



T.C.  
**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ**

26/11/2021

Proje Bilgileri					
<b>Projenin Adı</b>	<i>Montivipera raddei</i> (Radde Dağ Engereği) Zehri Fibrinojenolitik Aktivitesinin Poliakrilamit Jel Elektroforezi ve HPLC Yöntemleri ile Belirlenmesi				
<b>Proje No</b>	ABAP20F28				
<b>Başlama Tarihi</b>	28.07.2020		<b>Bitiş Tarihi</b>	28.08.2020	
<b>Destek Miktarı (TL)</b>	8.500	<b>Gerçekleşen Miktar (TL)</b>	8.259,21	<b>Kalan Miktar (TL)</b>	240,79

Yukarıda bilgileri verilen Yürütücüsü olduğum Bilimsel Araştırma Projesine ilişkin Sonuç Raporu ekte verilmektedir.

Bilgilerinize arz ederim.

**Dr. Öğr. Üyesi Naşit İĞCİ**

Fen-Edebiyat Fakültesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

EK 1: Sonuç Raporu ve Ekleri (52 sayfa)



**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
SONUÇ RAPORU**

**PROJE BAŞLIĞI**

*Montivipera raddei* (Radde Dağ Engereği) Zehri Fibrinojenolitik Aktivitesinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve HPLC Yöntemleri ile Belirlenmesi

Determination of the Fibrinolytic Activity of *Montivipera raddei* (Radde's Mountain Viper) Venom by Polyacrylamide Gel Electrophoresis and HPLC Methods

**Proje No:**

ABAP20F28

**Proje Yürütücüsü:**

Naşit İĞCİ

Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

**Araştırmacılar:**

Fikriye ATASOY

Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Kasım 2021

NEVŞEHİR



## ÖN SÖZ (TEŞEKKÜR)

ABAP20F28 numaralı proje ile çalışmaya maddi kaynak sağlayan Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne,

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

Proje araştırmacısı Fikriye ATASOY'u 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı çerçevesinde destekleyen TÜBİTAK BİDEB'e,

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

TEŞEKKÜR EDERİZ.

Naşit İĞCİ, Fikriye ATASOY  
Kasım 2021, NEVŞEHİR

## İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ (TEŞEKKÜR).....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Amaç ve Kapsam .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Hemostaz.....	2
2.1.1 Birincil hemostaz .....	2
2.1.2 İkincil hemostaz .....	2
2.2 Fibrinojen .....	3
2.3 Yılan Zehirleri ve İçerikleri .....	3
2.3.1 Viperidae (Engerekgiller).....	4
2.3.2 Fibrinojenolitik sisteme etki eden zehir proteinleri .....	4
2.4 Türkiye'deki Yılanlar .....	6
2.5 <i>Montivipera raddei</i> (Boettger, 1890) .....	6
2.5.1 Sistematik .....	6
2.5.2 Coğrafi dağılışı ve ekoloji .....	6
2.5.3 Morfoloji .....	6
2.6 <i>Montivipera raddei</i> Zehri ile İlgili Yapılan Çalışmalar .....	7
2.7 Yılan Zehirlenmeleri .....	8
2.8 Tanı ve Tedavi Alanında Yılan Zehirleri.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	10
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	10
Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler .....	10
3.2 Kullanılan Alet ve Gereçler .....	12
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan alet ve gereçler .....	12
3.3 Zehir Sağıımı ve Saklanması .....	13
3.4 Protein Miktar Tayini .....	13
3.5 Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi .....	13
3.5.1 Standart SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi .....	14
3.5.2 Fibrinojen zimogram SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi.....	14

3.5.3	Proteaz inhibitörlerinin zehirdeki fibrinojenolitik enzimler üzerindeki etkisinin belirlenmesi.....	15
3.6	HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) .....	16
4.	BULGULAR.....	19
4.1	Protein Miktar Tayini .....	19
4.2	Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	19
4.2.1	Standart SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi .....	20
4.2.2	Fibrinojen zimogram SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitesinin belirlenmesi.....	21
4.2.3	Proteaz inhibitörlerinin zehirdeki fibrinojenolitik enzimler üzerindeki etkisinin belirlenmesi.....	23
4.3	HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) .....	25
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ .....	34
6.	ÖNERİLER.....	38
7.	KAYNAKLAR.....	39
8.	EKLER .....	43

## ÖZET

Engerek zehirlerinde bulunan fibrinolitik enzimler kan sulandırma (antikoagulan) 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 dahil bir engerek olup zehri üzerinde daha önce genel proteomik çalışmalar yapılmıştır. *M. raddei* zehri fibrinolitik enzimlerinin aktivitesi SDS-PAGE, zimogram SDS-PAGE ve HPLC yöntemleriyle ilk kez bu çalışmayla ortaya çıkarılmıştır. Zehir fibrinogenin  $\alpha$  zincirini parçalamıştır. Zehrin protein ailesini belirlemek için EDTA, aprotinin, 1,10-fenantrolin ve PMSF proteaz inhibitörleri kullanılmıştır. Zehir aktivasyonu, EDTA ve 1,10-fenantrolin tarafından baskılanmıştır. Bu bulgular, *M. raddei* zehrinin fibrinolitik aktiviteye sahip metalloproteazlar içerdiğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler: Fibrinogen, HPLC, SDS-PAGE, zimogram jel, engerek, venom**

## ABSTRACT

Fibrinolytic 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 viper belonging to the Viperidae family and general proteomic studies have been performed on its venom before. The activity of *M. raddei* venom fibrinolytic enzymes was revealed for the first time in this project by SDS-PAGE, zymogram SDS-PAGE and HPLC methods. The venom cleaved the  $\alpha$  chain of fibrinogen. EDTA, aprotinin, 1,10-phenanthroline and PMSF protease inhibitors were used to determine the protein family of venom. Venom activation was inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline. These findings indicate that *M. raddei* venom contains metalloproteases with fibrinolytic activity.

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



# 1. GİRİŞ

## 1.1 Amaç ve Kapsam

Pıhtılaşma (tromboz) sonucu kalp krizi (miyokardiyal infarksiyon), felç, iskemik şok ve derin ven trombozu gibi hastalıklar sonucu dünyada dört kişiden biri hayatını kaybetmektedir. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan çeşitli kan sulandırıcı (antikoagölan) ilaçlar mevcuttur (1).

Klinikte güncel olarak kullanılan ilaçlarının bir kısmı yılan zehirleri veya onların rekombinant üretimlerinden oluşturulmaktadır. Özellikle Viperidae (engerek) zehirlerindeki fibrinolitik enzimler -metalloproteaz, serin proteaz ve trombin-benzeri enzimler- kan plazmasındaki fibrinojen seviyesini dolaylı yoldan normalin altında tutarak kan pıhtı oluşumu önleyerek kalp krizi ve derin ven trombozu riskini en aza indirme potansiyelleri mevcuttur (2–6).

Bu proje çalışması ile Türkiye sınırlarında yaşayan bir engerek türü olan *Montivipera raddei* engerek yılanında bulunması muhtemel fibrinolitik enzimlerin varlığı ve aktivitesi SDS-PAGE, zimogram SDS-PAGE ve HPLC yöntemleriyle ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca proteaz inhibitörleri kullanılarak zehrin metalloproteaz protein ailesine dahil olduğu ortaya koyulmuştur.

## 2. 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 (5,7,8).

#### 2.1.1 Birincil hemostaz

Damardaki endotel tabakasının hasarı sonucu açığa çıkan subendotelial tabaka ile kanın temasıyla hemostaz başlatılır. Plateletlerin subendotelial tabakadaki kolajenlere ve buradan salgılanan von Willebrand faktöre bağlanmasıyla aktivasyonu gerçekleşir (5,9). 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.

Plateletlerin birbirlerine ve endotele yapışmasıyla plateletler kümeleşir ve nihayetinde platelet tıkaçı oluşur. Ayrıca plateletler bölgeye daha fazla platelet çağırmak için ADP ve tromboksan A<sub>2</sub>'yi salgılar. Bu sayede platelet tıkaçının oluşumu ve yayılımı hız kazanır (7,9,10).

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 VIIIa, kalsiyum ve fosfolipit yardımı ile faktör X'i aktifleştirir. 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 (8).

#### 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 dahil olmasıyla sağlam bir pıhtı oluşur (11,12).

## 2.2 Fibrinojen

Fibrinojen  $\alpha$ - helikal sarmal-bobin yapılı ipliksi (fibröz) bir glikoproteindir. 340 kDa'luk ağırlığa sahip olup 2-5 nm çapında ve 45 nm uzunluğundadır (12,13). 4. insan kromozomunda birbiriyle bağlantılı bulunan FGA, FGB ve FGG genlerinin ifade edilmesiyle  $A\alpha$ ,  $B\beta$  ve  $\gamma$  polipeptit zincirlerinden meydana gelir (post-translasyonel modifikasyona uğramadan önceki moleküler ağırlıkları sırasıyla 66,500; 52,000 ve 46,500'dür) (12,14,15).

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  $\gamma$  zincirden peptit bölemez (12). Fibrinopeptitlerin ayrılmasıyla oluşan fibrin monomerlerinin N-terminal sekansları değişip orada yumrular (knob A ve knob B) meydana gelir. Bu yumrular bir başka fibrin monomerinin  $\gamma$ -nodülünde ve  $\beta$ -nodülünde bulunan çukurlar (hole a ve hole b) ile anahtar-kilit uyumu gibi birbirini tamamlar. Bu kuvvetli bağlara "A-a knob-hole" ve "B-b knob-hole" etkileşimi adı verilir. Bu etkileşimlerin daha fazla sayıda fibrin monomeri arasında cereyan etmesiyle sonucunda fibrin polimerleri oluşturmaktadır (12,16). Faktör XIIIa, en son oluşan fibrin polimerleri arasında çaprak 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).

## 2.3 Yılan Zehirleri ve İçerikleri

Dünyada 3,921 adet yılan bulunmaktadır (17). Yılanların yaklaşık 600 türünün zehirli olduğu tespit edilmiştir (5,18). Zehirli yılanlar Elapidae (Mercan yılanları ve kobralar), Viperidae (Engerekgiller), Colubridae (Kırbaç yılanları), Hydrophiidae (Deniz yılanları) ve Atractaspididae olmak üzere beş ailede incelenir (5,18). 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 etkindir. Yılanlar kendilerini savunmak, avı hareketsiz kılmak veya öldürmek ve ön sindirim yapmak amacıyla zehir zerk etmektedirler (18,26).

### 2.3.1 Viperidae (Engerekgiller)

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 A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), metalloproteaz (SVMP), serin proteaz (SVSP), hyaluronidaz ve L-amino asit oksidazlardır. Enzimatik aktivite göstermeyen protein ailelerinde ise Kunitz-tipi proteinaz inhibitörleri, C-tipi lektin proteinleri (CLP), 5'-nükleotidaz, disintegrinler, miyotoksinler, vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF-F), sinir büyüme faktörleri (NGF), bradikinin-güçlendirici peptitler (BPP), sisteince-zengin salgı proteini (CRISP) ve natriüretik peptitler bulunur (26,28–30).

### 2.3.2 Fibrinolitik sisteme etki eden zehir proteinleri

Viperidae, Crotalidae ve Elapidae ailesine mensup yılanların zehirleri hemostatik sistem ile etkileşim halinde olan fibrinolitik enzimlere sahiptir. Kan pıhtılaşmasını etkileyen çoğu enzimlerin serin proteaz ve metalloproteaz ailesine dahil olduğu ortaya çıkmıştır (2,5,31,32).

Yılan zehrindeki toksinlerin avın kan dolaşımında dağılabilmesi için bir tıkanıklık olmaması gerekmektedir ve dolaşımın yeterince açık olması gerekmektedir. Yılan zehri fibrinolitik enzimleri, kan plazmasındaki fibrinojen miktarını azaltarak bu durumu kolaylaştırmaktadır. Enzimlerin bu özellikleri bazı bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. İlk olarak 19. yüzyıla yaklaşırken Fontana, yılan zehrinden ölen bir canlının kanının hala akışkan olduğunu gözlemlemiştir. 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 (32).

Fibrinolitikler aktivasyonları için herhangi bir faktöre gereksinim duymaz, doğrudan fibrinojen üzerinde etki gösterirler. Fibrinolitik enzimler, fibrinolitikteki farklı amino asit sekanslarını bölmeleri ve çalışma mekanizmalarındaki ayrımlar nedeniyle serin proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere iki protein ailesi içerisinde incelenmektedir (32).

#### 2.3.2.1 Serin proteazlar

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

Serin proteaz ailesine dahil olup fibrinojenolitik aktivitesini trombine benzer şekilde gösteren enzimlere trombin-benzeri enzimler (SVTLE) denir (33). 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 (4,32,34). SVTLE'lerin etkinliği prokoagülant olarak görülmesine rağmen SVTLE'ler in vivo ortamda fibrinojeni fibrine dönüştürerek fibrinojen sayısını azaltmaktadırlar. Plazmadaki fibrinojenin sayısı azalınca (defibrinojenasyon) pıhtılaşma süresi uzamaktadır. Ayrıca SVTLE'ler trombin gibi Faktör XIII'i aktifleştiremediğinden dolayı fibrinler arası çapraz bağlar oluşmaz. Böylece sağlam yapılı olmayan fibrinler, fibrinolitik sistem tarafından kan dolaşımından kolayca atılırlar. SVTLE'lerin bu antikoagülant özelliğinden dolayı pıhtılaşmaya meyilli kişilerde yılan zehri türevlerinden elde edilen bazı kan sulandırıcı (antikoagülant) ilaçlar kullanılmaktadır (2).

Trombin-benzeri enzimlerin büyük kısmı, trombini 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 (4,29).

### 2.3.2.2 Metalloproteazlar

Viperidae ve Crotalidae ailesine mensup yılan zehirlerinde bolca rastlanan, hemostazda etkili proteinlerdir. Viperidae zehrindeki proteinlerin %11-65'ini metalloproteazlar oluşturmaktadır. Elapidae ailesi yılanları da metalloproteazlar içermekle birlikte miktarları diğer Viperidae ailesine kıyasla fazla değildir. Yılan zehri metalloproteazların (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 moleküler kütle ve domain yapılarına göre dört farklı sınıfta incelenirler (2,35).

P-I sınıfı SVMP'ler küçük boyutludur. Moleküler ağırlıkları 20-30 kDa'dur. Bir pro domain ve bir proteinaz domaine sahiptirler. P-II sınıfı SVMP'ler orta boyutludur. Moleküler ağırlıkları 30-60 kDa'dur. Bir pro domain, bir proteinaz domain ve bir disintegrin domaine 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 domaine sahiptirler. P-IV sınıfı, P-III sınıfındakilere ek olarak bir lektin-benzeri domain içerir (2).

Fibrinojenolitik aktiviteye sahip SVMP'ler genellikle fibrinojenin  $\alpha$  zincirine (bazen düşük aktivite ile  $\beta$  zincirine de) etki etmekle birlikte bazılarının önceliği  $\beta$  zincire karşı olabilmektedir (32). Metalloproteazların aktivitesi, EDTA ve 1,10-fenantrolin gibi inhibitörler etkisiyle baskılanır (2,36).

## 2.4 Türkiye'deki Yılanlar

Türkiye'de farklı bölgelerde yaşayan en az 13 tür Viperid yılan (engerek) bulunmaktadır ve bir kobra türü sadece Şanlıurfa civarından bilinmektedir; ayrıca "yarı-zehirli" olarak ele alınan bazı türler de bulunmaktadır (27,37) (38) (39). Bazı türlerin sistematik durumları ile ilgili de çalışmalar devam etmektedir.

## 2.5 *Montivipera raddei* (Boettger, 1890)

### 2.5.1 Sistematik

*Montivipera raddei* (Radde Dağ Engereği) Viperidae ailesine dahil, ülkemizde de dağılışı gösteren zehirli bir yılan (engerek) türüdür. *M. raddei raddei* alt türü ülkemiz sınırları içerisinde yaşamaktadır (40).

### 2.5.2 Coğrafi dağılışı ve ekoloji

Ermenistan, Azerbaycan, İran, Irak ve ülkemizde Ağrı, Iğdır, Kars, Van ve Hakkari'de yayılışı göstermektedir. 1000-2000 metre yükseltideki çalılık, kayalık alanlar ve ormanlarda yaşamaktadır (40). 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 (26,41). Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında aktiftirler (41). Ovovivipar bir hayvandır, yani dişi vücudu içerisinde yumurtalar gelişir ve üç ila dokuz yavru doğurur. Zehri insan için tehlikeli olabilir (27)

### 2.5.3 Morfoloji

Vücut uzunlukları 100 cm'ye ulaşabilmektedir (27,40). İnce bir boyna sahiptir ve baş kısmı gözle görülür biçimde üçgendir. Başın yanında siyaha çalan renkte temporal bantlar bulunmaktadır. Başın üst kısmı küçük ve karıncalı pullar ile örtülüdür. Gözlerinin üzerinde kenarları köşeli olan bombeli plaklar 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 lekeli (27).

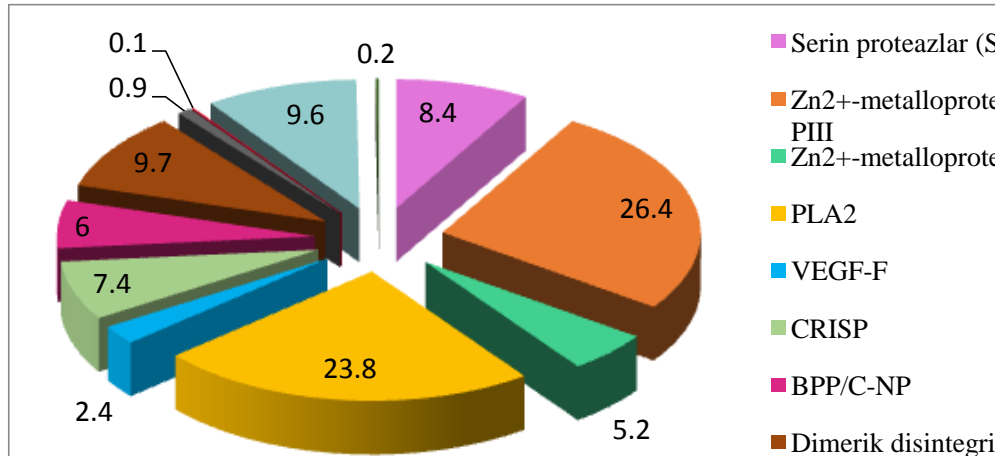


**Resim 2.1.** *M. raddei* türü ergin altı birey (Yer: Kağızman/Kars, Fotoğraf: Naşit İĞÇİ)

## 2.6 *Montivipera raddei* Zehri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Daha önce gerçekleştirilen iki farklı proteomik çalışmada (26,28) protein ailesi bazında yapılan genel karakterizasyon yapılmıştır.

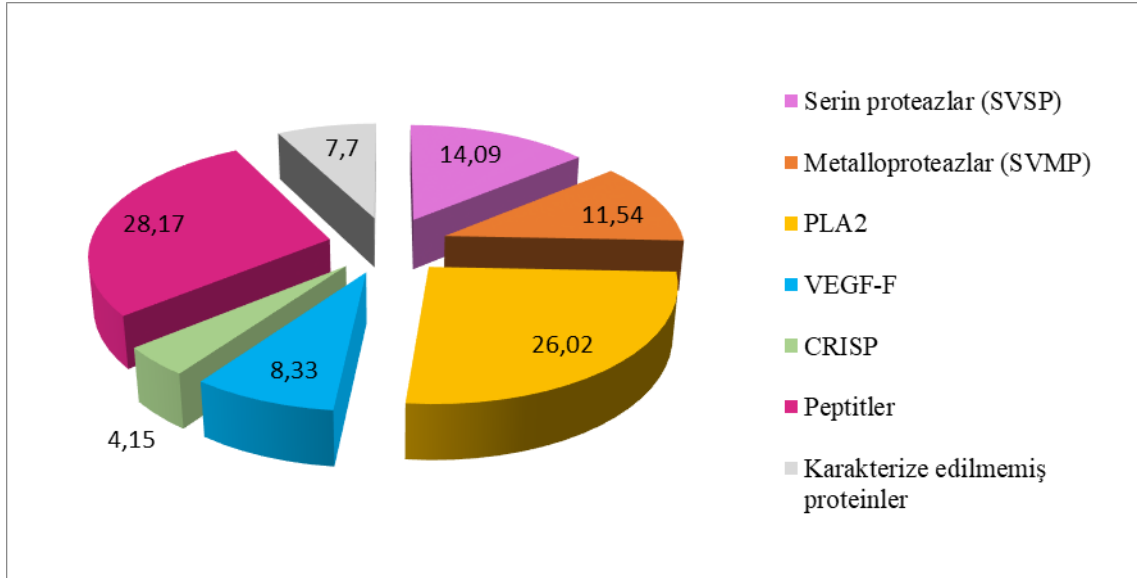
Sanz ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre *M. raddei* zehrinde serin proteazlar (SVSP), Zn<sup>2+</sup>-bağımlı metalloproteazlar (SVMP), fosfolipaz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), L-amino asit oksidazlar (LAO), C-tipi lektin-benzeri proteinler (CLP), Kunitz-tipi serin proteaz inhibitörleri, vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF-F)-benzeri moleküller, dimerik disintegrin, sisteince-zengin salgı proteinleri (CRISP), DC-fragmentleri ve bradikinin-güçlendirici/C-natriüretik peptitler bulunmaktadır (BPP/C-NP). (Şekil 2.2.) (26). Metalloproteazların toplam proteine oranı %37,49'dur.



**Şekil 2.1.** *M. raddei* zehir proteinleri ve peptitleri yüzdesi (%) Kaynak: (26)

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 metalloproteazların toplam proteine oranı %16,07'dir. Veriler incelendiğinde *M. raddei* zehir içeriğinde metalloproteazların 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).



**Şekil 2.2.** *M. raddei* zehir proteinleri ve peptitleri yüzdesi (%) Kaynak: (28)

*M. raddei* zehri hemotoksik özelliktedir ve yapılan bir deneyde tavşanlardaki organlarda histopatolojik etkilere neden olduğu saptamıştır (42).

## 2.7 Yılan Zehirlenmeleri

Her yıl ortalama 5,4 milyon yılan ısırığı vakasından 2,7 milyonu zehirlenme ile sonuçlanmaktadır. Zehirlenen insanların yaklaşık 81000 ila 138000'i hayatını kaybetmektedir. Hayatta kalan 400000 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 (43).

Her zehirli yılanın ısırığı, zehirlenmeye sebep olmamaktadır. Isırık vakalarının %25'inden fazlasının 'kuru' ısırık olduğu düşünülmektedir (18).



## 2.8 Tanı ve Tedavi Alanında Yılan Zehirleri

Kan pıhtılaşması sonucu meydana gelen felç, derin ven trombozu, serebral ve miyokard infarktüs hastalıklarını tedavi etme amacıyla yılan zehirlerinde bulunan fibrinolitik enzimlerden faydalanılmaktadır. *Bothrops atrox* zehrindeki trombin-benzeri serin proteazlardan elde edilen Batroxobin, piyasada Reptilase ismiyle satışa sunulmaktadır. Heparin içeren kan örneklerindeki fibrinogen seviyesini ölçmek amacıyla kullanılmaktadır. Russell engerek zehri- faktör X aktivatörü (RVV-X), *Daboia russelli* zehrinden elde edilen bir enzimdir ve lupus antikoagülant miktarını ölçmek için kullanılmaktadır (2).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu proje çalışması Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Proteomiks ve Hayvan Zehirleri Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Zehir örnekleri daha önce Dr. Öğr. Üyesi Naşit İGÇİ tarafından Kağızman/Kars'tan toplanan bireylerden elde edilmiştir.

#### 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyde kullanılan kimyasal maddelerin listesi Tablo 3.1'de yer almaktadır. Tüm materyaller moleküler biyoloji çalışmalarında kullanıma uygundur.

**Tablo 3.1.** Deneyleerde 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 Brilliant Blue G-250	Amresco	615
Çinko klorür (ZnCl <sub>2</sub> )	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
Hidroklorik asit (%32)	Merck	100319
İyodoasetamid	Sigma	I6125
İzopropanol (%99.5)	Isolab	961.023.2500
Kalsiyum klorür (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich	C1016
Marker/ Precision plus protein unstained	Bio-Rad	1610363
Metanol	Merck-Millipore	1060072500
Orto-fosforik asit (%85)	Merck	1005732500
Siğır serum albümini (BSA)	Thermo Scientific Pierce	23209
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma	L3771
Sodyum klorür (NaCl)	Merck	106404
Su, HPLC Plus	Sigma-Aldrich	34877
Tetrametiletilediamin (TEMED)	BioFroxx	8027ML100
Trifluoroacetic acid (TFA)	Sigma	T6508
Triton X-100	Bio-Rad	1610407
Trizma base	Sigma	T1503

### 3.2 Kullanılan Alet ve Gereçler

Deneyde kullanılan alet ve gereçlerin listesi Tablo 3.2'de yer almaktadır. Tüm alet ve gereçler kullanım kılavuzu takip edilerek titizlikle kullanılmıştır.

**Tablo 3.2.** Deneylerde kullanılan alet ve gereçler

Cihaz adı	Marka/ Model	Kullanım Amacı
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

### 3.3 Zehir Sağımı ve Saklanması

Bu alışmada, Dr. Öğr. Üyesi Naşıt İĞCİ tarafından daha önceki çalışmaları kapsamında Aydınkavak-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 5 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 kurutuma yöntemi) yoluyla zehirler kuru toz haline getirilmiş ve muhafazası -20°C dondurucuda devam etmiştir. Zehir bileşiminin tür içi bireysel farklılıklarının azaltılması amacıyla kuru zehir örnekleri ile 5 mg'lık bir havuz oluşturulmuştur (44). Ardından 100 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) tamponu ile özdürölüp 5 mg/ml derişimde stok zehir çözelti hazırlanmıştır.

### 3.4 Protein Miktar Tayini

Zehirdeki proteinlerin miktarının belirlenmesi için Bradford yöntemi tercih edilmiştir (45). 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 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 ölçölüp OD değerlerinin ortalamaları baz alınarak standart eğri grafiği oluşturulmuştur.

### 3.5 Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Çalışmada zehir proteinlerinin fibrinojenolitik aktivitesinin belirlenmesinde kullanılacak olan SDS-PAGE yöntemleri için Bio-Rad marka Mini-Protean Tetra Cell dikey elektrofrez cihazı kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılmak üzere 5 mg/ml insan plazma fibrinojeni stok çözeltisi, 100 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) tamponu ile özdürölüp hazırlanmıştır.

*M. raddei* üzerindeki fibrinojen sindirim kinetiği, Edgar ve Prentice tarafından tarif edilen yöntemle göre değerlendirilmiştir (46).

### 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 (47).

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 mavisini (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 su banyosu yaptırılmış ve örnekler 10,000 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir. İndirgeme ve denatürasyondan sonra numuneler, jele yüklenmiştir. Marker 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)] (47), 1X'e seyreltilip eklenmiş ve güç kaynağı ilk 15 dk 80 V 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, Blue Silver fiksatif çözeltisi [%30 metanol (v/v), %2 orto-fosforik asit (v/v)] (48) ile 30 dk muamele edilmiş ve ardından %0.12'lik Coomassie Brilliant Blue 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 jelin görüntüsü elde edilmiştir.

### 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 (47).

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

$\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerini hidrolize eden metalloproteazlara sahip *M. lebetina* zehri tercih edilmiştir (49,50). 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) marker 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  $\mu$ g, *M. lebetina* için 12,29  $\mu$ g'dır.

10X Tris-Glisin SDS koşturma tamponu [0,25 M Trizma base, 1,92 M Glisin ve %1 SDS (w/v)] (47), 1X'e seyreltilip elektroforez tankına ilave edilmiştir. Tankın etrafı buz aküleriyle çevrelenmiş ve ilk 15 dk 80 V daha sonra 1 sa 120 V'de proteinler koşturulmuştur. Proteinler koşturulduktan sonra jel, bir kabin içine alınıp üzerine washing buffer (%2,5 Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) ilavesiyle 80 rpm hızdaki çalkayıcıda 2 x 30 dk yıkanmıştır (51). 37°C'lik etüv içindeki jel, çalkalayıcıda ilk 10 dk incubation buffer (%1 Triton X-100, 50 mM Tris HCl pH 7.5, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) ile karıştırıldıktan sonra incubation buffer değiştirilerek tazesini eklenmiş ve 20 sa inkübasyon yapılmıştır (51).

Staining buffer [%40 metanol, %10 asetik asit, %0,05 Coomassie Brilliant Blue G-250 w/v] kullanılmadan önce manyetik karıştırıcıda balıkla karıştırılmıştır. Distile su ile 2 x 5 dk çalkalayıcıda yıkanan jel, staining buffer ile çalkalayıcıda 1 sa boyunca boyanmıştır. Sonra tekrar distile su ile birkaç sefer yıkama yapılmıştır (51). Jel, üzerindeki fazla boya akana kadar destaining buffer (%40 metanol, %10 asetik asit) ile inkübe edilmiştir. Yaklaşık 4 sa sonunda jel görüntülenmiştir (51).

### **3.5.3 Proteaz inhibitörlerinin zehirdeki fibrinojenolitik enzimler üzerindeki etkisinin 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 (47).

*M. raddei* zehrindeki fibrinojenolitik enzimlerin hangi protein ailesine ait olduğunu tespit etmek amacıyla proteaz inhibitörlerinden yararlanılmıştır. Metalloproteaz inhibitörü olarak 100 mM EDTA ve 100 mM 1,10-fenantrolin; serin proteaz inhibitörü olarak 10 mM aprotinin ve 100 mM PMSF bileşikleri tercih edilmiştir.

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 ilavesi ile 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 örnekler 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 ajanı 1X'e seyreltilip ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Ardından örnekler 95 °C'de 5 dk su banyosu yaptırılmış ve örnekler 10,000 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir.

10X Tris-Glisin SDS koşturma tamponu [0,25 M Trizma base, 1,92 M Glisin ve %1 SDS (w/v)] (47), 1X'e seyreltilip elektroforez tankına ilave edilmiştir. Proteinler ilk 15 dk 80 V, sonra 55 dk 120 V'de koşturulmuştur. Yükleme örneğindeki M. raddei zehir protein miktarı 0.810 µg'dir.

Elektroforez sonrası 80 rpm hızındaki çalkayıcı üzerinde distile su ile jel 3 x 10 dk yıkanmıştır. Jel ile Blue Silver fiksatif çözeltisi [%30 metanol (v/v), %2 orto-fosforik asit (v/v)] 30 dk muamele edilmiştir (48). %0.12'lik Coomassie Brilliant Blue G-250 (w/v) [%10 amonyum sülfat (w/v), %10 orto-fosforik asit (v/v), %20 metanol (v/v)] ile 13 sa işlem görmüştür. Jel üzerindeki fazla boyanın giderilmesi için distile su ile birkaç defa yıkama yapıp ardından jelin görüntüsü alınmıştır.

### 3.6 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

HPLC genel olarak belli bir (yüksek) basınç altında bir maddenin içeriğini, kolonda alıkonma zamanına göre dedektörlerce algılanması sonucu grafiklerde pik şeklinde veri olarak elde edilmesi yöntemidir.

Fibrinojenin parçalanma ürünlerinin takibi kalitatif ve kantitatif 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. Kolon kullanılmadan önce mobil (hareketli) fazlar ile 15-20 dk. kadar temizlenmiştir.

Fibrinojen içeren örnekler DTT ile indirgenir ancak kolonda yeniden disülfid bağları kurabileceği tahmin edildiği için DTT içeren örnekler iyodoasetamid eklenmesi uygun bulundu. İyodoasetamid bir alkilleyici ajan olup, disülfid bağlarına alkil grubu ekleyerek sistein amino asitlerinin yeniden bağ kurmasını engeller. Etkili bir analiz için iyodoasetamid final konsantrasyonu 30 mM olarak belirlendi.

Bu metod optimizasyon çalışmaları sonrası oluşturulan HPLC deneyinin metodunu içermektedir. Kullanılan malzemeler Tablo 3.1.'de verilmiştir.



**Tablo 3.1.** HPLC deneyi için kullanılan kimyasalların miktarları ve son derişimleri

Materyaller	Kullanılan hacim	Son derişim
<b>İntact FIB60 örneği için:</b>		
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)	
<b>FIB5, FIB10 ve FIB60 örnekleri için:</b>		
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)	
<b>FV5, FV10 ve FV60 örnekleri için:</b>		
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)	

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 çözdürölüp 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 (60 µl) ve fibrinojen ile *M. raddei* zehri (60 µl) bulunduran örnek tüpleri hazırlanmıştır (Sadece intact FIB60 örneğinin hacmi 70,5 µl'dir). 37 °C'lik etüvde FIB5 ile FV5 örnekleri 5 dk; FIB10 ile FV10 örnekleri 10 dk ve intact FIB60, FIB60 ile FV60 örnekleri 60 dk boyunca inkübe edilmiştir. İntact 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'lik başka bir etüvde 2 sa inkübe edilmişlerdir.

Etüvden çıkarılan tüpler yaklaşık 5 dk kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında intact FIB60 örneği hariç diğer örneklere IAA eklenip vorteks yapılmış ve tüpün etrafı folyo ile sarılmıştır. Tüm örnekler oda sıcaklığındaki karanlık bir ortamda 30 dk bekletildi.

Tüm tüpler 12.500 rpm hızında 5 dk santrifüj edilmiştir. Tüpteki örnekler insert içeren viyalere 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 solventi) ve %0.1 TFA içeren HPLC plus su (A solventi) kullanılarak gradiyent akış tercih edilmiştir (Tablo 3.2.). Kromatografi işlemi 12 dk ile sınırlandırılmıştır.

**Tablo 3.2.** Gradyent akışı içeren HPLC metodu (A: HPLC plus su, B: Asetonitril)

Zaman (dk)	A (%)	B (%)	Akış (ml/dk)	Maksimum Basınç Limiti (bar)
0.00	95.0	5.0	0.500	600.00
1.00	95.0	5.0	0.500	600.00
8.00	80.0	20.0	0.500	600.00
10.00	20.0	80.0	0.500	600.00
12.00	95.0	5.0	0.500	600.00

## 4. BULGULAR

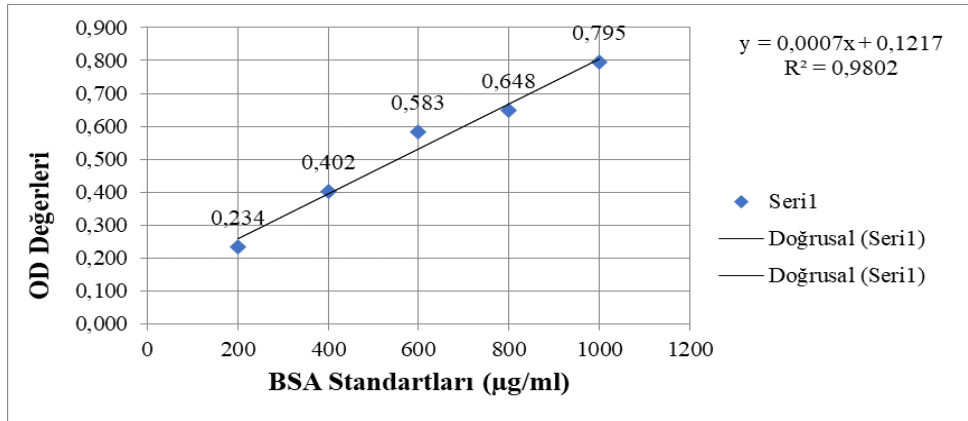
### 4.1 Protein Miktar Tayini

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  $y = 0,0007x + 0,1217$  denkleminde  $y$  yerine *M. raddei* zehir örneğinin ortalama OD değerinin yazılmasıyla  $x$  değeri yani protein miktarı bulunmuştur (Şekil 4.1.). Buna göre *M. raddei* zehrindeki protein miktarı 540,43  $\mu\text{g}$  olarak saptanmıştır.

Aynı deney *M. lebetina* zehri ile tekrarlanmıştır. *M. lebetina* zehrinde 491,75  $\mu\text{g}$  protein bulunmuştur.

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

	BSA standart derişimleri ( $\mu\text{g/ml}$ )					Zehir derişimi ( $\mu\text{g/ml}$ )
	200	400	600	800	1000	?
<b>1. tekrar</b>	0,227	0,385	0,553	0,697	0,818	0,505
<b>2. tekrar</b>	0,240	0,419	0,612	0,599	0,771	0,494
<b>3. tekrar</b>	0,244	0,432	0,596	0,684	0,806	0,543
<b>Ortalama</b>	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

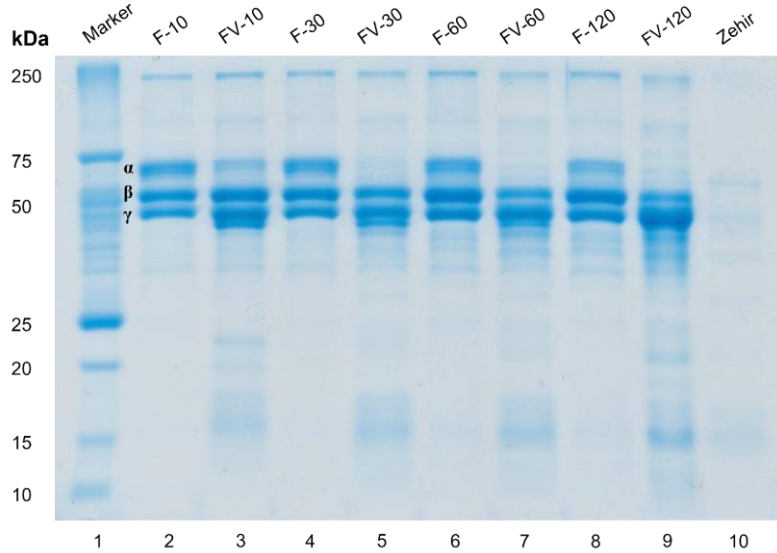
Tüm SDS-PAGE deneylerinden elde edilen jel görüntüleri, ilgili alt başlıklar içinde değerlendirilmiştir. Jel görüntülerindeki bantların yoğunlukları Gel Analyzer isimli program vasıtasıyla ortaya çıkarılmıştır.

#### 4.2.1 Standart SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitenin belirlenmesi

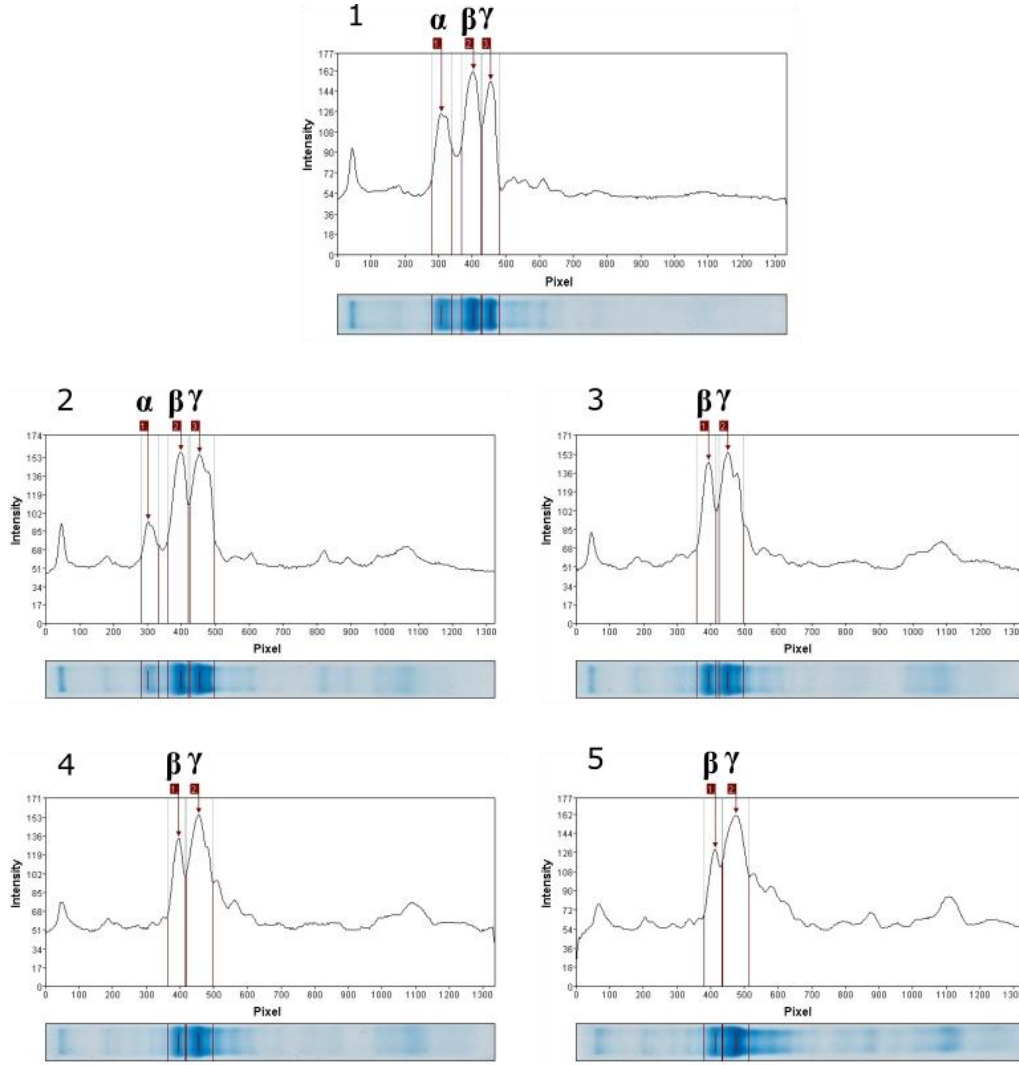
Fibrinojen ve zehir inkübasyonunun karşılaştırılması ve dolayısıyla fibrinojen zincirlerindeki değişiklikleri gözlemlemek için tek başına fibrinojen içeren F-10, F-30, F-60 ve F-120 örnekleri kullanılmıştır. FV-10, FV-30, FV-60 ve FV-120 isimleri fibrinojen ile zehir içeren örnekleri ifade etmektedir. Sayılar dakikaları ifade etmektedir (Şekil 4.2.).

Zehrin fibrinojenin A $\alpha$  zinciri üzerindeki etkisi 10. dk'da jeldeki bantta (FV-10) hafif bir bulanıklık olarak görülmektedir. Fibrinojen ile zehir inkübasyonunun 30. dk.'sında fibrinojenin A $\alpha$  zincirinin bandının (FV-30) büyük ölçüde ortadan kalktığı fark edilmektedir. 60. ve 120. dk ise (FV-60 ve FV-120) A $\alpha$  zincirin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Buna göre zehir, fibrinojenin A $\alpha$  zincirini 60. dk'dan itibaren tamamen parçalamıştır (Şekil 4.2.). Bununla birlikte, fibrinojenin B $\beta$  zinciri ve  $\gamma$  zinciri üzerinde *M. raddei* zehrinin gözle görülür bir etkisi yoktur. Tüm bu sonuçlar ışığında *M. raddei* zehrinin  $\alpha$ -fibrinojenaz enzimleri içerdiği söylenebilir.

Şekil 4.3.'te, *M. raddei* zehrinin farklı zaman aralıklarındaki fibrinojenolitik aktivitesini gösteren jeldeki (Şekil 4.2.) bazı sütunlara ait yoğunluk grafikleri verilmiştir. Buna göre 1. grafik F-60, 2. grafik FV-10, 3. grafik FV-30, 4. grafik FV-60 ve 5. grafik FV-120 sütunlarına ait grafiklerdir. Sadece fibrinojen içeren sütuna ait grafikte (1. grafik) fibrinojenin her üç alt birimi de yoğun bir şekilde görülmektedir. 2. grafikten 5. grafiğe doğru zehir ile fibrinojenin inkübasyon süresi arttığından, fibrinojen A $\alpha$  zincirinin yoğunluğu 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

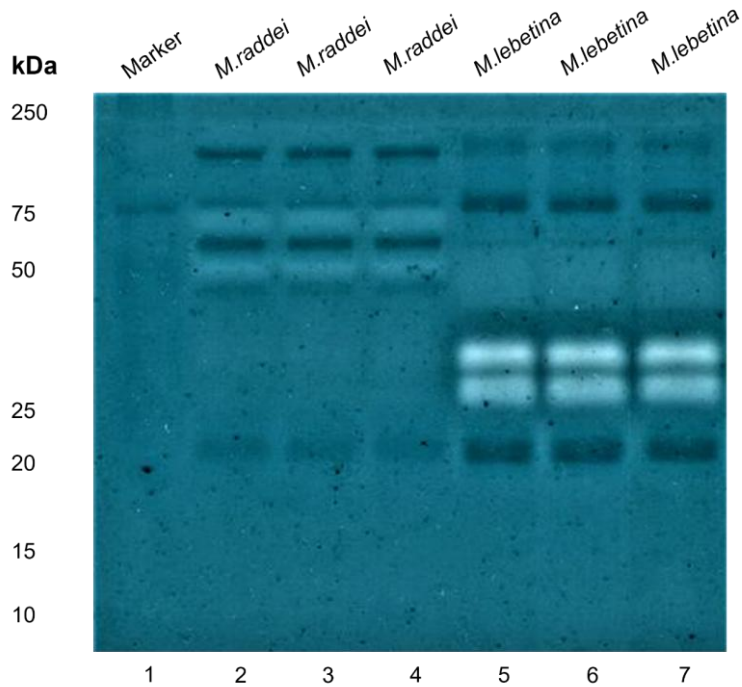
#### 4.2.2 Fibrinojen zimogram SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik aktivitesinin belirlenmesi

Fibrinojen zimografi, matriks metalloproteazlar gibi fibrinojenolitik enzimlerin aktivitesini tespit eden bir metottur. Enzimlerin aktif formunun korunması için indirgeyici ajan (DTT) kullanılmamıştır. Poliakrilamid jel içine eklenen substratın (fibrinojen), ilgili enzimlerce (fibrinojenolitik) 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 hafif bantlar oluşturulmuştur.

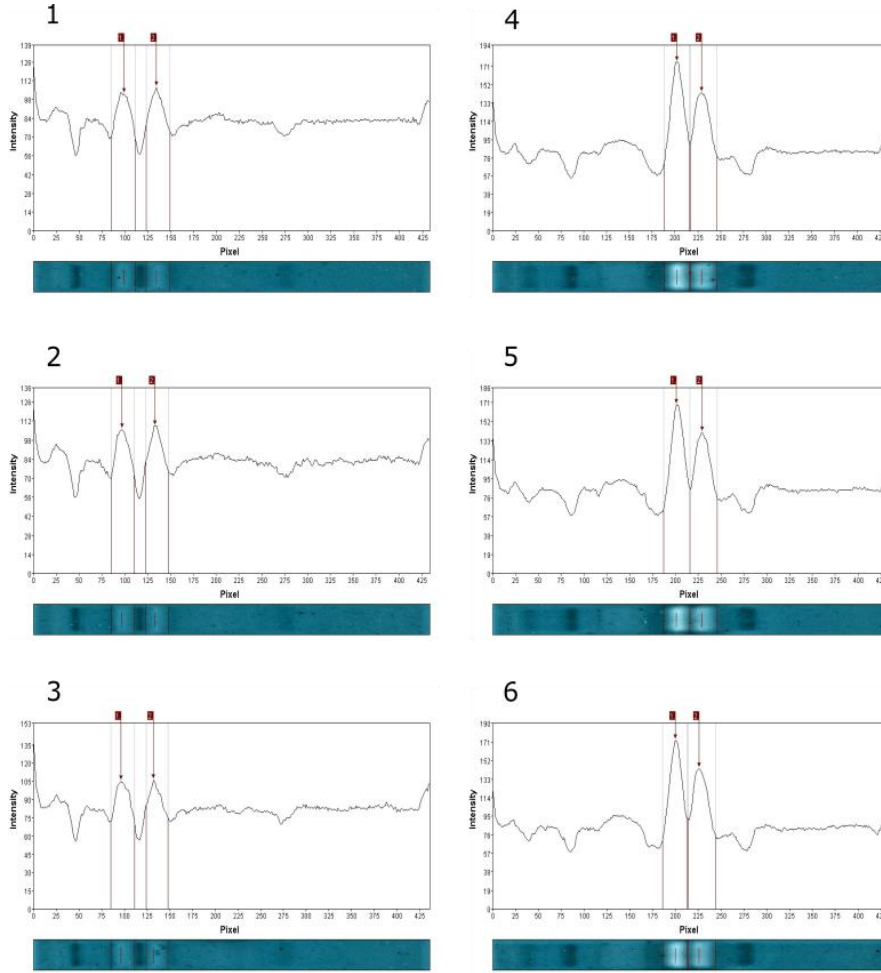
*M. raddei* ve *M. lebetina* zehir örneklerinin jel üzerindeki bant görüntüleri kıyaslandığında, farklı moleküler ağırlığa sahip fibrinojenolitik enzimlere sahip oldukları görülmektedir (Şekil 4.4.). Bu deneyde fibrinojenolitik özelliği iyi bilinen *M. lebetina* zehri karşılaştırma materyali (pozitif kontrol) olarak kullanılmıştır. *M. raddei* zehri fibrinojenolitik

enzimleri 50-75 kDa, *M. lebetina* fibrinojenolitik enzimleri ise 37-50 kDa ağırlığındadır. Dolayısıyla her iki türe ait zehirdeki fibrinojenolitik enzimlerin farklı moleküler ağırlıklara sahip olmaları, onların farklı protein ailelerine veya aynı protein ailesi içerisinde farklı sınıflara dahil olduklarına işaret etmektedir. Bazı çalışmalarda metalloproteazların fibrinojen  $\alpha$  zincirinin yanı sıra  $\beta$  zincirini de parçaladığı gösterilmiştir (52). Bu deneyde hangi zincirin parçalandığı belli olmamakta ancak genel aktivitenin varlığı doğrulanmaktadır.

*M. lebetina*'daki fibrinojenolitik enzimler substratı daha iyi parçaladığı için enzim aktiviteleri, *M. raddei* fibrinojenolitik enzimlerine göre daha fazladır. 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 1., 2. ve 3. grafiklerdeki bantların pikleri, *M. lebetina* zehir örneği içeren 4., 5. ve 6. grafikteki 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. Deneyin asıl amacının *M. raddei* zehri fibrinojenolitik aktivitesini belirlemek olduğu göz önüne alınırsa, yaklaşık 50 ve 75 kDa ağırlığındaki iki enzimde bu aktivitenin görüldüğü belirlenmiştir.



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



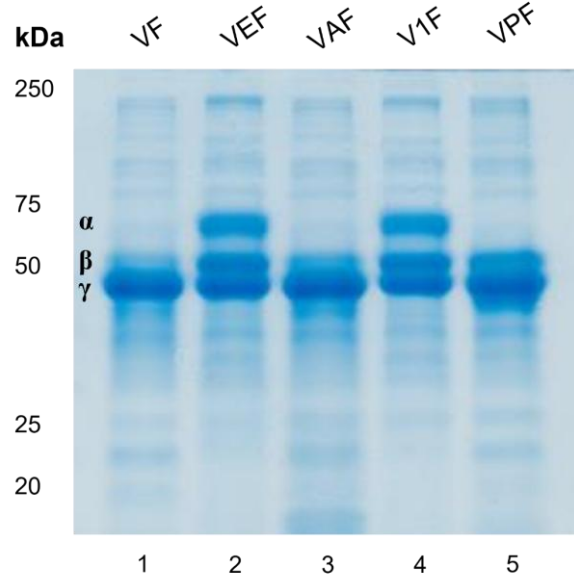
**Şekil 4.5.** *M. raddei* (1, 2 ve 3) ile *M. lebetina* (4, 5 ve 6) zehri fibrinojenolitik aktivitelerinin zimogram jel görüntüsündeki bantların yoğunluk grafikleri

#### 4.2.3 Proteaz inhibitörlerinin zehirdeki fibrinojenolitik enzimler üzerindeki etkisinin belirlenmesi

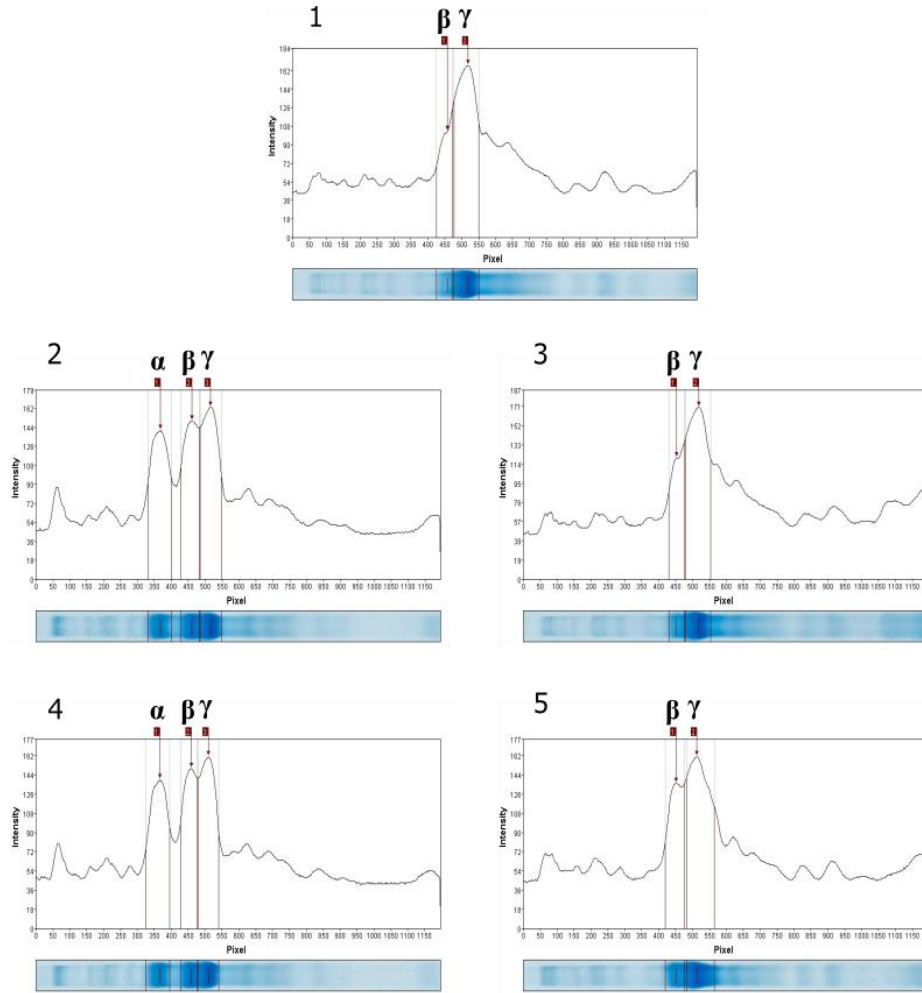
Deney sonucundaki jel görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.6.), zehir ile fibrinojen (VF); zehir, aprotinin ile fibrinojen (VAF) ve zehir, PMSF ile fibrinojen (VPF) örneklerinde fibrinojen A $\alpha$  zincirinin kaybolduğu açıkça görülmektedir. Dolayısıyla aprotinin ve PMSF'nin, *M. raddei* zehri fibrinojenolitik aktivitesini engellemediği ortaya çıkmaktadır.

Zehir, EDTA ile fibrinojen (VEF) ve zehir, 1,10-fenantrolin ile fibrinojen (V1F) örnekleri ise fibrinojen A $\alpha$  zincire etki etmemiştir. A $\alpha$  zincir diğer örneklerin aksine parçalanmadan kalmış ve jelde bant oluşturmuştur. Başka bir deyişle, burada kullanılan inhibitörler tarafından *M. raddei* zehrindeki fibrinojenolitik enzimler inhibe edilmiştir.

*M. raddei* zehrinin EDTA ve 1,10-fenantrolin metalloproteaz inhibitörleri tarafından inhibe edilmesi yani fibrinojen üzerindeki etkisinin baskılanması, zehirdeki fibrinojenolitik enzimlerin metalloproteaz ailesine ait olduğu bilgisini ortaya çıkarmaktadır.



**Şekil 4.6.** Farklı inhibitörlerin *M. raddei* zehri fibrinojenolitik enzim aktivitesi üzerinde etkisini gösteren jel görüntüsü



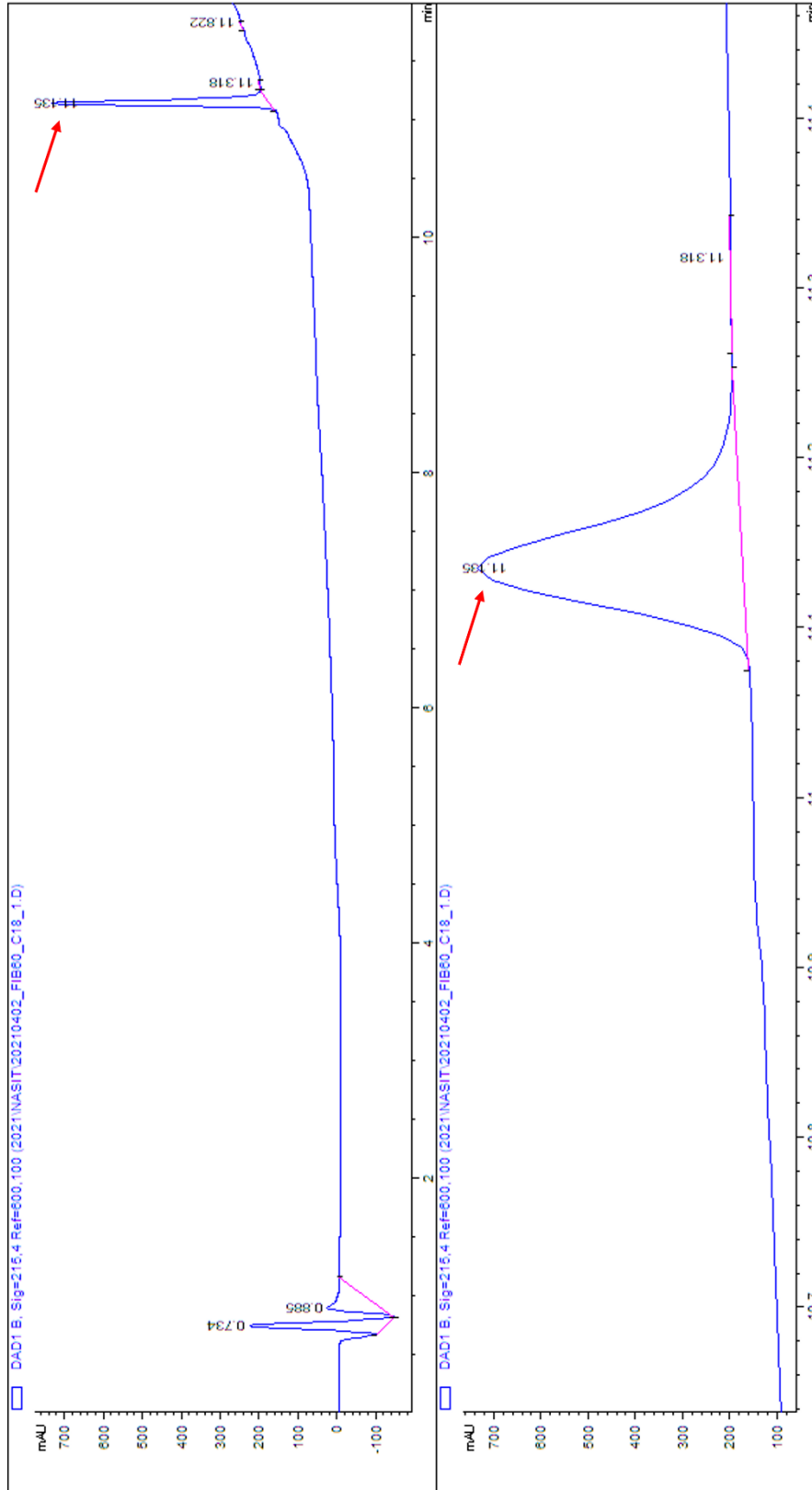
**Şekil 4.7.** Farklı inhibitörlerin *M. raddei* zehri fibrinojenolitik enzim aktivitesi üzerinde etkisini gösteren jel görüntüsüne ait yoğunluk grafikleri



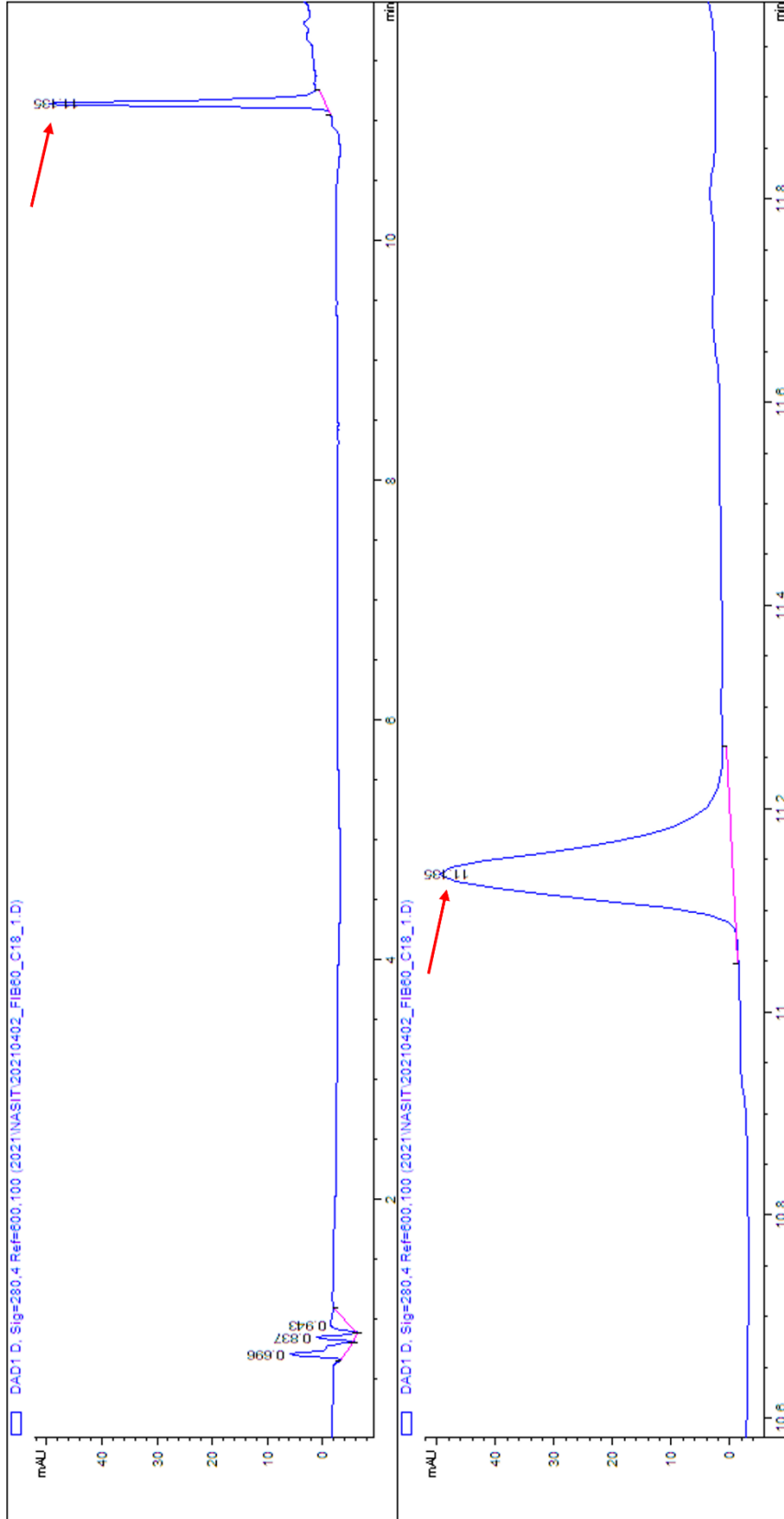
### 4.3 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

SDS-PAGE ile *M. raddei* zehrindeki fibrinojenolitik enzimlerin değerlendirilmesinin yanı sıra, HPLC yöntemi ile bulgular doğrulanmaktadır. Deney bulguları olarak peptitlerin 215 nm ve proteinlerin 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyonlarını içeren kromatogramlar kullanılmıştır.

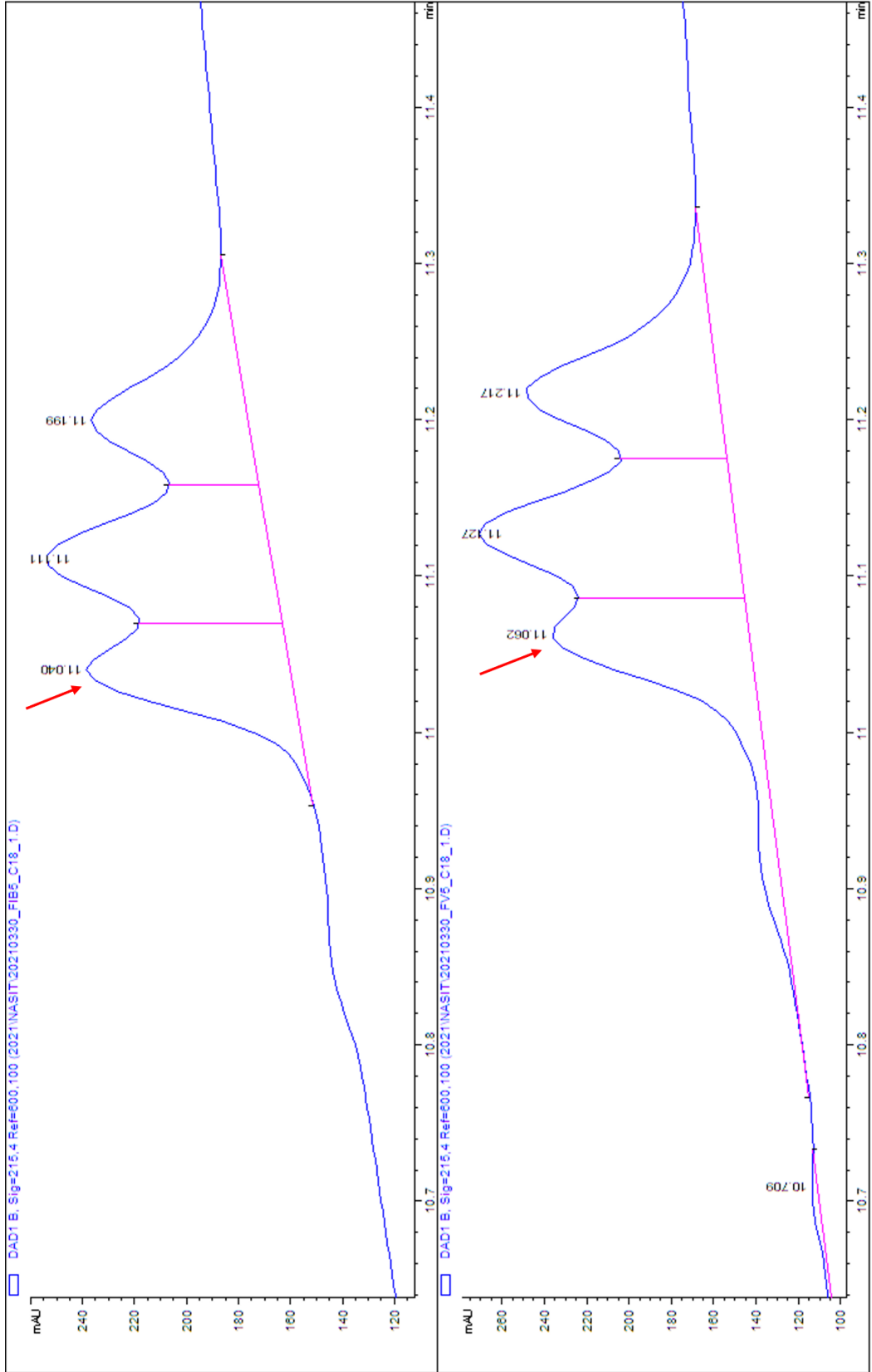
İntact FIB örneğine ait kromatogramlar Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.da gösterilmektedir. Her iki şekilde de 11.1. dakikada gelen pikler indirgenmemiş fibrinojene aittir. Dolayısıyla tek bir pik olarak görünmektedir. Şekil 4.10. ile Şekil 4.11.de yer alan FIB5 ve FV5 örnekleri; Şekil 4.12. ile Şekil 4.13.de yer alan FIB10 ve FV10 örnekleri ve Şekil 4.14. ile Şekil 4.15.de yer alan FIB60 ve FV60 örneklerine ait kromatogramlarda kırmızı ok ile belirtilen pikin fibrinojenin  $\alpha$  zincirine ait olduğu düşünülmektedir. Çünkü intact FIB örneğinin kromatogramında 11.1. dakikada ortaya çıkan tek bir pikin, bu örnekler için yine aynı dakikalarda 3 farklı pike ayrıldığı görülmektedir. Zehir ile fibrinojen örneklerin etüvdeki inkübasyon süresi arttıkça, zehirdeki fibrinojenotilik enzimlerin fibrinojen  $\alpha$  zincirlerini parçaladığı bilinmektedir. Bu parçalama zehir ile fibrinojen inkübasyonuna ait SDS-PAGE jellerinde 60. dakikada net bir şekilde görülmektedir. Aynı şekilde FIB60 ve FV60 örneklerinin kromatogramlarına (Şekil 4.14. ile Şekil 4.15.) ait kırmızı ok ile işaretli pikin alan değerlerine bakıldığında, FV60 örneğindeki alanın küçüldüğü görülmektedir. Bu bulgu, *M. raddei* zehri fibrinojenolitik enzimlerinin, fibrinojenin  $\alpha$  zincirini parçaladığını ispatlamaktadır.



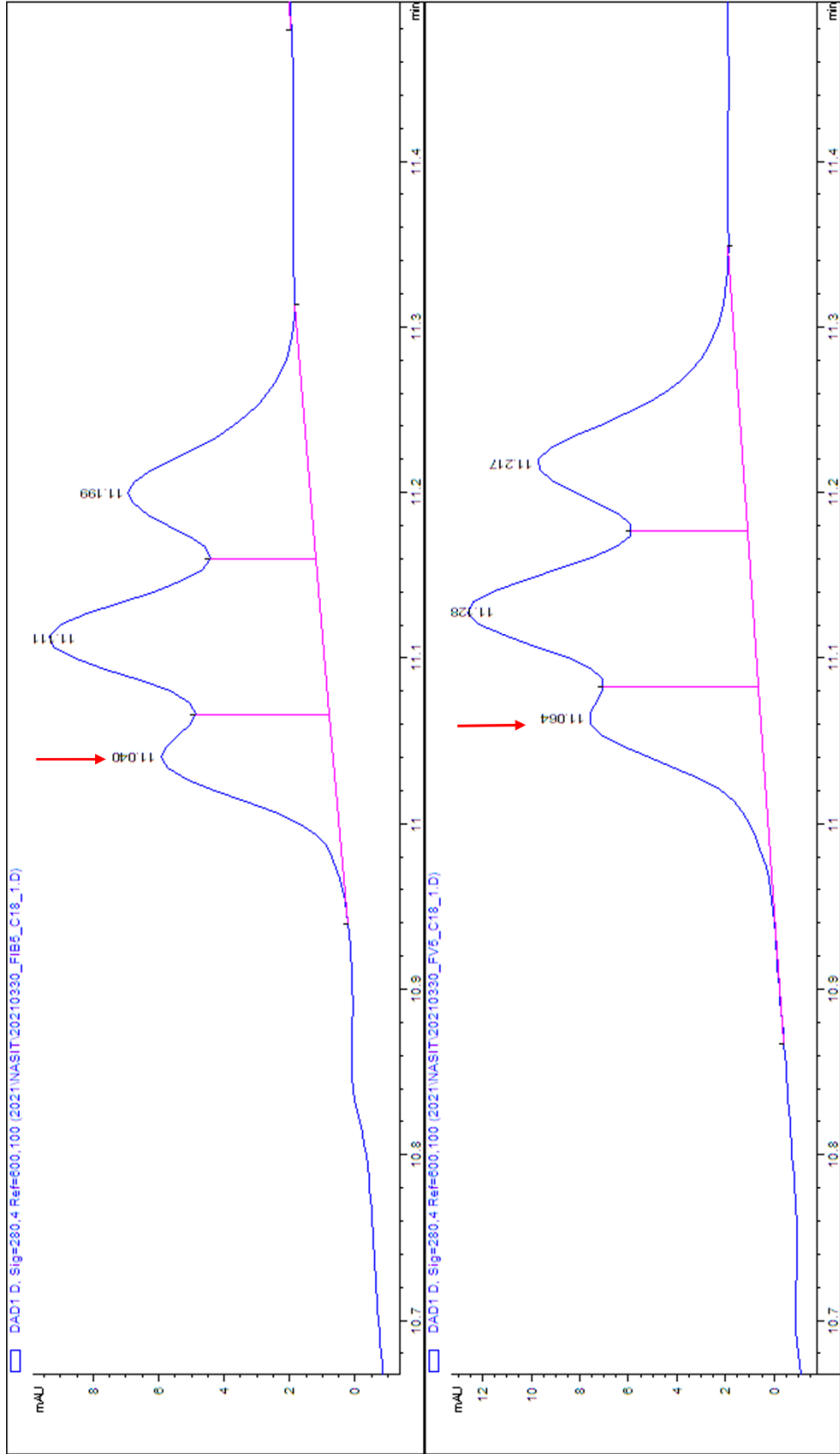
**Şekil 4.8.** C18 kolonundan geçirilen intact fibrinojenden (İntact FIB60) elde edilen kromatogram (215 nm)



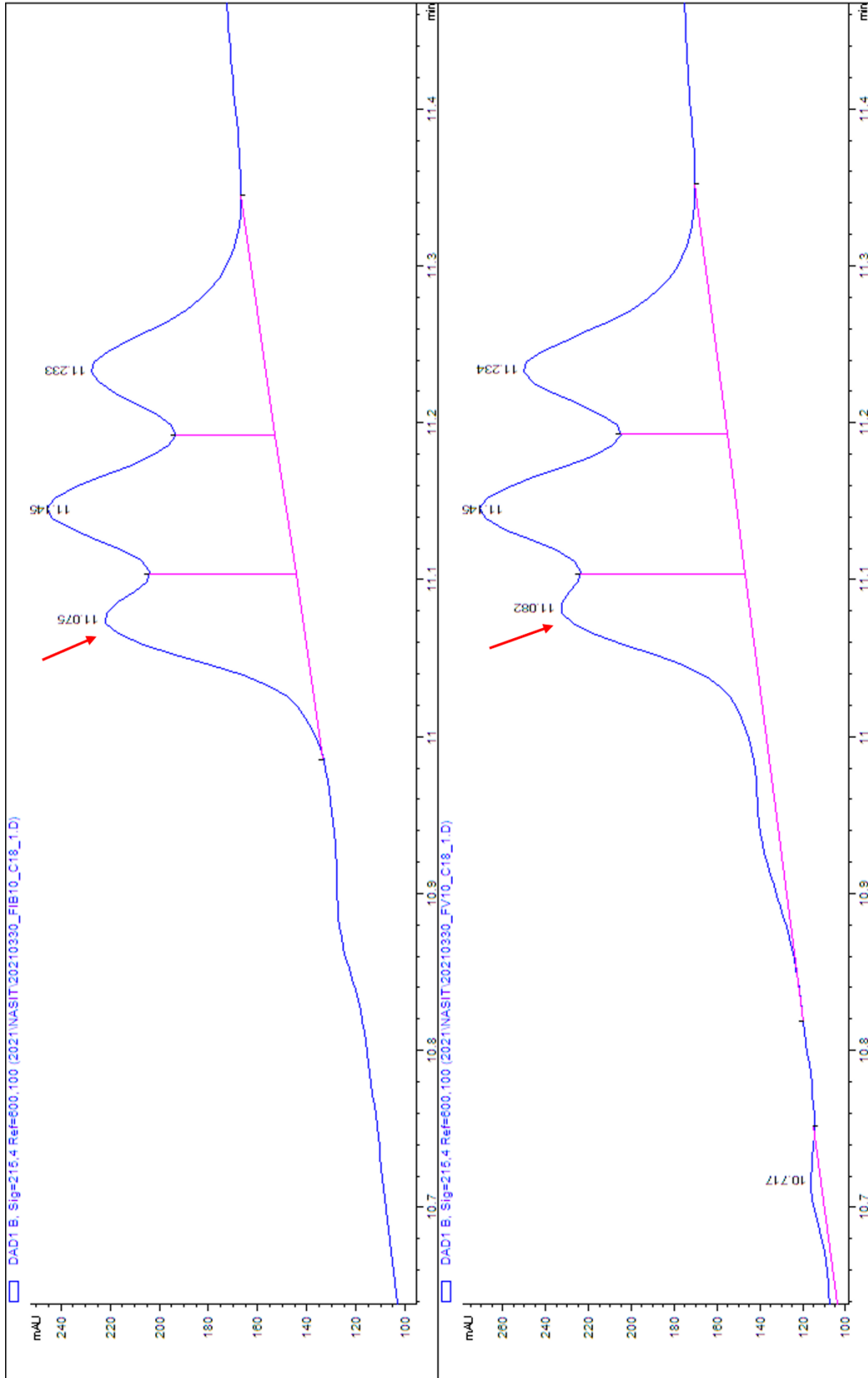
**Şekil 4.9.** C18 kolonundan geçirilen intact fibrinojenden (İntact FIB60) elde edilen kromatogram (280 nm)



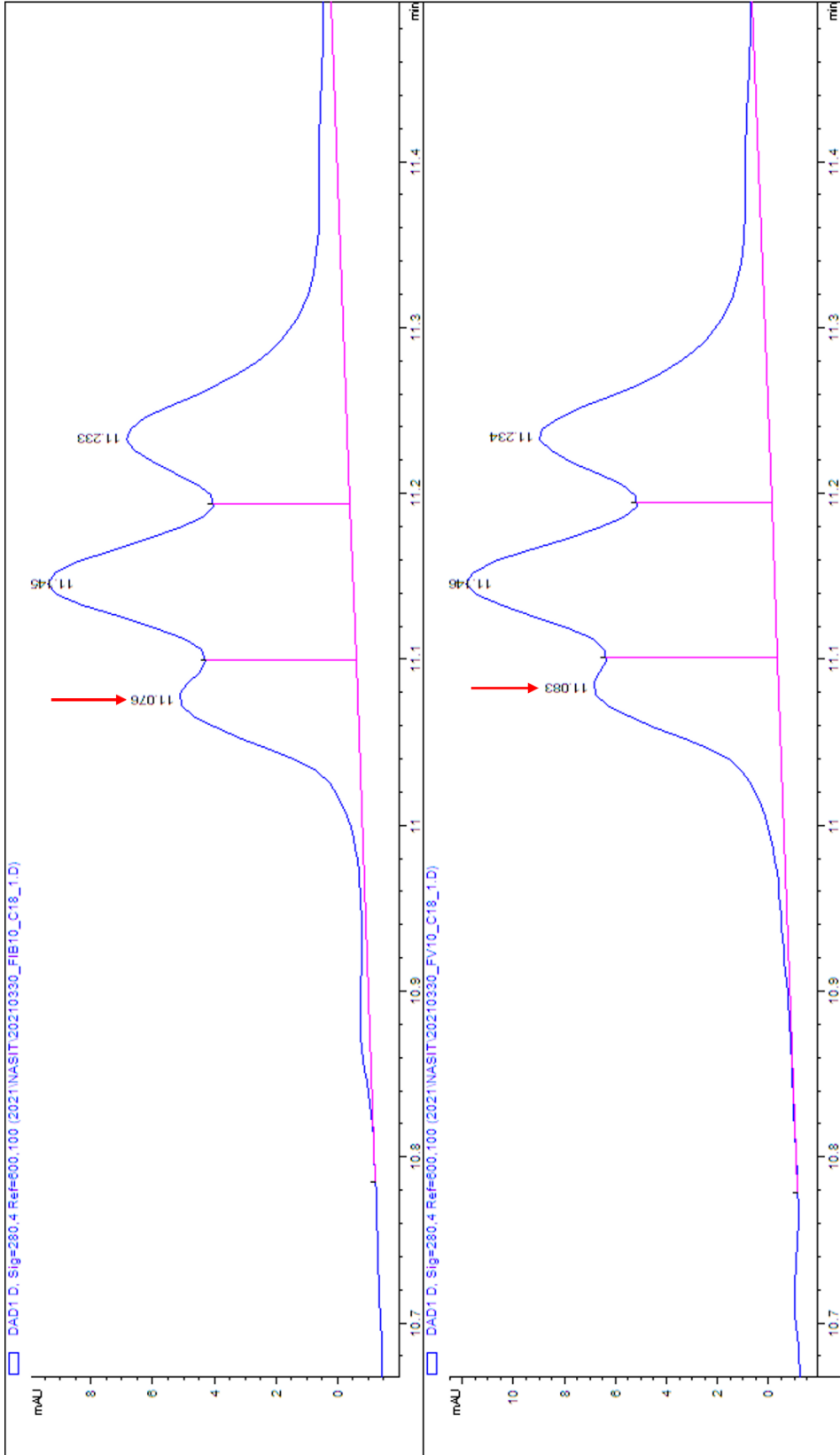
**Şekil 4.10.** C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB5) ve fibrinojen-zehir (FV5) örneklerinden elde edilen kromatogram (215 nm)



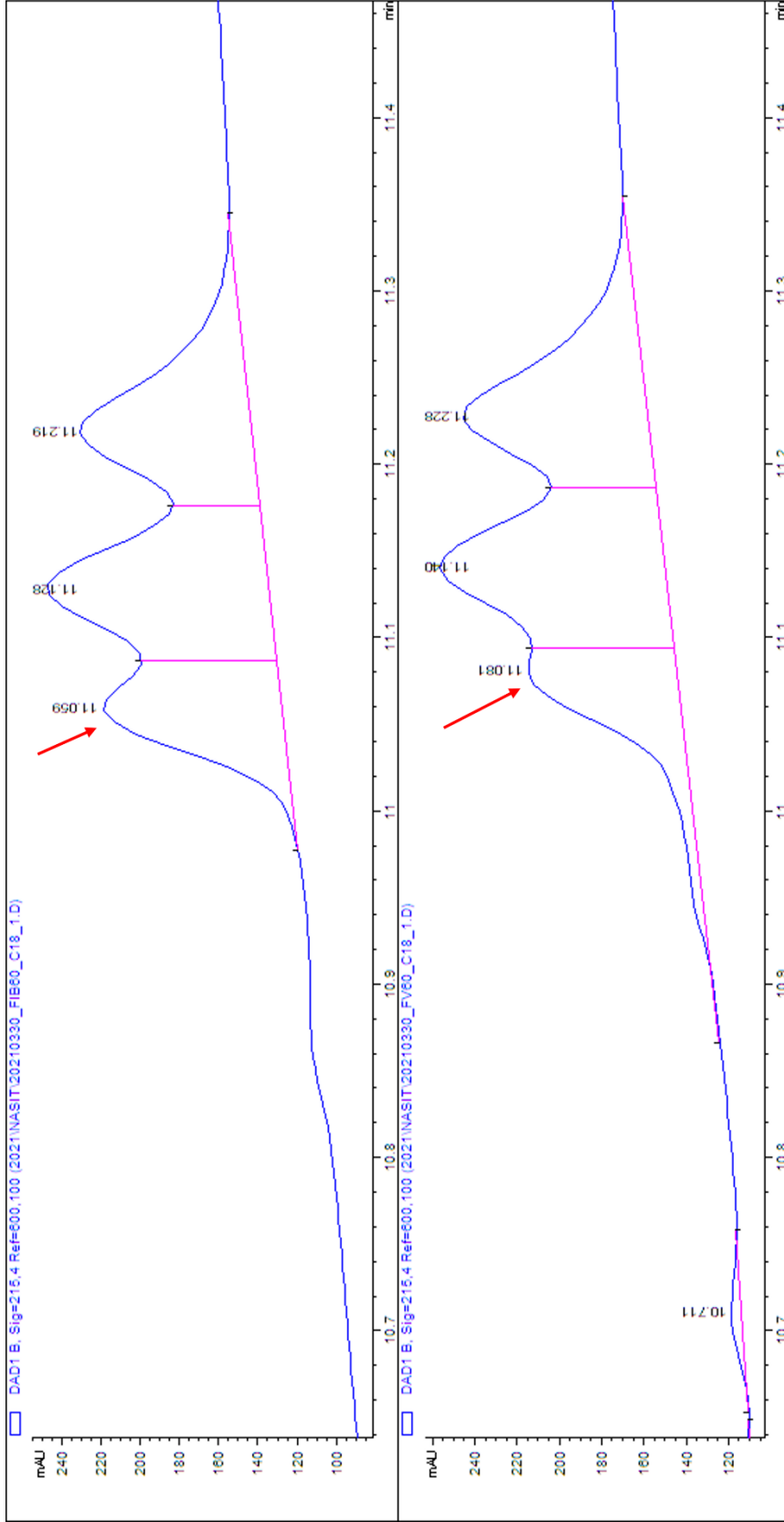
**Şekil 4.11.** C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB5) ve fibrinojen-zehir (FV5) örneklerinden elde edilen kromatogram (280 nm)



**Şekil 4.12.** C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB10) ve fibrinojen-zehir (FV10) örneklerinden elde edilen kromatogram (215 nm)

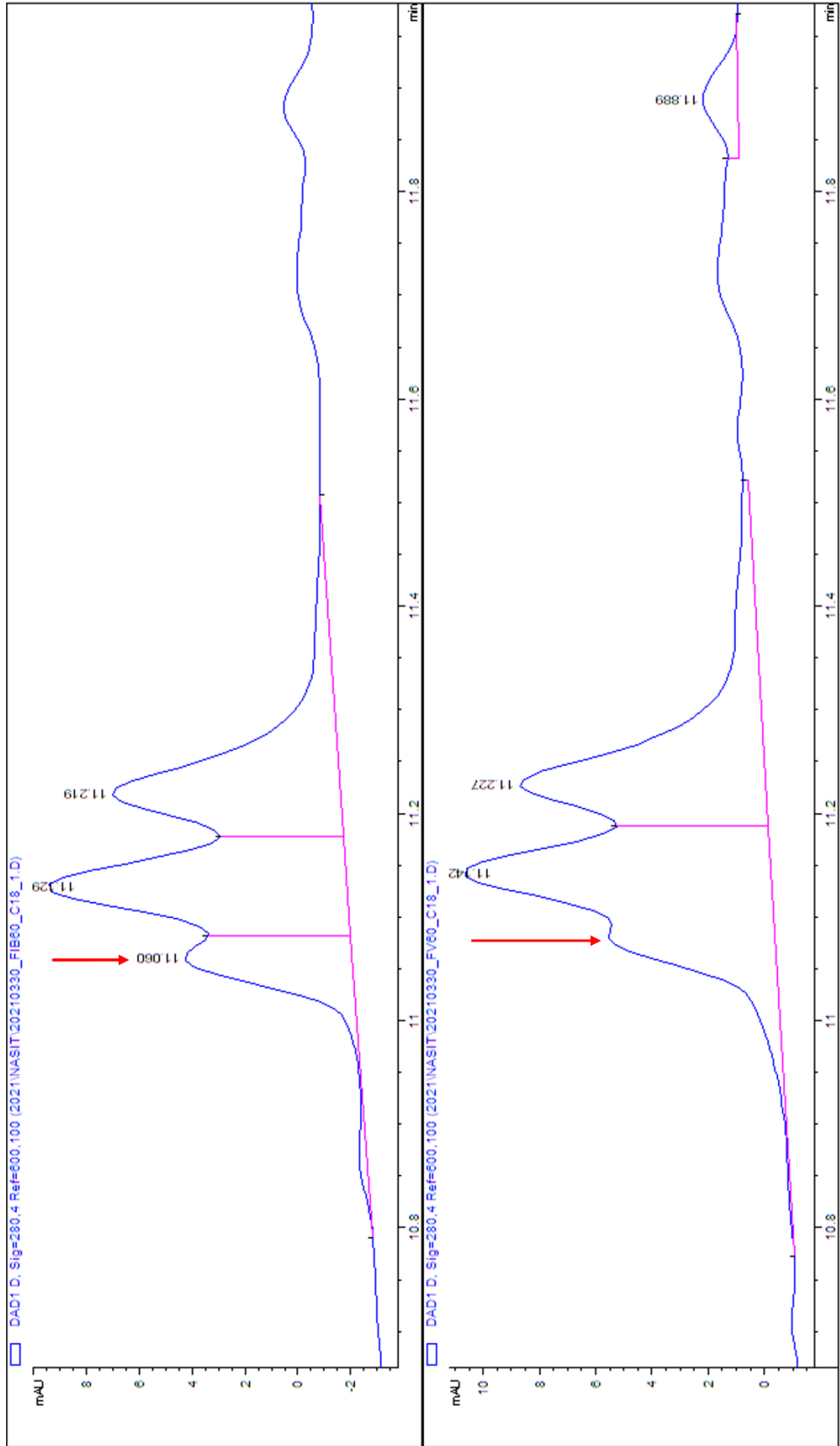


**Şekil 4.13.** C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB10) ve fibrinojen-zehir (FV10) örneklerinden elde edilen kromatogram (280 nm)



**Şekil 4.14.** C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB60) ve fibrinojen-zehir (FV60) örneklerinden elde edilen kromatogram (215 nm)





**Şekil 4.15.** C18 kolonundan geçirilen fibrinojen (FIB60) ve zehir-fibrinojen (FV60) örneklerinden elde edilen kromatogram (280 nm)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pıhtılaşma (tromboz) sonucu kalp krizi (miyokardiyal infarksiyon), felç, iskemik şok ve derin ven trombozu gibi hastalıklar sonucu dünyada dört kişiden biri hayatını kaybetmektedir. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan çeşitli kan sulandırıcı (antikoagülan) ilaçlar mevcuttur (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 proje, *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 ortaya koyulmuştur ancak fonksiyonel aktivite çalışmaları ile bu etki kanıtlanmamış ve fibrinojenin hangi alt birimleri üzerinden etki ettiği gösterilmemiştir. Ayrıca fibrinojenolitik aktiviteye sahip bir enzim bugüne kadar izole edilmemiştir. Bu açıdan proje çalışmaları, zehrin fibrinojenolitik aktivitesini işlevsel anlamda ilk kez belirlemesi ve daha sonraki saflaştırma çalışmalarına ışık tutması bakımından özgün bir projedir. Metalloproteaz gibi pıhtılaşma tedavilerinde kullanılan molekülere 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 projenin, sağlık alanında hazır tanı ürünü olarak kullanılmak üzere saf fibrinojenolitik enzimlerin izolasyon çalışmalarına öncü olması beklenmektedir.

Bu çalışmada SDS-PAGE, zimogram SDS-PAGE, proteaz inhibitörleri çalışması ve HPLC yöntemlerinin kullanılmasıyla *Montivipera raddei* zehrindeki fibrinojenolitik aktiviteden sorumlu enzimlerin metalloproteaz ailesine ait olduğu tespit edilmiştir.

İlk olarak standart SDS-PAGE yöntemi ile fibrinojenolitik 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. Bu kıyaslamalara bakılarak fibrinojenin 37 °C’de 120 dakikaya kadar inkübe edilmesi alt zincirlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır. Fibrinojen ile zehir inkübasyonları geçen her dakika artmaya devam etmiştir. En son 60. ve 120. dakika örneklerinde fibrinojen A $\alpha$  zincirinin bantta kaybolduğu ve buna göre *M. raddei* zehrinde  $\alpha$ -fibrinojenazlar bulunabileceği yönünde bir sonuç ortaya çıkmıştır.

Fibrinojen zimogram SDS-PAGE yöntemiyle *M. raddei* ve *M. lebetina* zehirleri karşılaştırmalı olarak takip edilmiştir. Deney bulgularına göre *M. lebetina*’ninki kadar güçlü olmasa bile (49) *M. raddei* zehri de fibrinojenolitik aktivite göstermektedir. *M. raddei*

fibrinolitik enzimlerinin aktivasyonu bulunmaktadır. *M. raddei* zehri fibrinolitik enzimleri 50-75 kDa arasında gözlenmiştir. Bu da literatürde tanımlanan *Montivipera raddei* metalloproteazlarına ait veriler ile uyumludur (26,28). *M. raddei* metalloproteazlarının hangi sınıf metalloproteaza ait olduğu ve net ağırlıklarının kaç kDa olduğu ancak yapılacak kütle spektrometresi deneyi ile mümkün olabilir.

Proteaz inhibitörlerinin *M. raddei* zehirdeki fibrinolitik enzimler üzerindeki etkisine bakılmıştır. Metalloproteaz inhibitörleri olan EDTA ile 1,10-fenentrolin, zehirdeki fibrinolitik aktiviteyi baskıladığından dolayı, yapılan SDS-PAGE sonrası zehrin fibrinojene karşı etkisiz hale geldiği gözlenmiştir. Ancak zehrin fibrinojen üzerindeki etkinliği serin proteaz inhibitörleri olan PMSF ve aprotinin varlığında bir değişikliğe uğramamıştır. *M. raddei* zehri metalloproteaz ailesine ait fibrinolitik enzimler içermektedir.

Son olarak HPLC yöntemi kullanılarak zehrin fibrinojenin  $\alpha$  zinciri üzerindeki etkisi teyit edilmiştir. Bulgular kısmında C18 kolonu kullanılarak yapılan ters faz kromatografisine ait bilgiler gösterilmektedir. HPLC grafiklerine bakıldığında, fibrinojen alt zincirlerine ait olduğu belirlenen piklerden kırmızı ok ile işaretli olan pik  $\alpha$  zincirini temsil etmektedir. Bu sonuca zehir ile fibrinojenin inkübe edilme süresinin artmasıyla beraber fibrinojen  $\alpha$  zincirine ait pikin azalmasından/ kaybolmasından ulaşılmaktadır. Ancak geriye kalan iki pikten hangisinin  $\beta$  veya  $\gamma$  zincire ait olduğu bilinmemektedir. *M. raddei* zehri fibrinolitik enzimleri sadece fibrinojenin  $\alpha$  zincirine etki ettiği için diğer alt zincirleri belirlemeye gerek duyulmamıştır, teyit amaçlı kullanılan metot sonuca ulaşmıştır.

Fibrinojen alt zincirleri ayrı ayrı saflaştırılıp LC-MS/MS cihazında kütle spektrometresi ile analiz edilebilir ve kütleleri belli olan alt zincirlerin tanımlanması kesin bir şekilde gerçekleştirilebilir. Trombin fibrinojenin hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  zincirlerini parçaladığı için, fibrinojen ile trombin inkübe edilip HPLC yöntemi ile analiz edilebilir ve böylece hangi pikin  $\gamma$  zincire ait olduğu tespit edilebilir. Böylece,  $\alpha$  zincirin hangi pike ait olduğu bilindiği için  $\beta$  zincire ait pik de belirlenebilir.

Son zamanlardaki yılan zehirlerinin proteomik analizleri, yılan zehri metalloproteazlarının (SVMP) Crotalid ve Viperid zehirlerinin çoğunda ana bileşenleri temsil ettiğini göstermektedir (35,54). Metalloproteinazlar, aktif bölgelerinde bir  $Zn^{2+}$  veya  $Ca^{2+}$  iyonu kullanan endopeptidazlardır (55). Zehirler, yüksek derecede toksik olan çeşitli metalloproteinazlar içerir, bu da kan pıhtılaşması ve hemostatik tıkaç oluşumuna müdahale ederek veya kurbanların taban zarını veya hücre dışı matris bileşenlerini parçalayarak ciddi bir kanamaya neden olur (33). Fibrinolitik metalloproteazlar tercihen fibrinojenin  $\alpha$  zincirini parçalamakla birlikte bazılarının doğrudan  $\beta$  zincirini parçalayarak aktiviteye başladığı tespit edilmiştir. Fibrinolitik serin proteazların tercihen fibrinojenin  $\beta$  zincirini parçaladığı ve bunun yanında  $\alpha$  zincire karşı düşük bir aktivite gösterebildiği ortaya çıkarılmıştır (32).

Aynı cinse ait *Montivipera xanthina* türü ile yapılan benzer bir çalışmada (56), zehrin  $\alpha$  ve  $\beta$  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 metalloproteaz izoformları olan BaltMP-I ve BaltMP-II enzimlerinin, fibrinojen  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirine etki ettiği ancak  $\gamma$  zincirine etki etmediği ortaya çıkarılmıştır (57). *Bothrops atrox* zehrinden Batroxase isimli fibrinojenin  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirini hidrolize eden P-I sınıfı metalloproteaz izole edilmiştir. Bunun için jel filtrasyon, anyon değişim kromatografisi ve elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi kullanılmıştır. Proteinin üç boyutlu yapısı PyMOL programı vasıtasıyla elde edilmiştir (52).

UniProt gibi bir protein sekansı veri tabanında yılan zehirlerine ait birçok protein ailesi bulunmaktadır. Ancak herhangi bir yılanla ait genom çıkarılmadığından evrimsel açıdan birbirinden farklılık gösterebilen yılan zehri protein ailelerinin ayrıştırılması zor olmaktadır. Ayrıca protein bankalarında *M. raddei* zehrine dair protein bilgisi de yer almamaktadır (26).

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 metalloproteazların toplam proteine oranı %16,07'dir. Karakterize edilmemiş proteinlerin toplam proteine oranı ise %10,78'dir. Veriler incelendiğinde *M. raddei* zehir içeriğinde metalloproteazların önemli bir yeri vardır. Gelecek çalışmalarda, karakterize edilmemiş proteinler içerisinde de metalloproteaz ailesine dahil olabilecek proteinlerin tanımlanması mümkündür. Ayrıca bu çalışmada, *M. raddei* zehrinin bazı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri 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 önceden yaptığı *M. raddei* karakterizasyon çalışması ile Nalbantsoy ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışma karşılaştırıldığında, bazı önemli büyük protein aileleri tespit edilemediği için tür içi varyasyona dair yeterli bulgular elde edilememiştir (26,28).

Biyoteknolojik ilaç potansiyeli açısından önemli enzim grupları olan SVMP ve SVSP ile ilgili çalışmaların özellikle *Bothrops* sp. gibi belirli cins zehirli yılanlara odaklandığı görülmektedir. Genel olarak yapılan çalışmalarda, HPLC yöntemiyle enzimlerin ayrı ayrı fraksiyonlarda toplanıp saflaştırıldıktan sonra biyokimyasal karakterizasyonu için SDS-PAGE ve kütle spektrometresi yöntemine başvurulmuştur. Bu çalışmada enzim saflaştırma işlemi

yapılmamış, doğrudan ham zehrin aktivitesi araştırılmıştır. HPLC yöntemi ise sadece fibrinolitik 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 moleküllerin ortaya çıkarılması mümkün olmaktadır. Bu projede şimdiye kadar fibrinolitik aktivite yönünde analizi yapılmamış bir zehir çalışılmıştır.

Şimdiye kadar farklı yılan türlerinin zehirlerinden fibrinolitik özellik gösteren SVSP'ler saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Fibrinolitik SVSP'ler genellikle fibrinojenin B $\beta$  zincirini tercihen ayırır ve A $\alpha$  zincirine karşı daha düşük aktiviteye sahiptir. Son zamanlarda tarif edilen enzimler arasında, harobin (*Lapemis hardwickii*) standart şekilde hareket ederken BJ-48 (*Bothrops jararacussu*) sadece fibrinojenin B $\beta$  zincirini ayırır. BpSP-I (*Bothrops pauloensis*) ve TLBm (*Bothrops marajoensis*), A $\alpha$  zincirini B $\beta$  zincirinden daha yüksek aktivite ile ayırır. Ancak rekombinant albobraz (*Trimeresurus albolabris*), BjussuSP-I (*Bothrops jararacussu*) ve bhalternin (*Bothrops alternatus*) sadece fibrinojen A $\alpha$  zincirini ayırır. *Bothrops jararaca*'dan elde edilen bir diğer SVSP olan BjSP ise reaksiyonun ilk dakikalarında A $\alpha$  fibrinojen zincirlerini, daha uzun inkübasyondan sonra ise B $\beta$  zincirlerini parçalayabilmiştir ve  $\gamma$  zinciri üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Örneğin harobin ve BjussuSP-I (*Bothrops jararacussu*) gibi SVSP'lerin çoğu hem fibrinolitik hem de fibrinolitik. Harobin ayrıca uzun süreli inkübasyonda fibrinojenin  $\gamma$  zincirini de parçalamaktadır (5,58). Bunların dışında *Crotalus* cinsine ait türlerden de fibrinojenin A $\alpha$  ve B $\beta$  zincirlerini doza ve zamana bağlı bir şekilde degrade eden serin proteaz özellikte SVTLE'ler saflaştırılmıştır (59)

## 6. ÖNERİLER

Proje çalışmasına ek olarak fibrinojenolitik aktive farklı pH değerleri ve sıcaklık koşulları altında da değerlendirilerek değişkenler artırılabilir, enzimlerin optimum çalışma aralığı saptanabilir. *M. raddei* zehir dozu (mg/ml) ve fibrinojen:zehir oranı (w/w) ayarlanarak farklı bulgular elde edilebilir. Bu çalışmalar ayrıca ilgili enzim saflaştırıldıktan sonra da gerçekleştirilmelidir.

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 (43). *Montivipera raddei* zehri insan için öldürücü olabilecek niteliktedir (27) ancak zehri nötralize edecek ve zehir toksinlerinden hızlıca arınmayı sağlayacak spesifik bir antiserum bulunmamaktadır. Bundan dolayı bu proje bulguları ve devamında yapılabilecek zehir protein karakterizasyonu çalışmaları ile Türkiye'de antiserum üretiminin teşvik edilmesi ile teknolojik ve üretim odaklı yaklaşımlara öncü olabilecek kazanımlar beklenmektedir. Aynı zamanda ısırılma vakalarında klinik tablonun daha ayrıntılı değerlendirilebilmesi adına yeni çalışmalarla önemli bilimsel veriler ortaya çıkarılmalıdır.

*Montivipera raddei* zehrindeki her bir protein ayrı ayrı saflaştırılıp N-terminal sekans analiziyle sekansları çıkarılmalı ve kütle spektrometresi yöntemiyle peptit kütleleri elde edilmelidir. Tür içi ve türler arası karşılaştırmalar yapılmalı ve bunların evrimsel ilişkilerinin belirlenmesi ve varyasyonun değerlendirilmesi için veriler sağlanmalıdır. *M. raddei* zehrinden elde edilen fibrinojenolitik enzimleri kullanılarak hücre kültürü ve sonrasında hayvan deneylerinin yapılmasıyla işlevine dair daha detaylı bilgilere ulaşılabılır. *M. raddei* zehri veya zehrinden saflaştırılmış fibrinojenolitik enzimlerin kan pıhtılaşma zamanına olan etkileri in vitro ve in vivo ortamlarda çalışılmalıdır. Böylece zehirlenme fizyopatolojisinin veya pıhtılaşma tedavisi amacıyla kullanılacak moleküler ürünlerin anlaşılması yolunda bir adım atılmış olur. 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 kıyaslanması ve böylece moleküler evrimdeki yerinin belirlenmesi açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

X-ışını kristalografisi yöntemi ile *M. raddei* zehrindeki metalloproteazlar başta olmak üzere diğer proteinlerin 3 boyutlu yapıları ortaya çıkarılmalı ve Protein Data Bank'a katkıda bulunmalıdır. Bu sayede yapı-işlev arasındaki ilişkiler irdelenmeli ve moleküler evrim çalışmalarına destek olunmalıdır.

Fibrinojenolitik enzimlerin, peptidomimetik formunun oluşturulması ve aşırı kan kaybına neden olabilecek yaralanmalarda pıhtılaştırıcı etkisinden yararlanılması üzerine yerli ilaç tasarımı için *M. raddei* zehrinin potansiyelinden yararlanılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, Buller H, Gallus A, Hunt BJ, et al. Thrombosis: A major contributor to global disease burden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(11):2363–71.
2. Alvarez-Flores MP, Faria F, de Andrade SA, Chudzinski-Tavassi AM. Snake Venom Components Affecting the Coagulation System. In: Gopalakrishnakone P, Inagaki H, Vogel C-W, Mukherjee AK, Rahmy TR, editors. *Snake Venoms* [Internet]. 1st ed. Dordrecht: Springer Netherlands; 2017. p. 417–37. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6410-1>
3. Escoubas P, King GF. Venomics as a drug discovery platform. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2009 Jun 9;6(3):221–4. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/epr.09.45>
4. Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2004 Apr 1;61(7–8):843–56. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-003-3325-z>
5. Sajevic T, Leonardi A, Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* [Internet]. 2011 Apr;57(5):627–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010111000110>
6. Marsh NA. Diagnostic Uses of Snake Venom. *Haemostasis* [Internet]. 2001;31(3–6):211–7. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/48065>
7. Atamer T. Hemostaz mekanizması. *Türk Hematol Derneği.* 2007;2:6.
8. DeLoughery TG, editor. *Hemostasis and Thrombosis* [Internet]. Fourth. Vol. 2. Cham: Springer International Publishing; 2019. 236 p. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123822277000525>
9. Kalaycıoğlu L. Kanın Pıhtılaşma Mekanizması ve Hayvanlarda Tesbit Edilen Bazı Pıhtılaşma Bozuklukları. *Ankara Üniversitesi Vet Fakültesi Derg* [Internet]. 1979;26:206–14. Available from: [https://doi.org/10.1501/Vetfak\\_0000001013](https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000001013)
10. Atalan N. Hemostaz. *Gogus-Kalp-Damar Anestezi ve Yogun Bakim Dern Derg.* 2013;19(3):109–12.
11. Gezer S. Koagülasyon Testlerinin Klinikte Kullanımı. *HematoLog* [Internet]. 2012;(2):8–23. Available from: <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/520/koagulasyon-testlerinin-klinikte-kullanimi.pdf>
12. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem.* 2018;82:405–56.
13. Williams RC. Morphology of bovine fibrinogen monomers and fibrin oligomers. *J Mol Biol.* 1981;150(3):399–408.
14. Kant JA, Fornace AJ, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR. Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: Gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1985 Apr 1;82(8):2344–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.82.8.2344>
15. Chung DW, Harris JE, Davie EW. Nucleotide sequences of the three genes coding for human fibrinogen. In: Liu CY, Chien S, editors. *Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, and Fibrinolysis.* 1st ed. Boston: Springer; 1990. p. X, 450.
16. Litvinov RI, Gorkun O V., Owen SF, Shuman H, Weisel JW. Polymerization of fibrin: specificity, strength, and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level. *Blood* [Internet]. 2005 Nov 1;106(9):2944–51. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/106/9/2944/21909/Polymerization-of-fibrin-specificity-strength-and>
17. Uetz P. Species Numbers (as of May 2021) [Internet]. The Reptile Database. 2021 [cited 2021 Oct 27]. Available from: <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>
18. Thornton SL. Snakes. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology* [Internet]. Third. Academic Press; 2014. p. 310–2. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543007867>
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.* 2014;38(2):216–21.
  20. Hatakeyama DM, Tasima LJ, Bravo-Tobar CA, Serino-Silva C, Tashima AK, Rodrigues CFB, et al. Venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* [Internet]. 2020;26(February 2020):1–17. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1678-91992020000100334&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992020000100334&tlng=en)
  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.* 1992;30(2):202–6.
  22. Li M, Fry BG, Kini RM. Eggs-Only Diet: Its Implications for the Toxin Profile Changes and Ecology of the Marbled Sea Snake (*Aipysurus eydouxii*). *J Mol Evol.* 2005;60(1):81–9.
  23. Daltry JC, Wüster W, Thorpe RS. Diet and snake venom variation. *Nature.* 1996;379:537–40.
  24. Cavinato RA, Remold H, Kipnis TL. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. *Toxicon.* 1998;36(2):257–67.
  25. Menezes MC, Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Camargo ACM, Serrano SMT. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon.* 2006;47(3):304–12.
  26. Sanz L, Ayvazyan N, Calvete JJ. Snake venomomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei*. *J Proteomics* [Internet]. 2008 Jul;71(2):198–209. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391908000717>
  27. Budak A, Göçmen B. *Herpetoloji*. 1st ed. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2005. 231 p.
  28. Nalbantsoy A, Hempel B-F, Petras D, Heiss P, Göçmen B, İğci N, et al. 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* [Internet]. 2017 Sep;135:71–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010117301885>
  29. Mackessy SP, editor. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* [Internet]. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2009. 528 p. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420008661>
  30. İğci N. Koca Engerek, *Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758)'nın Güneydoğu Anadolu ve Kıbrıs Alt Türlerinin Zehirlerinin Proteomik ve Spektroskopik Yöntemlerle Karşılaştırılması. 2010.
  31. Serrano SMT. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* [Internet]. 2013 Feb;62:19–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.003>
  32. Swenson S, Markland FS. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* [Internet]. 2005 Jun;45(8):1021–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010105000681>
  33. Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* [Internet]. 2000 Mar;1477(1–2):146–56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016748389900268X>
  34. Pirkle H. Thrombin-like Enzymes from Snake Venoms: An Updated Inventory. *Thromb Haemost.* 1998 Jul 2;79(3):675–683.
  35. Markland FS, Swenson S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* [Internet]. 2013 Feb;62:3–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004>
  36. de Moraes NCG, Neves Mamede CC, Fonseca KC, de Queiroz MR, Gomes-Filho SA, Santos-Filho NA, et al. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active,



- anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. *Toxicon* [Internet]. 2012;60(7):1251–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.017>
37. Boundy J. *Snakes of the World: A Supplement*. First. CRC Press; 2021. 273 p.
  38. Göçmen B, Kariş M, Özmen E, Oğuz MA. First record of the palestine viper *Vipera palaestinae* (Serpentes: Viperidae) from anatolia. *South West J Horticult Biol Environ*. 2018;9(2):87–90.
  39. Zinenko O, Avci A, Spitzenberger F, Tupikov A, Shiryayev K, Bozkurt E, et al. Rediscovered and critically endangered: *Vipera anatolica* Eiselt & Baran, 1970, of the western Taurus Mountains (Turkey), with remarks on its ecology (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Herpetozoa*. 2016;28(3/4):141–8.
  40. Nilson G, Andrén C, Avci A, Akarsu F. *Montivipera raddei* [Internet]. International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. 2009 [cited 2021 Oct 28]. Available from: <https://www.iucnredlist.org/species/22993/9406370>
  41. *Montivipera raddei* / Radde Dağ Engereği / Radde's Mountain Viper [Internet]. Available from: <http://www.turkherptil.org/IcerikDetay.asp?IcerikKatId=&TurId=602>
  42. Aznaurian A V., Amiryanyan S V. Histopathological changes induced by the venom of the snake *Vipera raddei* (Armenian adder). *Toxicon*. 2006;47(2):141–3.
  43. Snakebite envenoming [Internet]. World Health Organization. 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
  44. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake Venom Variability: Methods of Study, Results and Interpretation. *Toxicon*. 1991;29(11):1279–303.
  45. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1–2):248–54.
  46. Edgar W, Prentice CRM. The proteolytic action of anuroxin on human fibrinogen and its polypeptide chains. *Thromb Res*. 1973;2(1):85–95.
  47. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nat Publ Gr*. 1970;227:680–5.
  48. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25(9):1327–33.
  49. 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 B. Ankara Üniversitesi; 2015.
  50. Siigur J, Aaspollu A, Tonismägi K, Trummal K, Samel M, Vija H, et al. Proteases from *Vipera lebetina* Venom Affecting Coagulation and Fibrinolysis. *Haemostasis*. 2001;31:123–32.
  51. Gelatin zymography protocol [Internet]. Abcam. Available from: <https://www.abcam.com/protocols/gelatin-zymography-protocol>
  52. Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon* [Internet]. 2012 Jul;60(1):70–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018>
  53. Seo A, Jackson JL, Schuster J V., Vardar-Ulu D. Using UV-absorbance of intrinsic dithiothreitol (DTT) during RP-HPLC as a measure of experimental redox potential in vitro. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(19):6379–84.
  54. Gâz Florea ŞA, Gâz Florea A, Kelemen H, Muntean D-L. Snake Venom Metalloproteinases. *Acta Medica Marisiensis* [Internet]. 2016 Mar 1;62(1):106–11. Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.1515/amma-2015-0114>
  55. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(6–7):1334–47.
  56. Arıkan H, Alpogut Keskin N, Çiçek K. Fibrinogenolytic activity of venom proteins of *Montivipera xanthina* (Gray, 1849) (Ophidia: Viperidae). *Basic Appl Herpetol* [Internet]. 2017 Mar 24;31:91–100. Available from: <http://ojs.herpetologica.org/index.php/bah/article/view/58>

57. Costa JO, Petric CB, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Oliveira CZ, Soares AM, et al. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* [Internet]. 2007;13(3):640–54. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1678-91992007000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992007000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
58. Carone SEI, Menaldo DL, Sartim MA, Bernardes CP, Caetano RC, da Silva RR, et al. B<sub>j</sub>SP, a novel serine protease from *Bothrops jararaca* snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2018;357(July):50–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.08.018>
59. De Oliveira DGL, Murakami MT, Cintra ACO, Franco. JJ, Sampaio S V., Arni RK. 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)*. 2009;41(1):21–9.

## 8. EKLER

### 8.1. Mali bilanço ve açıklamaları

**Toplam Proje Bütçesi: 8.500 TL (6.000 + 2.500 ek bütçe)**

**Harcanan Toplam (TL): 8.259,21 TL**

"Laboratuvar Sarf Malzemesi" kalemi toplam bütçesi: 7.780 TL

"Laboratuvar Sarf Malzemesi" kaleminden harcanan toplam: 7.539,21 TL

"Laboratuvar Sarf Malzemesi" kalemi açıklama: Alınan sarf malzemeler, özellikle poliakrilamit jel elektroforezi için gerekli olan kimyasallar ve genel laboratuvar sarf malzemelerdir. Sarf malzemelerde projede yer alan bir kalem malzeme alınamamıştır. Bunun nedeni proje başladıktan sonra ürünün üretimden kalkması ve muadil ürünün de döviz kuru farkı nedeniyle fiyatının çok yükselmesidir. Bu nedenle proje yürütücüsünün farklı bir projeden temin ettiği benzer ürün ile çalışmalar gerçekleştirebilmiş, bu durum proje çalışmalarını aksatmamıştır.

"Hizmet Alımı" kalemi toplam bütçesi: 720 TL

"Hizmet Alımı" kaleminden yapılan toplam harcama: 720 TL

"Hizmet Alımı" kalemi açıklama: Hizmet alımı kapsamında Üniversitemiz Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir.

"Cihaz, Makine, Teçhizat" kaleminde projede bütçe bulunmamaktadır.

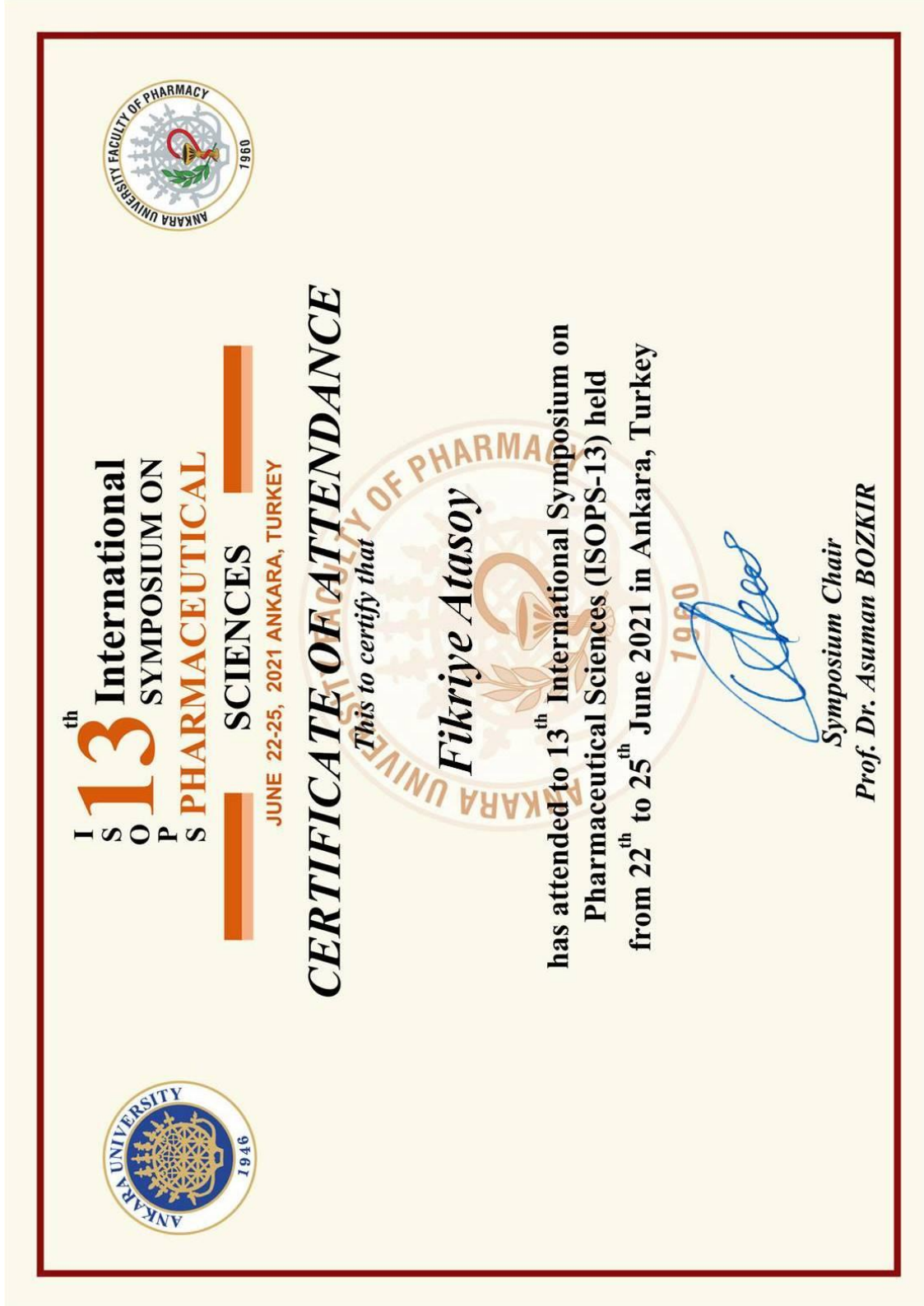
### 8.2. Projede kullanılan donanım, cihaz, alet, vb. teçhizatın özelliği ve ileriye dönük kullanımına ilişkin açıklama

Proje kapsamında herhangi bir cihaz, teçhizat vb. alımı yapılmamış olup, Üniversitemizdeki mevcut imkanlar kullanılmıştır.

### 8.3. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar)

Proje kapsamında yapılan çalışmalardan şimdiye kadar Uluslararası kongrede bir sözlü sunum gerçekleştirilmiştir.

Projeden çıkan yayına (kongre sözlü bildirisi) ait katılım belgesi



## Projeden çıkan yayına (kongre sözlü bildirisi) ait bildiri özeti

### OP194: PRENATAL STRESS MAY INCREASE THE RISK OF DEVELOPING ALZHEIMER-LIKE NEUROPATHOLOGY IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS

**Turunc Ozoglu, E.**

*Izmir Katip Celebi University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Izmir, Turkey, ezgi.turunc@ikcu.edu.tr*

**Introduction:** Neuroplasticity is the ability of central nervous system for adapting its structural and functional organization according to developmental and environmental influences. It has been revealed that prenatal stress is affecting brain functions in early life and underlies various diseases during adulthood (1). Alzheimer's Disease (AD) is the most common form of dementia and characterized by progressive cognitive decline. The neuropathologic hallmarks of AD are amyloid plaques (AP) and neurofibrillary tangles (NFT) (2). We searched the effects of prenatal stress on neuropathologic changes specific to AD through amyloid beta peptide generation and tau hyperphosphorylation in hippocampus.

**Materials and Methods:** Prenatal stress were induced in rats with dexamethasone (Dex), a synthetic glucocorticoid (3). From GD 14 to GD 21, pregnant rats were injected daily with Dex at a dose of 200 µg/kg s.c. (Dex group) or saline (control group). After the birth, at the age of 3 months, male rats were decapitated (n=5) and hippocampuses were dissected on ice. The effects of Dex were investigated by real-time PCR in hippocampus through the mRNA levels of amyloid precursor protein (APP), beta-secretase 1 (BACE1), microtubule-associated protein tau (MAPT), glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β). The amyloid beta peptide (1-42) (Aβ(1-42)) and tau levels were measured with ELISA. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance.

**Results:** Prenatal Dex exposure caused significant increases in mRNA expressions of BACE1 and GSK-3β while decreased MAPT mRNA expression. No significant differences were found in the mRNA level of APP gene between control and Dex groups. Aβ(1-42) and tau levels were significantly elevated in Dex group when compared to control.

**Conclusions:** The results of this study showed that prenatal stress induced by Dex caused significant changes in hippocampal Aβ(1-42) and tau levels, and expression levels of genes that involved in APP processing, Aβ(1-42) generation and tau hyperphosphorylation. It was concluded that prenatal stress may trigger development of Alzheimer-like neuropathology in the hippocampus and represent a new therapeutic strategy against AD.

### Acknowledgements

This study was supported by a grant of Izmir Katip Celebi University (2018-ONAP-ECZF-0001).

### References:

1. Braun et al., (2020). Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 117:281-296.
2. Loera-Valencia et al., (2018). Journal of Internal Medicine, 284(1):2-36.
3. Kjaer et al., (2011). Physiology and Behavior, 102(5):444-452.

### OP195: DETERMINATION OF THE FIBRINOGENOLYTIC ACTIVITY OF MONTIVIPERA RADDEI (RADDE'S MOUNTAIN VIPER) VENOM BY POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

**Atasoy, F., Igci, N.**

*Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, Department of Molecular Biology and Genetics, Nevşehir, Turkey, fsedatasoy@gmail.com, igcinasil@yahoo.com.tr*

**Introduction:** Viper venoms contain some enzymes that play an important role in the blood coagulation process (1). These molecules have become valuable in the laboratory diagnosis and treatment of hemostatic disorders. Thrombin-like fibrinogenolytic enzymes have gained attention in this regard and number of biotechnological products have been developed (eg. batroxobin) (2). In this study, it is aimed to investigate the fibrinogenolytic activity of *Montivipera raddei* venom for the first time and find out the main protease family which is responsible for the fibrinogenolytic activity.

**Materials and Methods:** Crude venom obtained from *M. raddei* was incubated with human fibrinogen for different times at 37 °C. In addition, inhibition study was carried out with by pre-incubating venom with different protease inhibitors such as Ethylenediaminetetraacetic acid, Phenylmethylsulfonyl fluoride, 1,10-phenanthroline and aprotinin. Fibrinogenolytic activity was assessed by using routine SDS-PAGE and fibronogen zymography methods.

**Results:** Enzymes cleaving only the A $\alpha$  chain of fibrinogen were detected in *M. raddei* venom. This effect was observable at 10th minute and A $\alpha$  chain was completely degraded at the 60th minute. It was concluded that EDTA and 1,10-phenanthroline, which are metalloprotease inhibitors, inhibited the activity of fibrinogenolytic enzymes in the venom, so the bands of the A $\alpha$  chain did not disappear on SDS-PAGE gels. These results suggest that main enzymes responsible for fibrinogenolytic activity of *M. raddei* venom belong to the metalloprotease family. It was also found by fibronogen zymography



## Projeden çıkan yayına (kongre sözlü bildirisi) ait bildiri özeti (Devam)

### Acknowledgements kısmında BAP birimine teşekkür edilmiştir.

that the main fibrinogenolytic enzymes in *M. raddei* venom have molecular weights of approximately 75 and 50 kDa.

**Conclusions:** This is the first study revealing the presence of fibrinogenolytic enzymes in *M. raddei* venom. Our results will guide the following isolation and characterization studies of novel thrombin-like enzymes that might have diagnostic and therapeutic potential.

#### Acknowledgements

This study was supported by Research Fund of the Nevşehir Hacı Bektaş Veli University (Project Number: ABAP20F28). The presenting author received a TUBITAK 2210-C MSc fellowship during the studies.

#### References:

1. Sajevic et al., (2011). *Toxicon*, 57:627-645.
2. Marsh N, Williams V (2005) *Toxicon*, 45:1171–1181.

#### OP196: PROPHYLACTIC EFFECT OF MYRICETIN AND APIGENIN AGAINST LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED ACUTE LIVER INJURY

<sup>1</sup> Berköz, M., <sup>1</sup> Unal, S., <sup>2</sup> Karayakar, F., <sup>3</sup> Yunusoğlu, O., <sup>2</sup> Ozkan-Yılmaz, F., <sup>2</sup> Ozluer-Hunt, A., <sup>1,4</sup> Aslan, A.

<sup>1</sup> Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Pharmacy, Van, Turkey, mehmet\_berkoz@yahoo.com

<sup>2</sup> Mersin University, Faculty of Fisheries, Mersin, Turkey

<sup>3</sup> Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Medicine, Van, Turkey

<sup>4</sup> Kyrgyz-Turkish Manas University, Faculty of Science, Bishkek, Kyrgyzstan

**Introduction:** Endotoxemia is defined as a common bacterial infection originating from the blood causing excessive damage by spreading from one tissue to another (1). This study has been designed to elucidate the anti-inflammatory and antioxidant effects of myricetin and apigenin in lipopolysaccharide (LPS)-induced acute liver injury and the possible molecular mechanisms involved in such protection.

**Materials and Methods:** Thirty-six mice were randomly divided into 6 groups as; control, lipopolysaccharide (LPS) (5 mg/kg) (2), LPS + myricetin (100 mg/kg), LPS + myricetin (200 mg/kg), LPS + apigenin (100 mg/kg), and LPS + apigenin (200 mg/kg) groups. Myricetin and apigenin were administered orally for 7 days, and LPS was administered intraperitoneally only on the 7<sup>th</sup> day of the study. 24 hours after LPS application, all animals were sacrificed and serum biochemical parameters, histopathology and oxidative stress and inflammation markers of liver tissue were examined.

**Results:** Myricetin and apigenin pre-treatments increased serum albumin and total protein levels, liver GSH level and catalase and SOD activities and decreased serum ALT, AST, ALP,  $\gamma$ -GT, CRP, total and direct bilirubin levels, liver MPO activity, MDA, NOx, PGE2, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 levels, iNOS and COX-2 mRNA levels, phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65, I $\kappa$ B, and IKK proteins but not p38, ERK, and JNK proteins in LPS-treated mice. Myricetin and apigenin administration also regained the hepatic architecture disrupted during LPS application.

**Conclusions:** In conclusion, these phytochemicals may act as a potential agent to prevent acute liver injury. We can conclude that the results of this study may be a new preventive medicine strategy in the prophylaxis of liver damage that may occur as a result of endotoxemia and sepsis.

#### Acknowledgements

The authors sincerely thank the laboratory assistant in Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Pharmacy, Departments of Biochemistry and Pharmaceutical Biotechnology

#### References:

1. Yang et al., (2020). *Mol Med Rep*, 22:5095-5104.
2. Jiang et al., (2017). *Brain Res Bull*, 135:40-46.

#### OP197: TOLUIDINE BLUE O DECREASES TAU PHOSPHORYLATION AT THR181 AND SER202/THR 205 IN N2A MOUSE NEUROBLASTOMA CELLS STABLY EXPRESSING THE HUMAN SWEDISH MUTANT APP695

<sup>1</sup>Onder, S., <sup>1</sup>Biberoglu, K., <sup>1</sup>Yuksel, M., <sup>1</sup>Tacal, O.

<sup>1</sup> Hacettepe University, School of Pharmacy, Department of Biochemistry, Ankara, Turkey, sedaonder@hacettepe.edu.tr, kevserb@hacettepe.edu.tr, melike.ytek@hacettepe.edu.tr, tacal@hacettepe.edu.tr.

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) is characterized by intracellular neurofibrillary tangles caused by abnormal phosphorylation of the microtubule-associated tau protein, amyloid plaques composed of  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ , 40-42 aa) derived by proteolytic cleavage of amyloid precursor protein (APP) and loss of cholinergic neurons. Currently, most of FDA-approved AD drugs available on the market are cholinesterase inhibitors (ChEIs) that target the cholinergic system. Although ChEIs provide symptomatic therapy, recent findings have shown that some ChEIs can also affect amyloid metabolism and/or tau phosphorylation (1). Recently, we have demonstrated that toluidine blue O (TBO), a phenothiazine-structured compound, is a potent

#### **8.4. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler**

Projede yapılan çalışmalar bir yüksek lisans tezini oluşturmuştur.

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 İGÇİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi

Aralık 2021  
NEVŞEHİR