojen A α zincirinin bantta tamamen kaybolduğu ve buna göre *M. raddei* zehrinde α -fibrinojenazlar bulunduğu yönünde bir sonuç ortaya çıkmıştır.

Çalışmanın sonraki aşamasında proteaz inhibitörlerinin *M. raddei* zehirdeki fibrinolitik enzimleri üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Metalloproteinaz inhibitörleri olan EDTA ile 1,10-fenantrolin [31, 63, 64], zehirdeki fibrinolitik aktiviteyi baskıladığından dolayı, yapılan SDS-PAGE sonrasında zehrin fibrinojene karşı etkisiz hale geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.6.). Ancak zehrin fibrinojen üzerindeki etkinliği serin proteinaz inhibitörleri olan PMSF ve aprotinin [30, 31, 63–65] varlığında bir değişikliğe uğramamıştır. Bu sonuçlar *M. raddei* zehrinin metalloproteinaz grubuna ait fibrinolitik enzimler içerdiğini göstermektedir.

Fibrinojen zimogram SDS-PAGE yöntemiyle *M. raddei* ve *M. lebetina* zehirleri karşılaştırmalı olarak takip edilmiştir. Deney bulgularına göre *M. lebetina*’nıniki kadar güçlü olmasa bile [59] *M. raddei* zehri de fibrinolitik aktivite göstermektedir. Ayrıca *M. raddei* zehri ana fibrinolitik enzimleri yaklaşık 50 ve 75 kDa ağırlıklarında iki bant şeklinde gözlenmiştir. Bu da literatürde tanımlanan *Montivipera raddei* metalloproteinazlarına ait veriler ile uyumludur [26, 28]. Nalbantsoy ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmada yaklaşık 60 kDa olarak belirlenen zehir protein bandında metalloproteinaz enzimleri bulunduğu belirlenmiş [28], Sanz ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 56 ve 67 kDa olarak belirlenen SDS-PAGE protein bantlarından P-III sınıfı metalloproteinaz enzimleri tanımlanmıştır [26]. Bahsi geçen çalışmalarda serin proteinaz enzimleri daha düşük moleküler ağırlıklı bantlarda tanımlanmıştır. Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular literatür verileri ile

desteklenmekte ve *M. raddei* zehrinde fibrinojenolitik aktiviteli metalloproteinazların bulunduğu sonucunu kuvvetlendirmektedir. *M. raddei* zehri metalloproteinazlarının yaklaşık 50 ve 75 kDa ağırlıklarına sahip olması, P-I sınıfı metalloproteinazlara ait olmadığı, bunun yanı sıra P-II veya P-III sınıfı metalloproteinazlara ait olabileceği bulgusunu ortaya çıkarmaktadır [30]. Sekanslarının çıkarılarak karakterizasyonlarının yapılması ve net ağırlıklarının kaç kDa olduğu ancak yapılacak kromatografik saflaştırma ve kütle spektrometresi çalışmaları ile mümkün olabilir.

Bu tez çalışmasının son basamağında HPLC yöntemi kullanılarak zehrin fibrinojenin A α zinciri üzerindeki etkisi teyit edilmiştir. HPLC grafiklerine bakıldığında, fibrinojen alt zincirlerine ait olduğu belirlenen piklerden kırmızı ok ile işaretli olan pikin A α zincirini temsil ettiği düşünülmektedir. Bu sonuca zehir ile fibrinojenin inkübe edilme süresinin artmasıyla beraber fibrinojen A α zinciri olarak belirlenen pikin azalmasından ulaşılmıştır. Diğer piklerde ise belirgin bir değişim görülmemiştir. Uygulanan ters faz kromatografi yönteminin prensibi ve fibrinojen zincirlerinin polarite dereceleri birlikte değerlendirilerek bir yorumlama yapılabilir. Ters faz kromatografide sabit faz apolar özelliktedir. Bu nedenle yüklenen örnekte daha apolar veya hidrofobik olan moleküller kolondan daha geç çıkar [62]. UniProt veri tabanından elde edilen fibrinojen A α , B β ve γ zinciri amino asit sekansları ile EMBOSS Pepstats uygulamasında yapılan analize göre A α zinciri yaklaşık olarak %45 oranında polar olmayan amino asitler içermekteyken bu oran B β ve γ zincirinde yaklaşık %50 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre A α zincirin kolonu daha önce terk edeceği düşünülebilir ve elde ettiğimiz sonucu desteklemektedir. Ancak geriye kalan iki pikten hangisinin B β veya γ zincire ait olduğunu elde edilen sonuçlarla kesin olarak söylemek mümkün değildir. *M. raddei* zehri fibrinojenolitik enzimlerinin daha önceki çalışma ile sadece fibrinojenin A α zincirine etki ettiği bulunduğu için diğer alt zincirleri belirlemeye gerek duyulmamıştır. Bu deneydeki amaç, hali hazırda SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiş olan zehir fibrinojenolitik enzimlerinin fibrinojen A α zincirine olan etkisinin, HPLC yöntemi ile de teyit edilmesi olduğundan bu çalışma kapsamında istenilen destekleyici bulgu elde edilebilmiştir. A α zincirini temsil eden pikte, SDS-PAGE sonuçlarında olduğu gibi tamamen bir kaybolma görülmemesinin iki muhtemel sebebi olabilir: 1) HPLC ayırımında zincir pikleri tam olarak birbirinden ayrılmadığından A α zincirine ait olarak belirlenen pikte diğer zincirler de bulunabilir, 2) HPLC yöntemi SDS-PAGE'de

kullanılan boyaya göre çok daha hassas olduğundan düşük miktarda parçalanmadan kalmış A α zincirleri mevcutsa bunlardan kaynaklı sinyal alınabilir. HPLC çalışmasında görülen diğer piklerin de hangi zincirlere ait olduğunun kesin olarak tespit edilmesiyle ve metodun daha iyi çözünürlükte ayırım sağlayacak şekilde optimize edilmesiyle, benzer çalışmalarda alternatif ve hızlı sonuç veren bir yöntem olarak kullanılabilir. Bunun için; mevcut deney tekrar edilerek çözünürlük (gerekirse farklı kromatografi yöntemleri de denenerek) artırıldıktan sonra fibrinojen zincirlerine ait pikler ayrı ayrı fraksiyon şeklinde toplanıp SDS-PAGE yöntemiyle moleküler belirteç ile kıyaslama yapılarak ayrımlarına bakılabilir. Bu fraksiyonların kütle spektrometresi ile de analiz edilmesiyle daha kesin bir tanımlama gerçekleştirilebilir. Ayrıca farklı zincirleri parçaladığı bilinen saf enzimlerle (örneğin hem A α hem de B β zincirini kesen trombin) inkübasyon ile de fibrinojen zincirlerine ait pikler tanımlanabilir. Jel filtrasyon yöntemiyle fibrinojen alt zincirlerinin moleküler boyutlarına göre ayırımı sağlanabilir ve böylelikle sırasıyla A α , B β ve γ zincirlerine ait pikler kesin olarak belirlenebilir.

Son zamanlardaki yılan zehirlerinin proteomik analizleri, SVMP'lerin Viperidae zehirlerinin çoğunda ana bileşenleri temsil ettiğini göstermektedir [33, 66]. Daha önce bahsedildiği gibi *M. raddei* zehrinde de metalloproteinazların varlığı gösterilmiştir [26, 28]. Metalloproteinazlar, aktif bölgelerinde bir Zn²⁺ veya Ca²⁺ iyonu kullanan endopeptidazlardır [67]. Zehirler, yüksek derecede toksik olan çeşitli metalloproteinazlar içerir, bu da yılanların avlarında kan pıhtılaşması ve hemostatik tıkaç oluşumuna müdahale ederek veya bazal membran (bazal lamina) yapılarını veya hücre dışı matris bileşenlerini parçalayarak ciddi bir kanamaya neden olur [36]. Fibrinojenolitik aktiviteye sahip metalloproteinazların tercihen fibrinojenin A α zincirini parçalamakla birlikte bazılarının doğrudan B β zincirini parçalayarak aktiviteye başladığı tespit edilmiştir. Fibrinojenolitik serin proteinazların ise tercihen fibrinojenin B β zincirini parçaladığı ve bunun yanında A α zincire karşı düşük bir aktivite gösterebildiği ortaya çıkarılmıştır [31].

Aynı cinse ait *Montivipera xanthina* türü ile Arıkan ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada [68], bu türe ait zehrin α - ve β - fibrinojenazlara sahip olduğu bulunmuştur. Bu cinse ait türlerin fibrinojenolitik enzimlerinin saflaştırılması ve yeni enzimlerin tanımlanması için önemli kaynaklar olduğu tespit edilmiştir. *Bothrops*

alternatus türü engerek yılanı zehrinden saflaştırılan metalloproteinaz izoformları olan BaltMP-I ve BaltMP-II enzimlerinin, fibrinojen A α ve B β zincirine etki ettiği ancak γ zincirine etki etmediği ortaya çıkarılmıştır [69]. Başka bir çalışmada ise *Bothrops atrox* zehrinden Batroxase isimli, fibrinojenin A α ve B β zincirini hidrolize eden P-I sınıfı bir metalloproteinaz izole edilmiştir. Bunun için saflaştırma amacıyla jel filtrasyon, anyon değişim kromatografisi ve karakterizasyon için elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi kullanılmıştır. Proteinin üç boyutlu yapısı homoloji modelleme yaklaşımıyla elde edilmiştir [70]. Örnek olarak bahsedilen çalışmalara bakıldığında, farklı türlerin (özellikle de engereklerin ve çingiraklı yılanların) zehirlerinden fibrinojenolitik aktiviteye sahip metalloproteinazların tanımlanmasıyla ilgili birçok araştırmanın yapıldığı görülmektedir. Tez çalışmasında *M. raddei* zehrinde fibrinojenolitik metalloproteinazların varlığının ilk kez ortaya çıkarılması bu anlamda literatüre önemli bir katkı yapmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan zehir örneklerinin elde edildiği engerekler ile aynı bölgeden elde edilen zehirleri kullanan Nalbantsoy ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmada, RP-HPLC ayırma, SDS-PAGE, triptik sindirim ve LC-MS/MS (*de novo* dizileme) yöntemleri kullanılarak kısmen *M. raddei* zehrinin içeriği ve proteomik karakterizasyonu ortaya çıkarılmıştır. Buna göre elde edilen verilere bakıldığında *M. raddei* zehrinde hemostazda etkili olabilecek enzimler tespit edilmiş ancak etkileriyle ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmaya göre metalloproteinazların toplam proteine oranı %11,54'tür. Karakterize edilmemiş proteinlerin toplam proteine oranı ise %7,70'tir. Veriler incelendiğinde *M. raddei* zehir içeriğinde metalloproteinazların önemli bir yeri vardır. Gelecek çalışmalarda, karakterize edilmemiş proteinler içerisinden de metalloproteinaz grubuna dâhil olabilecek proteinlerin tanımlanması mümkündür. Ayrıca bu çalışmada, *M. raddei* zehrinin bazı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri de incelenmiştir. Sonuç olarak *M. raddei* zehrinin, Caco-2 (insan kolon kolorektal adenokarsinomu) ile U87MG (insan glioblastoma astrositomu) hücre hatlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir [28]. Sanz ve çalışma arkadaşlarının daha önce yaptığı, Ermenistan'tan elde edilen *M. raddei* zehrinin karakterizasyon çalışmasında ise yine benzer içerik elde edilmiş, metalloproteinaz oranı ise daha fazla bulunmuştur [26, 28]. Bu çalışmalar da *M. raddei* türünün farklı aktivitelere sahip metalloproteinazlar açısından önemli bir kaynak olduğunu göstermektedir.

Biyoteknolojik ilaç potansiyeli açısından önemli enzim grupları olan SVMP ve SVSP ile ilgili çalışmaların özellikle *Bothrops* sp. gibi belirli cins zehirli yılanlara odaklandığı görülmektedir [24, 63, 65, 69–71]. Yapılan çalışmalarda genel olarak, sıvı kromatografi yöntemiyle enzimlerin ayrı ayrı fraksiyonlarda toplanıp saflaştırılmasından sonra biyokimyasal karakterizasyonu için SDS-PAGE ve kütle spektrometresi yöntemlerine başvurulmuştur. Bu tez çalışmasında enzim saflaştırma işlemi yapılmamış, doğrudan ham zehrin aktivitesi araştırılmıştır. HPLC yöntemi ise fibrinojenolitik enzimlerin aktivasyonunu doğrulamak amacıyla kullanılmıştır. Yılan zehri gibi doğal kaynaklardan biyoaktif moleküllerin arandığı çalışmalarda, şimdiye kadar çalışma yapılmamış farklı türlerin çalışılması her zaman için önemlidir. Bu sayede şimdiye kadar keşfedilmemiş yeni ve daha etkili moleküllerin ortaya çıkarılması mümkün olmaktadır. Yapılan tez çalışmasında da fibrinojenolitik aktivite yönünde analizi yapılmamış bir zehir çalışılmıştır.

Evrensel olarak yılda 5,4 milyon insan, yılanlar tarafından ısırılmakta ve 2,7 milyonu zehirlenmektedir. Zehirlenen insanların yaklaşık 81.000 ila 138.000'i hayatını kaybetmektedir [51]. *Montivipera raddei* zehri insan üzerinde etkilidir [27] ancak zehri nötralize edecek ve zehir toksinlerinden hızlıca arınmayı sağlayacak spesifik bir antiserum bulunmamaktadır. Isırılma vakalarında farklı engerek türleri için üretilmiş polivalan antiserumlar kullanılmaktadır. Bundan dolayı bu tez bulguları ve devamında yapılabilecek zehir protein karakterizasyonu çalışmaları ile Türkiye'de antiserum üretiminin teşvik edilmesi ile teknolojik ve üretim odaklı yaklaşımlara öncü olabilecek kazanımlar elde edilebilir. Ayrıca antiserum ürünlerinin etkinlik çalışmalarında *in vitro* nötralizasyon parametrelerinden biri olarak *M. raddei* zehri için fibrinojenolitik aktivitenin ele alınabileceği de bu tez çalışmasıyla ortaya koyulmuştur. Aynı zamanda ısırılma vakalarında klinik tablonun daha ayrıntılı değerlendirilebilmesine katkı sağlayacak veriler de elde edilmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan öncü niteliğindeki çalışmaların ardından, *Montivipera raddei* zehrindeki fibrinojenolitik enzim(ler)in kromatografik yöntemlerle saflaştırılıp N-terminal sekanslama ve/veya kütle spektrometri analiziyle sekanslarının çıkarılması yönünde çalışmalar yapılmalıdır. Yine saflaştırılacak enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi yönünde yapılacak çalışmalar da karakterizasyona katkı

sağlayacaktır. UniProt protein sekans veri tabanında da *M. raddei* zehrinden saflaştırılmış herhangi bir peptit veya proteine ait veri bulunmadığı göz önünde bulundurulduğunda, bu yönde bir çalışma bilimsel bilgi birikimine önemli bir katkı sağlayacaktır. Tür içi ve türler arası karşılaştırmaların yapılması ve bunların evrimsel ilişkilerinin belirlenmesi zehir varyasyonunun değerlendirilmesi için veriler sağlayacaktır. X-ışını kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi gibi yöntemlerle *M. raddei* zehrindeki metalloproteinazlar başta olmak üzere diğer proteinlerin 3 boyutlu yapıları ortaya çıkarılabilir. Bu sayede yapı-işlev arasındaki ilişkiler irdelenip moleküler evrim çalışmalarına katkı sağlanabilir. Yine *M. raddei* zehrinden elde edilecek fibrinojenolitik enzimler kullanılarak *in vitro* hücre kültürü ve sonrasında *in vivo* hayvan deneylerinin yapılmasıyla enzimlerin işlevine ve biyolojik aktivitelerine dair daha detaylı bilgilere ulaşılabilecektir.

Sonraki süreçte *M. raddei* zehri veya zehrinden saflaştırılmış fibrinojenolitik enzimlerin kan pıhtılaşma zamanına olan etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda çalışılması önerilebilir. Böylece zehirlenme fizyopatolojisinin veya pıhtılaşma tedavisi amacıyla kullanılacak moleküler ürünlerin anlaşılması yolunda önemli adımlar atılacaktır. Ayrıca zehrin veya zehir fibrinojenolitik enzimlerinin *in vitro* ortamda diğer kan proteinleri (ör: plazminojen, antitrombin-III vs.) ile kolajen ve heparin varlığındaki davranışlarının incelenip tanımlanmış diğer zehirler/enzimler ile kıyaslanmasının özellikle biyoteknolojik ürün geliştirme açısından önemli olabileceği düşünülmektedir. Bu kapsamda fibrinojenolitik enzimlerin, peptidomimetik formunun oluşturulması ve aşırı kan kaybına neden olabilecek yaralanmalarda pıhtılaştırıcı etkisinden yararlanılması üzerine ürün tasarımları için de *M. raddei* zehrinin potansiyelinden yararlanılabilir. Fibrinojenolitik özellikte metalloproteinaz gibi pıhtılaşma tedavilerinde ve tanıda kullanılan moleküllere Türkiye’de yaşayan bir yılan türünde rastlanmış olması, daha verimli veya daha farklı bir mekanizmayla çalışabilecek yeni ve yerli biyoteknolojik ürün elde etme yolunda önemli bir adımdır. Bu tez çalışmasının, sağlık alanında hazır tanı ürünü olarak kullanılmak üzere saf fibrinojenolitik enzimlerin izolasyon çalışmalarına öncü olması beklenmektedir. Bu sayede yurtdışı kaynaklı kitlerin kullanımı azaltılabilir ve ülkemize hem teknolojik olarak hem de ekonomik olarak katkı sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Raskob, G. E. *vd.*, "Thrombosis: A major contributor to global disease burden", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 34, 2363–2371, 2014.
2. Vonk, F. J., Jackson, K., Doley, R., Madaras, F., Mirtschin, P. J., Vidal, N., "Snake venom: From fieldwork to the clinic: Recent insights into snake biology, together with new technology allowing high-throughput screening of venom, bring new hope for drug discovery", *BioEssays.*, 33, 269–279, 2011.
3. Serrano, S. M. T., "The long road of research on snake venom serine proteinases", *Toxicon.*, 62, 19–26, 2013.
4. Mackessy, S.P., "Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles, 1. baskı", *CRC Press*, s. 528, Boca Raton, 2009.
5. Atamer, T., "Hemostaz mekanizması", *Türk Hematol. Derneği.*, 2, 6, 2007.
6. Sajevic, T., Leonardi, A., Križaj, I., "Haemostatically active proteins in snake venoms", *Toxicon.*, 57, 627–645, 2011.
7. "Hemostasis and Thrombosis, 4. baskı", *Springer International Publishing*, s. 236, Cham, 2019.
8. Kalaycıoğlu, L., "Kanın Pıhtılaşma Mekanizması ve Hayvanlarda Tesbit Edilen Bazı Pıhtılaşma Bozuklukları", *Ankara Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.*, 26, 206–214, 1979.
9. Atalan, N., "Hemostaz", *Göğüs-Kalp-Damar Anestezi ve Yoğun Bakım Dern. Derg.*, 19, 109–112, 2013.
10. Lu, Q., Clemetson, J. M., Clemetson, K. J., "Snake venoms and hemostasis", *J. Thromb. Haemost.*, 3, 1791–1799, 2005.
11. Gezer, S., "Koagülasyon Testlerinin Klinikte Kullanımı", *HematoLog.*, 8–23, 2012.
12. Weisel, J. W., Litvinov, R. I., "Fibrin Formation, Structure and Properties", *Subcell. Biochem.*, 82, 405–456, 2017.

13. Williams, R. C., "Morphology of bovine fibrinogen monomers and fibrin oligomers", *J. Mol. Biol.*, 150, 399–408, 1981.
14. Kant, J. A., Fornace, A. J., Saxe, D., Simon, M. I., McBride, O. W., Crabtree, G. R., "Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: Gene duplication accompanied by transposition and inversion", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 2344–2348, 1985.
15. Chung, D. W., Harris, J. E., Davie, E. W., "Nucleotide sequences of the three genes coding for human fibrinogen", *Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, and Fibrinolysis*, 1. baskı, C.Y. Liu, S. Chien (Ed.), *Springer*, Boston, s. 39-48, 1990.
16. Litvinov, R. I., Gorkun, O. V., Owen, S. F., Shuman, H., Weisel, J. W., "Polymerization of fibrin: specificity, strength, and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level", *Blood.*, 106, 2944–2951, 2005.
17. İnternet: Peter Uetz, "Species Numbers" (Mayıs 2021), <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>, 27 Ekim 2021.
18. Thornton, S. L., "Snakes", *Encyclopedia of Toxicology*, 3. baskı, P. Wexler (Ed.), *Academic Press*, San Diego, s. 310–312, 2014.
19. 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 J. Zool.*, 38, 216–221, 2014.
20. Hatakeyama, D. M. vd., "Venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings", *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 26, 1–17, 2020.
21. Williams, V., White, J., "Variation in the composition of the venom from a single specimen of *Pseudonaja textilis* (common brown snake) over one year", *Toxicon.*, 30, 202–206, 1992.
22. 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, 81–89, 2005.
23. Daltry, J. C., Wüster, W., Thorpe, R. S., "Diet and snake venom variation", *Nature.*, 379, 537–540, 1996.

24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Budak, A., Göçmen, B., "Herpetoloji, 1. baskı", *Ege Üniversitesi Basımevi*, s. 231, İzmir, 2005.
28. Nalbantsoy, A., Hempel, B.-F., Petras, D., Heiss, P., Göçmen, B., Iğci, 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.
29. Iğci, N., "Koca Engerek, *Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758)'nın Güneydoğu Anadolu ve Kıbrıs Alt Türlerinin Zehirlerinin Proteomik ve Spektroskopik Yöntemlerle Karşılaştırılması", *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s. 144, Ankara, 2010.
30. Alvarez-Flores, M. P., Faria, F., de Andrade, S. A., Chudzinski-Tavassi, A. M., "Snake Venom Components Affecting the Coagulation System", *Snake Venoms*, 1. baskı, P. Gopalakrishnakone, H. Inagaki, C.-W. Vogel, A.K. Mukherjee, T.R. Rahmy (Ed.), *Springer Netherlands*, Dordrecht, s. 417–437, 2017.
31. Swenson, S., Markland, F. S., "Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes", *Toxicon.*, 45, 1021–1039, 2005.
32. Fontana, F., "Treatise on the venom of the viper, on the American poisons, and on the cherry laurel, and some other vegetable poisons, 2. baskı", s. 409, London, 1795.

33. Markland, F. S., Swenson, S., "Snake venom metalloproteinases", *Toxicon.*, 62, 3–18, 2013.
34. Mitchell, S. W., Reichert, E., "Researches upon the Venoms of Poisonous Serpents", *Ind. Med. Gaz.*, 121–123, 1887.
35. Castro, H. C., Zingali, R. B., Albuquerque, M. G., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C. R., "Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now", *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 843–856, 2004.
36. Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., "Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis", *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1477, 146–156, 2000.
37. Pirkle, H., "Thrombin-like Enzymes from Snake Venoms: An Updated Inventory", *Thromb. Haemost.*, 79, 675–683, 1998.
38. Marsh, N. A., "Diagnostic Uses of Snake Venom", *Haemostasis.*, 31, 211–217, 2001.
39. Castro, H. C., Rodrigues, C. R., "Current status of snake venom thrombin-like enzymes", *Toxin Rev.*, 25, 291–318, 2006.
40. de Moraes, N. C. G. *vd.*, "Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom", *Toxicon.*, 60, 1251–1258, 2012.
41. Boundy, J., "Snakes of the World: A Supplement, 1. baskı", *CRC Press*, s. 273, Boca Raton, 2021.
42. Göçmen, B., Kariş, M., Özmen, E., Oğuz, M. A., "First record of the palestine viper *Vipera palaestinae* (Serpentes: Viperidae) from anatolia", *South West. J. Hort. Biol. Environ.*, 9, 87–90, 2018.
43. Zinenko, O., Avcı, A., Spitzenberger, F., Tupikov, A., Shiryayev, K., Bozkurt, E., Ilgaz, Ç., Stümpel, N., "Rediscovered and critically endangered: *Vipera anatolica* Eiselt & Baran, 1970, of the western Taurus Mountains (Turkey), with remarks on its ecology (Squamata: Serpentes: Viperidae)", *Herpetozoa.*, 28, 141–148, 2016.

44. İnternet: The International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species, Göran, N., Claus, A., Avci, A., Akarsu, F., "*Montivipera raddei*", <https://www.iucnredlist.org/species/22993/9406370>, 28 Ekim 2021.
45. İnternet: Türkiye Kurbağa ve Sürüngenleri Gözlemciliği ve Fotoğrafçılığı Topluluğu, "*Montivipera raddei* / Radde Dağ Engereği / Radde's Mountain Viper", <http://www.turkherptil.org/IcerikDetay.asp?IcerikKatId=&TurId=602>
46. Kurtović, T., Lang Baliija, M., Ayvazyan, N., Halassy, B., "Paraspecificity of *Vipera a. ammodytes*-specific antivenom towards *Montivipera raddei* and *Macrovipera lebetina obtusa* venoms", *Toxicon.*, 78, 103–112, 2014.
47. Aznaurian, A. V., Amiryan, S. V., "Histopathological changes induced by the venom of the snake *Vipera raddei* (Armenian adder)", *Toxicon.*, 47, 141–143, 2006.
48. Chavushyan, V. A., Gevorkyan, A. Z., Avakyan, Z. É., Avetisyan, Z. A., Pogosyan, M. V., Sarkisyan, D. S., "The protective effect of *Vipera raddei* venom on peripheral nerve damage", *Neurosci. Behav. Physiol.*, 36, 39–51, 2006.
49. Ayvazyan, N. M., Zaqaryan, N. A., Ghazaryan, N. A., "Molecular events associated with *Macrovipera lebetina obtusa* and *Montivipera raddei* venom intoxication and condition of biomembranes", *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1818, 1359–1364, 2012.
50. Amiryan, S., "Antitumor Activity of Disintegrin-Like Components from the Venom of *Montivipera raddei*", *J. Cancer Ther.*, 2, 752–759, 2011.
51. İnternet: World Health Organization, "Snakebite envenoming", <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
52. Fox, J. W., Serrano, S. M. T., "Approaching the Golden Age of Natural Product Pharmaceuticals from Venom Libraries: An Overview of Toxins and Toxin-Derivatives Currently Involved in Therapeutic or Diagnostic Applications", *Curr. Pharm. Des.*, 13, 2927–2934, 2007.
53. Priel, A., "Snake and Spider Toxins, 1. baskı", *Humana Press*, s. 293, New York, NY, 2020.

54. Chippaux, J. P., Williams, V., White, J., "Snake Venom Variability: Methods of Study, Results and Interpretation", *Toxicon.*, 29, 1279–1303, 1991.
55. Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, 248–254, 1976.
56. Edgar, W., Prentice, C. R. M., "The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains", *Thromb. Res.*, 2, 85–95, 1973.
57. Laemmli, U. K., "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nat. Publ. Gr.*, 227, 680–685, 1970.
58. 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, 1327–1333, 2004.
59. 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*, s. 166, Ankara, 2015.
60. Siigur, J., Aaspollu, A., Tonismägi, K., Trummal, K., Samel, M., Vija, H., Subbi, J., Siigur, E., "Proteases from *Vipera lebetina* Venom Affecting Coagulation and Fibrinolysis", *Haemostasis.*, 31, 123–132, 2001.
61. İnternet: Abcam, Gelatin zymography protocol, <https://www.abcam.com/protocols/gelatin-zymography-protocol>
62. Gündüz, T., "Kromatografi ve Elektroforez, 1. baskı", *Gazi Kitabevi*, s. 294, Ankara, 2015.
63. Amorim, F. G., Menaldo, D. L., Carone, S. E. I., Silva, T. A., Sartim, M. A., De Pauw, E., Quinton, L., Sampaio, S. V., "New insights on moojase, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom", *Toxins.*, 10, 1–19, 2018.

64. De Oliveira, D. G. L., Murakami, M. T., Cintra, A. C. O., Franco, J. J., Sampaio, S. V., Arni, R. K., "Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*", *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 41, 21–29, 2009.
65. Zaqueo, K. D. *vd.*, "Isolation and Biochemical Characterization of a New Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops pirajai* Snake Venom", *Biomed Res. Int.*, 2014, 1–13, 2014.
66. Gâz Florea, Ş. A., Gâz Florea, A., Kelemen, H., Muntean, D. L., "Snake Venom Metalloproteinases", *Acta Medica Marisiensis.*, 62, 106–111, 2016.
67. Gill, S. E., Parks, W. C., "Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40, 1334–1347, 2008.
68. Arıkan, H., Alpagut Keskin, N., Çiçek, K., "Fibrinolytic activity of venom proteins of *Montivipera xanthina* (Gray, 1849) (Ophidia: Viperidae)", *Basic Appl. Herpetol.*, 31, 91–100, 2017.
69. Costa, J. O., Petric, C. B., Hamaguchi, A., Homsı-Brandeburgo, M. I., Oliveira, C. Z., Soares, A. M., Oliveira, F., "Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom", *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 13, 640–654, 2007.
70. Cintra, A. C. O., De Toni, L. G. B., Sartim, M. A., Franco, J. J., Caetano, R. C., Murakami, M. T., Sampaio, S. V., "Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity", *Toxicon.*, 60, 70–82, 2012.
71. Carone, S. E. I. *vd.*, "BjSP, a novel serine protease from *Bothrops jararaca* snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 357, 50–61, 2018.

EKLER

EK-1 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

EK-2 Deneylerde kullanılan alet ve gereçler



EK-1 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal adı	Marka	Katalog No
1,10-fenantrolin	Fluka	131377
Akrilamit/bis-Akrilamit (%40) çözeltisi	Sigma-Aldrich	A7168
Amonyum persülfat (APS)	AppliChem	A2941
Amonyum sülfat	Merck	1012171000
Aprotinin, sığır akciğerinden	Sigma-Aldrich	A1153
Asetik asit (glacial), %100	Merck-Millipore	1000632511
Asetonitril (ACN)	Merck	100030
Bradford reaktifi	Sigma	B6916
Coomassie Parlak Mavisi G-250	Amresco	615
Çinko klorür (ZnCl ₂)	Sigma-Aldrich	31650
Ditiotreitol (DTT), indirgeme ajanı, 2M	Fermentas	R0891
EDTA disodyum salt dihidrat, %99+	Sigma	E5134
Etanol (%96)	Tekkim	
Fenilmetilsülfonil florür (PMSF)	Thermo Scientific	36978
Fibrinojen, insan plazmasından	Sigma-Aldrich	F3879
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) tableti	Sigma	P4417
Glisin	Isolab	9270331000

EK-1 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler (Devam)

Kimyasal adı	Marka	Katalog No
Hidroklorik asit (%32)	Merck	100319
İyodoasetamid	Sigma	I6125
İzopropanol (%99,5)	Isolab	961.023.2500
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich	C1016
Metanol	Merck-Millipore	1060072500
Moleküler belirteç/ Precision plus protein unstained	Bio-Rad	1610363
Orto-fosforik asit (%85)	Merck	1005732500
Sığır serum albümini (BSA)	Thermo Scientific Pierce	23209
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma	L3771
Sodyum klorür (NaCl)	Merck	106404
Su, Ultra saf	Sigma-Aldrich	34877
Tetrametiletildiamin (TEMED)	BioFroxx	8027ML100
Trifluoroacetic acid (TFA)	Sigma	T6508
Triton X-100	Bio-Rad	1610407
Trizma base	Sigma	T1503
Üre	Bio-Rad	1610731
Yükleme tamponu, 5X	Fermentas	R0891

EK-2 Deneylerde kullanılan alet ve gereçler

Cihaz adı	Marka/ Model	Kullanım Amacı
Buzdolabı (İki kapılı)	Arçelik	Uygun malzemelerin saklanması
Dikey elektroforez sistemi	Bio-Rad, Mini-Protean Tetra Cell	Jel elektroforezinin gerçekleştirilmesi
Elektroforez güç kaynağı	Bio-Rad, PowerPac Basic	Elektroforetik sistemlerin çalıştırılması
Etüv	Nüve FN 500	İnkübasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi
Hassas terazi (0,1 mg hassasiyetinde)	Bel Engineering, M214Ai	Örnek ve kimyasal tartılması
HPLC cihazı	Agilent 1220	Örneklerin bileşenlerine göre ayrılması
HPLC ters faz kolonu	Poroshell 120 EC-C18	Örneklerin bileşenlerine göre ayrılması
Mikropipet seti (2,20,200 ve 1000 µl)	Thermo Scientific, Finnpipette F1	Hacimde küçük örneklerin ölçülüp hazırlanması
Orbital çalkalayıcı (Orbital shaker)	Biosan, PSU-10i	Jellerin boyanması
pH metre	Hanna, HI2020-02	Çözeltilerin pH'larının ölçülmesi
Santrifüj/Vortex (Karıştırıcı)	Biosan, Combi-spin, FVL-2400N	Örneklerin karıştırılıp çözdürülmesi
Spektrofotometre (UV/VIS)	PerkinElmer, Lambda 25	Protein miktarının belirlenmesi
Tarayıcı	Canon, Pixma MG2450	Jellerin görüntülenmesi
Vorteks	Heidolph	Çözeltilerin karıştırılması
Yüksek hızlı mini santrifüj	Fisherbrand, HSA01351	Örneklerdeki kalıntıların giderilmesi