

## **TEŐEKKÖR**

Bu çalıőmanın her safhasında bana yol gősteren, bilgi ve tecrűbesi ile aydınlatan, yardım ve ilgisini esirgemeyen kıymetli danıőman hocam Doç. Dr. Naim Saėlam'a, her tűrlű laboratuvar imkanı saėlayan Fırat Őniversitesi Su ũrűnleri Fakűltesi Dekanlıėına, Su ũrűnleri Fakűltesi akademik ve idari personeline, ayrıca tez çalıőmamın her safhasında yardımlarını gėrdűėum herkese, ۆzellikle aileme en içten saygı ve őukranlarımı sunarım.

Tez çalıőmamı 1128 nolu proje olarak destekleyen Fırat Őniversitesi Bilimsel Araőtırma Pojeleri (FŐBAP) koordinatėrlűėune, maddi imkanlar saėladıėı için çok teőekkűr ederim.

Ayőegűl őAHİN

<b><u>İÇİNDEKİLER</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>I</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>V</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR BİLGİSİ</b> .....	<b>3</b>
2. 1. <i>Hirudo medicinalis</i> (Tıbbi Sülük)'in Genel Morfolojik Özellikleri.....	3
2. 1. 1. <i>Hirudo medicinalis</i> 'in Sistematikteki Yeri.....	4
2. 2. Hyaluronidaz'ın Tanımı ve Aktivitesi.....	5
<b>3.MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>7</b>
3. 1. Materyal .....	7
3. 1. 1. Çalışma Alanı.....	7
3. 1. 2. Kullanılan Malzemeler.....	8
3. 1. 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Ayraçlar.....	11
3. 2. Metot .....	12
3. 2. 1. Sülüklerin Temini.....	12
3. 2. 2. Suyun Kimyasal Özelliklerinin Ölçülmesi.....	12
3. 2. 3. Tıbbi Sülük ( <i>Hirudo medicinalis</i> )'ün Diseksiyonu.....	13
3. 2. 4. Hyaluronidaz Enziminin Hesaplanması İçin Standart Eğrinin Oluşturulması.....	15
3. 2. 5. Hyaluronidazın Tayin Yöntemi ve Hesaplanması.....	15
3. 2. 6. İstatistiksel Analiz.....	16
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>17</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>27</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>29</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

## Sayfa No

Şekil 2. 1. <i>Hirudo medicinalis</i> 'in dorsal görünüşü.....	5
Şekil 3. 1. Sülük üretim ve yetiştirme havuzlarının görünüşü.....	7
Şekil 3. 2. Hassas terazi.....	8
Şekil 3. 3. Cam- cam homojenizatör .....	9
Şekil 3. 4. Nüve NF800R marka soğutmalı santrifüj cihazının görünümü.....	9
Şekil 3. 5. Nüve marka etüv.....	10
Şekil 3. 6. Aquamate marka spektrofotometre cihazı .....	10
Şekil 3. 7. Diseksiyonu yapılacak olan sülüklerin genel görünümü.....	13
Şekil 3. 8. <i>Hirudo medicinalis</i> 'in anterior bölgesi.....	14
Şekil 3. 9. <i>Hirudo medicinalis</i> 'in posterior bölgesi.....	14
Şekil 4. 1. <i>Hirudo medicinalis</i> 'in ağırlığına göre hyaluronidaz miktarının dağılımı.....	20
Şekil 4. 2. <i>Hirudo medicinalis</i> 'in uzunluğuna göre hyaluronidaz miktarının dağılımı.....	20
Şekil 4. 3. <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın su sıcaklığına bağlı olarak değişimi.....	21
Şekil 4. 4. <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın su sıcaklığına bağlı olarak dağılımı.....	21
Şekil 4. 5. <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın çözünmüş oksijene bağlı olarak değişimi.....	22
Şekil 4. 6 <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın çözünmüş oksijene bağlı olarak dağılımı.....	22
Şekil 4. 7. <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın pH miktarına bağlı olarak değişimi.....	23
Şekil 4. 8. <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın pH miktarına bağlı olarak dağılımı.....	23
Şekil 4. 9. <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın sertlik miktarına bağlı olarak değişimi.....	24
Şekil 4. 10 <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın sertlik miktarına bağlı olarak dağılımı.....	24
Şekil 4.11. <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın organik maddeye bağlı olarak değişimi.....	25
Şekil 4.12. <i>Hirudo medicinalis</i> 'teki hyaluronidazın organik maddeye bağlı olarak dağılımı.....	25
Şekil 4.13. Hyaluronidaz miktarının mevsimlere göre dağılımı.....	26

## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 4.1.</b> İncelenen <i>Hirudo medicinalis</i> 'in sayısı, ortalama ağırlık ve uzunluk değerleri.....	17
<b>Tablo 4. 2.</b> Suyun kimyasal özelliklerinin aylara göre dağılımı.....	18
<b>Tablo 4. 3.</b> <i>Hirudo medicinalis</i> 'in anterior, posterior ve totalindeki hyaluronidaz miktarı ...	19
<b>Tablo 4. 4.</b> Mevsimlere göre hyaluronidaz düzeyindeki değişim.....	26

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ***Hirudo medicinalis* (TIBBİ SÜLÜK)'İN KAS DOKUSUNDA HYALURONİDAZ AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**AYŞEGÜL ŞAHİN**

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

2006, Sayfa: 33

Bu çalışmada, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip Balık Üretim ve Araştırma tesisindeki sülük üretim ve yetiştirme havuzlarında yetiştirilen Tıbbi sülük *Hirudo medicinalis*'in kas dokusunda spektrofotometrik yöntemle hyaluronidaz miktarı ve aylara göre değişimi araştırıldı.

Çalışmada, bir yıl boyunca toplam 168 adet sülüğün anterior ve posterior bölgelerindeki kas dokuları kullanıldı. Sülüklerin dokularının ekstraksiyonu yapılarak belirtilen dokularda hyaluronidaz miktarı saptandı.

Çalışmada *Hirudo medicinalis*' de en yüksek hyaluronidaz miktarı Mart ayında ortalama  $1692,69 \pm 40,65 \mu\text{mol/L}$  ( $1190,49 - 2270,07$ ), en düşük hyaluronidaz miktarı ise Eylül ayında  $322,98 \pm 13,41 \mu\text{mol/L}$  ( $207,31 - 824,21$ ) olarak bulundu.

Tıbbi sülük *Hirudo medicinalis*'in kas dokusundaki hyaluronidaz miktarının aylara göre dağılımları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $p > 0,05$ ) belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Sülük, *Hirudo medicinalis*, Hyaluronidaz

## ABSTRACT

Master Thesis

### THE INVESTIGATION OF HYALURONIDASE ACTIVITY IN MUSCLE OF MEDICINE LEECH (*Hirudo medicinalis*)

Ayşegül ŞAHİN

Fırat University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Aquaculture

2006, pages: 33

In this study, the level and monthly changes of hyaluronidase were spectrophotometrically investigated in the muscle of medicine leech (*Hirudo medicinalis*) reared in Cip Fish Reproduction Unit of Fırat University Fisheries Faculty. During the study, the muscle samples from both anterior and posterior parts of total 168 of leeches were dissected and then they were extracted for determination of hyaluronidase levels.

While the highest hyaluronidase level was found as  $1692.69 \pm 40.65 \mu\text{mol/L}$  (1190.49-2270.07) in March, the lowest hyaluronidase level was found as  $322.98 \pm 13.41 \mu\text{mol/L}$  (207.31-824.21) in September.

In conclusion, it was determined that the monthly changes of hyaluronidase level in the muscle of medicine leech (*Hirudo medicinalis*) were found statistically insignificant ( $P > 0.05$ ).

**Key Words:** Medicine Leech, *Hirudo medicinalis*, Hyaluronidase

## 1. GİRİŞ

*Hirudo medicinalis* eski çağlardan beri hem parazit, hem de tıpta kullanılan canlılar olarak bilinmektedir. Yeryüzünde yaşayan çok çeşitli sülük türü vardır. Bu sülüklerin bir kısmı omurgalılarda, diğer bir kısmı da omurgasız canlılarda paraziter etki göstermektedir. Sülükler sulara bağımlı olmakla beraber, karasal ve yarı karasal formları da bulunmaktadır. Sülüklerin bir çoğu suların sığ kısımlarında taş ve bitkiler üzerinde yaşamlarını sürdürebildiği gibi çok farklı alanlara da ihtiyaç gösterebilir. Bazı türler ise göllerde, havuzlarda, yavaş akıntılı yerlerde, akış hızı yüksek akarsularda ve bataklıklarda yaşar (Halton, 1989; Smith, 2001).

Eski dönemlerde olduğu gibi, günümüzde de tam kontrollü laboratuvarlarda steril şartlar altında üretilen sülükler modern tıpta kullanılmaktadır (Sağlam, 2004).

Sülükler çeşitli lokal ağrılarda, böbrek iltihabı, larenjit, göz rahatsızlıkları, beyinde kan toplanması, hatta şişmanlık ve zihin rahatsızlıkları gibi hemen hemen birçok hastalıkta kullanılmıştır. Tıbbi sülük *Hirudo medicinalis*'in serbest mikrovasküler doku transferlerinde kullanımı da her geçen gün artmaktadır (Demirhan, 1979; Eldor ve diğ. 1996; Rao ve Whitaker, 2003).

Günümüz hekimliğinde deri ve diğer organ transplantasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Dokuda meydana gelen şişkinlik ve hematomu gidermek amacıyla sülükler kullanılmakta ve büyük bir başarı sağlanmaktadır. Bunun yanında sülüklerin salgıladığı ve antikoagülant özelliği taşıyan hirudin de transplante edilen dokulardaki kan pıhtılarını eriterek doku adaptasyonunu hızlandırmaktadır. İnsanlarda dil, testis, orbita hematomlarında ve diz eklemi yangılarının sağaltımında da kullanılmaktadır (Demirhan, 1979; Bonazinga, 1995; Canpolat ve Sağlam, 2004).

Sülüklerin gerek kendileri, gerekse onlardan elde edilen enzim ve hormonlar çeşitli hastalıkların tedavisinde aranan ilaçlar olarak yerini almıştır. Sülükler yapılarında birçok enzim ve hormon ihtiva etmektedir. Bu enzimlerden biri de hyaluronidazdır. Kardiovasküler sahada, miyokardial dokular üzerinde koruyucu bir etki göstermektedir. Diğer tıbbi uygulamalarda da geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bazı virüslere ve bazı habis tümörlere karşı savunmada ve yaraların iyileşmesinde önemli bir etki göstermektedir. Besin endüstrisi içinde de eti yumuşatan bir madde olarak hyaluronidaz kullanılmaktadır (Wilkinson ve diğ., 1995; Bozkurt ve diğ., 2003; Tanyıldızı ve diğ., 2005).

Bu çalışmayla, hyaluronidaz enziminin tıbbi sülük, *Hirudo medicinalis*'in kas dokusundaki aylık değişimi ve mevsimsel aktivitesinin spektrofotometrik yöntem kullanılarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Hastalıklar Anabilim Dalı laboratuvarlarından yararlanılarak gerçekleştirilen bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) (Proje No: 1128) tarafından desteklenmiştir.

## 2. LİTERATÜR BİLGİSİ

Bu çalışmada *Hirudo medicinalis*'de hyaluronidaz düzeyinin aylık değişim ve mevsimsel aktivitesinin araştırılması amaçlandığından, bu konular hakkında bilgi verilmesi uygun bulunmuştur.

### 2.1. *Hirudo medicinalis* (Tıbbi Sülük)'in Genel Morfolojik Özellikleri

*Hirudo medicinalis* 34 adet segmente sahip olan bir Annelidtir. Vücutları dorso-ventral basıktır. Vücutlarında bariz bir baş bölgesi ayırt edilmez. Arka uçlarında tutunma organı görevi gören büyük bir çekmen ile ağzın etrafında küçük bir çekmen bulunur. *Hirudo medicinalis*'in vücudu üzerinde kırmızı, kahverengi, yeşil ve siyah renkler ile beraber benek tarzında lekeler görülmektedir. Boyları 20 cm ye kadar ulaşabilmektedir (Çağlar, 1973; Davies, 1991; Sağlam, 2000; URL 1; Moore, 2001; URL 4).

Bu sülüklerde özelleşmiş duyu organları olarak gözler ve segmental sıralanmış duyumsal papilleri vardır. Gözler 5 çift olup ön tarafın dorsal yüzeyi üzerine yerleşmiştir. Duyumsal papillerin sıralanışı her segmentin bir halkasında yerleşmiş olan küçük disk oluşumlarıdır. Bunların her biri terminal bir kıl taşıdığından kütikül üzerinde çıkıntı oluştururlar. Duyu hücreleri bu sülüklerin av ve konakçılarına bulmasını ve karanlıkta hareket etmelerini sağlar. Bu duyu reseptörleri sayesinde *Hirudo medicinalis*, konakçılarda bulunan balık pulu, doku özü, yağ bezlerinin salgısı ve diğer maddelerin salgılanması ile saldırıya geçerler. Vücut salgıları tarafından cezp edilen sülükler canlıya doğru hareket ederek ona yapışır ve beslenirler. (Demirsoy, 1982; Şen ve diğ.2001; Sağlam, 2004; URL 8; URL 7).

Sindirim kanalları anterior çekmen tarafından çevrelenmiş olan ağız ile başlamaktadır. *Hirudo medicinalis*' in ağız boşluğu içerisinde bıçak gibi keskin dişleri taşıyan üç çene vardır. Kan emeceği zaman çekmenleriyle sıkıca tutunarak vücut yüzeyine dişlerini geçirir ve dokuda kesik meydana getirir. *Hirudo medicinalis*'in salgıladığı hirudin antikoagülant yapıda olup kanın pıhtılaşmasını önlediği gibi yara kabuğunun oluşumunu da engelleyerek ısırdığı yerde yara oluşturmaz. Ayrıca bu salgı anestetik bir madde ihtiva ettiğiinden yarma işlemi sırasında acı hissedilmez (URL 6). *Hirudo medicinalis* vücut ağırlığının 10 katı kadar kan emebilme yeteneğine sahip olduğundan bir kez beslendikten sonra bir yıla kadar kan emmeden yaşamlarını devam ettirebilirler. Çünkü bu sülüklerde emilen fazla kan midenin yapısında bulunan divertiküllerde depo edilir. Bu nedenle yeni kan emmiş sülükler normal ağırlığının 10 katı büyüklükte olabilir. (Çağlar, 1973; Sawyer, 1986; Sağlam, 1994; Gönenç, 2000; URL 5).

Solunumları genellikle vücut yüzeyi tarafından sağlanır. Epidermis geniş bir kapillar damar ağına sahip olup, solunuma yardım etmektedir. Aynı zamanda posterior çekmenleriyle uygun bir yere tutunup dalgalanma hareketi yapmak suretiyle de solunumlarını gerçekleştirmiş olurlar (Lutz ve diğ., 1959; Keasner, 1967; Pennak, 1991; URL 6).

Sinir sistemi vücut yapılarına özelleşmiş ileticilerdir. Sinir düğümlerinin hücre gövdeleri farklı foliküller içinde guruplaşmıştır. Her gangliyon altı folikül meydana getirir. Beşinci ve altıncı segmentlerde geniş bir gangliyonik sinir, farinks ve hortumun çevresini kuşatmıştır. Bu halka beyni ifade eder. Faringeal halka subfaringeal gangliyonları ile ilk üçüncü veya dördüncü segmentin gangliyonları posterior olarak ilerler. İki ventral sinir şeridi varsa da segmental ganglia'nın her çifti eriyerek birleşmiştir. Bu merkezi sinir sisteminden başka periferik ve sempatik sinir sistemleri de bulunmaktadır ( Barnes, 1987; Sağlam, 2004).

Eşeysiz çoğalamazlar. Rejenerasyon kabiliyetleri de çok azdır. Hirudinea' nın hepsi hermafrodittir. Klitellar bölge olarak isimlendirilen 9-11. segmentler arası bir erkek bir de dişi genital delik taşırlar. Erkek genital por daima dişi genital porun ön tarafında bulunur. Döllenme, spermaların erkek cinsiyet organı (penis) aracılığıyla diğer bireyin vaginasına aktarılmasıyla gerçekleşir (Çağlar, 1973; Geldiay ve diğ. 1991; Sağlam ve Sarıyüpoğlu, 1998; Gönenç, 2000; URL 3).

İlkbaharda sıcaklığın artışı ile sülükler uyarılmakta ve yumurtlama gerçekleşmektedir. Döllenme gerçekleştikten bir süre sonra yumurtalar, klitellum bezleri tarafından salgılanan besleyici albumin ile dolu bir kesenin (kokon) içine bırakılır (Brown, 1967; Davies, 1991; Wilkin ve Scofield, 1991). *Hirudo medicinalis* ler bu kokonlarını bırakmak üzere, sudan ayrılarak nemli toprağın içine girerler (Çağlar, 1973; Elliott ve, Mann 1979; Sawyer, 1986; Barnes, 1987; Sağlam, 1994; Saygı, 2002).

### **2. 1. 1. *Hirudo medicinalis*'in Sistematikteki Yeri**

Sülüklerin sistematigi farklı bilim adamlarına göre farklı şekillerde yapılmıştır. Sawyer (1986)'a göre Tıbbi sülük olarak adlandırılan *Hirudo medicinalis*'in (Şekil 2.1) sistematigi aşağıda verilmiştir.

**Alem:** Animalia

**Alt Alem:** Metazoa

**Şube:** Annelida

**Alt Şube:** Clitellata

**Sınıf:** Hirudinea

**Alt Sınıf:** Hirudininae  
**Takım:** Rhynchobdellida  
**Aile:** Glossiphoniidae  
**Aile:** Hirudinidae  
**Alt Aile:** Hirudinariinae  
**Cins:** Hirudo  
**Tür:** Hirudo nipponia  
**Tür:** Hirudo troctina  
**Tür:** *Hirudo medicinalis*



**Şekil 2. 1. 1.** *Hirudo medicinalis*'in dorsal görünüşü

## **2. 2. Hyaluronidaz'ın Tanımı ve Aktivitesi**

Hyaluronidaz; bir endoenzim olup hyaluronik asit içindeki kısa zincirli oligosakkarit depolimerizasyonunu katalize eder. Hyaluronik asit ise folikül hücrelerini bir arada tutma özelliğine sahiptir. Serumdaki hyaluronik asit seviyesinin enfeksiyonlar sırasında yükseldiği ve bu yükselişin klinik olarak ateşli aktivitede yararlı olacağı rapor edilmiştir. Hyaluronidaz, hyaluronik asitin dengelenmesinde önemli bir görev üstlenmektedir. Sülüklerdeki hyaluronidaz

enzimi ancak belirli salgı hücreleri tarafından meydana getirilmektedir. Tıbbi sülük (*Hirudo medicinalis*)’te de hyaluronidaz enzimi vücuttaki salgı hücreleri içerisine lokalize olmuştur. Bu enzim spermelerin yumurtaya daha hızlı nüfuz etmesine yardımcı olmaktadır (Frost ve diğ., 1997; Meyers, 2001; Bozkurt ve diğ., 2003). Ayrıca hyaluronidaz bazı kemoterapotiklerin vücut içindeki etkisini yükseltmek için de kullanılmaktadır. Bu özelliğinden dolayı sülüklerden temin edilen hyaluronidaz enzimi antibiyotiklerin yapısına katılarak antibiyotiğin etkisini güçlendirmek ve emilimini hızlandırmak için kullanılmaktadır (Sawyer, 1982). Hyaluronidaz, tıbbi uygulamalarda geniş bir yayılım alanına sahip olup tedavi edici bir özelliğe sahiptir. Sülüklerden elde edilen hyaluronidazın bir göz hastalığı olan glokomun tedavisinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Sawyer, 1986; Hoving ve Linker, 1999).

Frost ve diğ. (1997), Tanyıldızı ve diğ. (2003), tıpta özellikle virüs ve tümörlere karşı savunma mekanizmasının oluşturulmasında ve yine yumurta ve sperm aktivitesinde hyaluronidazın önemli bir role sahip olduğunu ve üremede etkin bir görev aldığını belirtmişlerdir. Hücrel üreme ve farklılaşma için önemlidir ve bağ dokuda yapısal bir role sahiptir (Frost ve diğ. 1997; Hoving ve diğ. 1999; Krishnapilla ve diğ., Takahashi ve diğ., 2003).

Ayrıca sülüklerin farklı beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak vücutlarında salgılanan hyaluronidaz aktivitesinin değişim gösterdiği ve bakterilerin hücre duvarında yer alarak bakterilerin savunma mekanizmasını kontrol ettiği de belirlenmiştir (Hoving ve Linker , 1999). Hyaluronidaz enzimi ile ilgili dünyada ve ülkemizde çeşitli çalışmalar (Bozkurt ve diğ., 2003; Frost ve diğ., 1997; Sawyer, 1986; Tanyıldızı ve diğ., 2003; Wilkinson ve diğ., 1995) yürütülmüş olmasına rağmen ülkemizde tıbbi sülük, *Hirudo medicinalis*’in hyaluronidaz enziminin belirlenmesi üzerine yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır. Wilkinson ve diğ. (1995) farklı yaş guruplarına ait insan plesantasındaki hyaluronidaz aktivitesinde farklılıklar olduğunu açıklamışlardır. Toida ve diğ. (1999) florimetrik yöntemle sulfonat glikosaminoglikanların hyaluronidaz aktivitesi üzerine olan etkisini çalışmışlardır.

Krishnapillai ve diğ. (1998), Nephrops norvegicus olarak isimlendirilen bir karides türü üzerinde yapmış oldukları çalışmada hyaluronidaz aktivitesinin karidesin hepatopankreasında en yüksek miktarda olduğunu tespit etmişlerdir. Kudo ve Tu (2001) yılan zehirinden hyaluronidazın izole edilebileceğini bildirmişlerdir. Meyers (2001) sperm ve yumurta arasındaki etkileşimde hyaluronidaz enziminin etkisini araştırmıştır. Tanyıldızı ve Bozkurt (2001) ise koç ve sığırların sperm karakteristiği üzerine hyaluronidaz aktivitesinin etkisini çalışmışlardır.

### 3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip balık üretim ve araştırma tesisindeki sülük üretim havuzlarından 12 ay boyunca aylık olarak toplanarak F.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarına getirilen toplam 168 adet *Hirudo medicinalis* kullanıldı. Çalışma süresince Şubat – Ekim ayları arasında sülük örnekleri toplanırken Kasım – Ocak ayları arasında kış uykusu nedeniyle sülükler toprağın derinliklerine çekildiğinden bulunamadı.

#### 3. 1. Materyal

##### 3. 1. 1. Çalışma Alanı

Çalışmanın yürütüldüğü Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip Balık Üretim ve Araştırma tesisi, Elazığ ilinin 18 km kuzey- batısında yer alan Cip Baraj Gölü'nün hemen alt tarafında yer almaktadır. Tesisin yüzey alanı 15700 m<sup>2</sup> olup, gerekli su tesis içindeki yer altı kaynaklarından karşılanmaktadır (Dörücü, 1990). Çalışmada kullanılan sülükler bu tesisteki sülük üretim havuzlarından toplanmıştır ( Şekil 3.1).



Şekil 3. 1 : Sülük üretim ve yetiştirme havuzlarının görünüşü

### 3. 1. 2. Kullanılan Malzemeler

Sülükler ayda iki sefer olmak üzere çalışma alanına gidilerek bir pens yardımıyla toplandı. Sülüklerin taşınmasında 5 litrelik plastik bidonlar kullanıldı. Çalışmada sülüklerin ağırlıklarının ölçümü ve kimyasal maddelerin tartılması için 0,0001 g hassasiyetli Shimadzu UW 620 H marka hassas terazi (Şekil 3.2), pens, bisturi, makas, operasyon eldiveni, doku örneklerinin konulduğu petri kutuları, hyaluronidaz analizi yapılana kadar doku örneklerinin saklandığı derin dondurucu, dokuların homojenizasyonunu sağlamak için cam – cam homojenizatör (Şekil 3.3), homojen hale getirilen doku ekstraktlarının santrifüj edilmesinde kullanılan ependrof ve 15 ml' lik santrifüj tüpleri, santrifüj tüplerinin yerleştirildiği sporlar, doku örneklerinin santrifüj edildiği Nüve NF800R marka soğutmalı santrifüj cihazı (Şekil 3.4), doku örneklerinin inkübasyona bırakıldığı Nüve EN 400 marka etüv (Şekil 3.5), sıvı kimyasal maddelerin ölçülmesi için pipet, kimyasal solusyonların hazırlandığı beher , erlenmayer ve balon, sıvı kimyasalların ölçümünde kullanılan mezür, hyaluronidaz aktivitesinin tayini için Aquamate marka spektrofotometre cihazı (Şekil 3.6) ve 3 ml' lik spektro küvetleri kullanıldı.



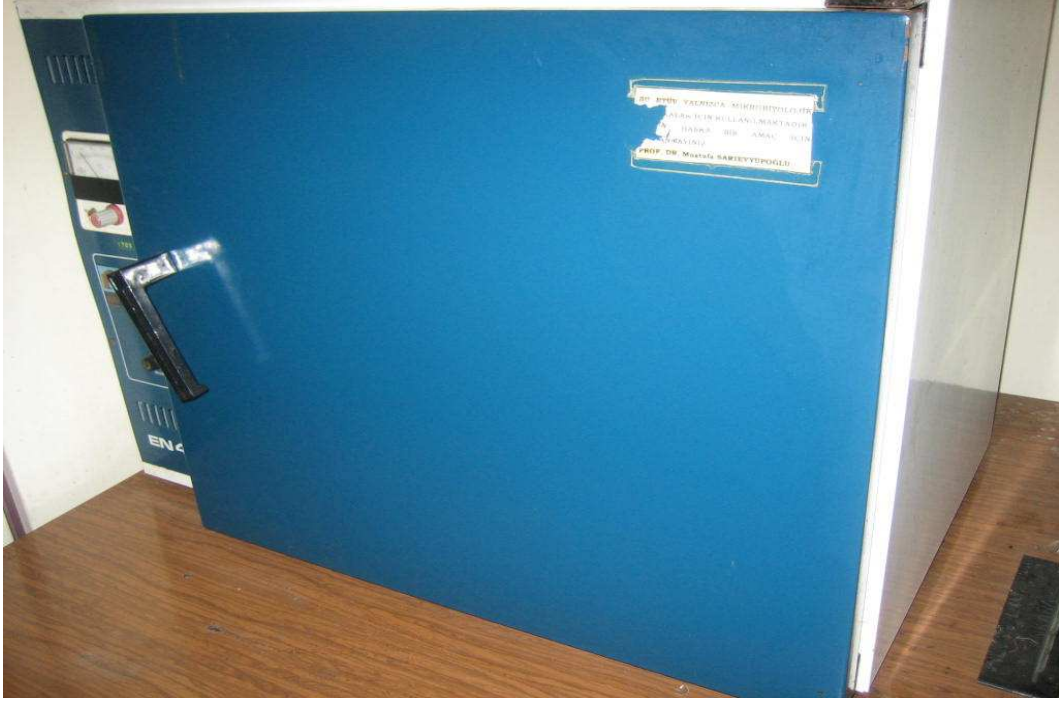
Şekil 3. 2. Hassas terazi



Şekil 3. 3. Cam- cam homojenizatör.



Şekil 3. 4. Nüve NF800R marka soğutmalı santrifüj cihazının görünümü.



Şekil 3. 5. Nüve marka etiv



Şekil 3. 6. Aquamate marka spektrofotometre cihazı

### 3. 1. 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Hyaluronidaz tayini için kullanılması gereken ayraçlar aşağıda verilmiştir.

**1- N-asetil glukozamin (NAG):** Çalışmada hyaluronidaz enziminin standart eğrisinin çıkarılması için N-asetilglukozamin kullanıldı. N-asetilglukozamin'den 50, 100, 200 mg tartılarak 1 L saf suda çözüldü. Elde edilen 50, 100, 200 mg /L'lik NAG solusyonları ayrı ayrı 582 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

**2- Dimetilaminobenzaldehit (DMAB) :** Önce 87,5 ml si glisialasetik asit, 12,5 ml si hidroklorik asit olan 1 L lik solusyon hazırlandı. Elde edilen bu solusyon içine 10 g dimetilaminobenzaldehit katılarak çözüldü. Böylece stok DMAB oluşturuldu. Oluşturulan bu stok kullanılacağı zaman 1/10 oranında glisial asetik asit ile tekrar sulandırıldı.

**3- 0,45 mol/L NaCl :** 26,9 g tartılan NaCl 1 L lik saf suda çözümlenerek 0,45 mol/L'lik olan NaCl çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti homojenizasyon işleminden önce doku örneklerinin 1/5 oranda sulandırılmasında ve asetat tamponunun hazırlanmasında kullanıldı.

**4- Hyaluronik asit :** Hyaluronik asitten 0,8 mol/L'lik solusyon hazırlandı. Bunun için 40 mg tartılan hyaluronik asit 10 ml lik saf suda çözüldü. Hazırlanan bu çözelti sülüğün kas dokusunda bulunan hyaluronidazın açığa çıkarılmasında kullanıldı.

**5- Potasyumtetraborat :** Potasyumtetraboratın 0,8 mol/L' lik solusyonu hazırlandı. Bunun için 2,444 g potasyumtetraborat tartılarak 10 ml saf suda çözüldü. Çalışmada kullanılan bu çözeltinin pH'sının 10 olması gerektiğinden, solusyonun pH'sı sodyum hidroksit ile 10'a ayarlandı.

**6- Asetat Tamponu :** Bu çözeltinin elde edilmesinde 0,45 mol /L'lik NaCl solusyonu kullanıldı. 0,3 mol/L'lik hazırlanması gereken asetat tamponunun elde edilmesi için 16,9 g tartılan sodyum asetat daha önceden hazırlanan 0,45 mol/L'lik NaCl solusyonunda çözüldü. Hazırlanan asetat tamponunun 3,8 olması gereken pH sı ise hidroklorik asit ile ayarlandı.

Çalışmada yararlanılan solusyonların pH'larının ayarlanmasında % 33,3'lük analitik saflıktaki hidroklorik asit ve sodyum hidroksit kullanıldı. Çeşitli solusyonlar içinde yine analitik saflıktaki glisial asetik asitten yararlanıldı.

### **3.2 . Metot**

#### **3.2 . 1. Sülüklerin Temini**

Araştırmada kullanılacak sülükler, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip balık üretim ve araştırma tesisindeki sülük üretim havuzlarından bir pens yardımı ile elle toplandı. Toplanan sülük örnekleri beş litrelik bidona yerleştirilerek Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları laboratuvarına getirildi. Canlı olarak getirilen sülüklere numara verilerek 0.0001g hassasiyetli dijital terazi ile ağırlıkları ve bir cetvel yardımı ile boyları ölçüldü. Ayrıca sülüklerin toplandığı havuzlardaki suyun sıcaklığı, pH sı ölçüldükten sonra bu havuzlardan alınan su örnekleri laboratuvara getirilerek oksijen, sertlik ve organik madde tayinleri yapıldı.

#### **3.2 . 2. Suyun Kimyasal Özelliklerinin Ölçülmesi**

Sülüklerin temin edildiği havuzlarda aylık olarak su sıcaklığı, pH, oksijen, toplam sertlik ve organik madde gibi parametreler ölçüldü. Çalışma alanı olan Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip Balık Üretim ve Araştırma tesisindeki sülük üretim ve yetiştirme havuzlarındaki suyun sıcaklığı ve pH sı Hanna HI 9812 PH/ EC/TDS marka pH metre ile belirlendi.

Oksijen tayini Winkler metoduna göre saptandı. Su numunesi oksijen şişesine usulüne uygun şekilde alındıktan sonra içerisine 1 ml mangan sülfat ve alkali asit bırakılarak hemen çöktürme işlemi yapıldı. Çalışma alanında oksijen tayini yapma imkanı olmadığından, tayin şişesi laboratuvara getirilerek vakit geçirilmeden oksijen analizinin yapılması için çöktürülmüş su örneği bir erlene boşaltıldı ve içerisine renk şeffaf oluncaya kadar sodyum tiyosülfat bırakıldı. Daha sonra içerisine birkaç damla nişasta indikatörü damlatıldı ve siyahımsı sarı olan su örneği tekrar sodyum tiyosülfat ile titre edildi.

Toplam sertlik analizi için sülüklerin toplandığı havuzundan alınan 50 ml lik su numunesi bir erlene alındıktan sonra içerisine 1 ml tampon-I ve bir spatül ucu erikroblak –T konulduktan sonra 0,01 N lik Edta çözeltisi ile renk kırmızıdan maviye dönene kadar titre edilerek toplam sertlik miktarı belirlendi.

Organik madde tayini için havuzdan alınan 50ml lik su numunesi bir erlene boşaltıldıktan sonra içerisine 5 ml potasyum permanganat ve sülfürik asit bırakıldı. Daha sonra kaynamakta olan su banyosunda yarım saat bekletildi. Kaynatma işleminden sonra su

numunesinin rengini gidermek için 5 ml amonyum oksalat kondu. Daha sonra tekrar potasyum permanganat ile renk pembeye dönenene kadar titre edildi (Boyd, 1982).

### 3. 2. 3. Tıbbi sülük (*Hirudo medicinalis*)'ün Diseksiyonu

Araziden canlı olarak getirilerek su dolu bidonlar içerisinde yerleştirilen sülüklerin (Şekil 3.7) gerekli ağırlık ve boy ölçümleri yapıldı. Daha sonra sülüğün anterior (Şekil 3.8) ve posterior bölgelerinden itibaren 50 şer mg kas dokusu (Şekil 3.9) diseke edilerek birbirinden ayrı petri kutularına bırakıldı. Sülüklerden elde edilen anterior ve posterior bölgeler numaralanmış folyo zarflar içine koyularak hyaluronidaz aktivite analizleri yapılana kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.



Şekil 3. 7. Diseksiyonu yapılacak olan sülüklerin genel görünümü



Şekil 3. 8. *Hirudo medicinalis*'in anteriör bölgesi



Şekil 3. 9. *Hirudo medicinalis*'in posterör bölgesi

### 3.2.4. Hyaluronidaz Enziminin Hesaplanması İçin Standart Eğrinin Oluşturulması

*Hirudo medicinalis*'deki hyaluronidaz miktarının belirlenmesi için öncelikle bir hyaluronidaz standardından standart eğrinin ve denklemin belirlenmesi gerekmektedir. Bu standart eğrinin belirlenmesinde Wilkinson ve diğ. (1995) ile Tanyıldızı ve diğ. (2003)'den yararlanıldı. Standart eğrisinin belirlenmesinde N-asetilglukozamin'in 50, 100, 200 mg/L'lik hazırlanmış olan solusyonlar kullanıldı. Bu solusyonların her birinden 0,1 ml alınarak 15 ml'lik tüplere konuldu ve bunların üzerine 0,1 ml asetat tamponu ile 0,1 ml hyaluronik asit ilave edildi ve 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Etüvden çıkarılan tüpler içerisine bu kez 60 µl potasyumtetraborat bırakıldı ve tüplerin ağzı tekrar kapatılarak 100 °C de 5 dak. kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra tüpler buzlu suda soğutuldu. Sonra içerisine 2 ml dimetilaminobenzaldehit bırakılarak 37 °C de 20 dak. inkübe edildi. İnkübasyondan alınan örnekler 1500 Rpm de 10 dak. santrifüj edildi ve spektrofotometrede 582 nm de okundu, böylece hesaplamada kullanılacak sabit değer elde edildi ve standart eğrisi oluşturuldu. Belirlenen standart eğriye göre bir denklem elde edildi ve bu denkleme göre aylık olarak alınan sülük örneklerinde okunan değerler doğrultusunda hyaluronidaz miktarı tespit edildi. Standart eğriye göre elde edilen denklem aşağıdaki şekildedir.

$$\text{Hyaluronidaz } (\mu\text{mol/L}) \text{ Y} = 9687,9x + 30,744$$

$$R^2 = 0,9802$$

Bu formüle göre, aylık alınan sülüklerin anterior ve posterior bölgesindeki kas doku örnekleri spektrofotometrede 582 nm de okundu. Bu okumalar üç tekrar şeklinde yapıldıktan sonra ortalamaları alındı. Elde edilen ortalama absorbans değerleri elde edilen formüldeki x yerine koyularak hesaplama işlemi yapıldı.

### 3.2.5. Hyaluronidazın Tayin Yöntemi ve Hesaplanması

Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip Balık Üretim ve Araştırma tesisindeki sülük üretim ve yetiştirme havuzlarından temin edilen ve derin dondurucuda muhafaza edilen sülük dokuları alınarak 50 mg tartıldı ve makas ve bistüri yardımı ile parçalara ayrıldı. Parçalara

ayrılan dokunun homojenize edilmesi için 1/5 oranında 0,45 mol/L'lik NaCl ile karıştırılarak cam-cam homojenizatörde iyice ezildi. Elde edilen ekstrakt 2 ml lik ependrof tüpler içerisine bırakıldı ve Nüve marka soğutmalı santrifüj cihazına yerleştirilerek 10000 Rpm'de 30 dak. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatant bir pipet yardımıyla alınarak 15 ml'lik ayrı bir santrifüj tüpüne bırakıldı ve üzerine 0,1 ml pH sı 3,8 olan 0,3 mol/L'lik asetat tamponu ve 0,1 ml hyaluronik asit ilave edildi. Tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra Nüve EN 400 marka etüvde 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüpler içindeki doku ekstraksiyonları üzerine pH sı 10 olan 0,8 mol/L lik potasyumtetraborattan 60 µl eklendi ve tüplerin ağzı kapatıldı. Tüpler daha önce kaynamakta olan su dolu kaynatma kabı içerisine yerleştirilerek 100 °C de 5 dakika kaynatıldı. Kaynatmayı takiben örnekler buzlu suda soğutuldu. Daha sonra glacial asetik asit içerisine % 12,5 v/v oranında hidroklorik asit bırakıldı. Bu glacial ve hidroklorik asit karışımına da % 10 w/v olacak şekilde dimetilominobenzaldehit (DMAB) katılarak stok ayıraç oluşturuldu. Bu stok ayıraç kullanılacağı zaman 1/10 oranında glacial asetik asit ile sulandırıldı. Sulandırılmış DMAB tan 2 ml alınarak buzlu suda soğutulmuş örnekler üzerine ilave edildi ve tüpler tekrar 37 °C lik etüvde 20 dak. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan alınan örnekler tekrar 1500 Rpm de 10 dak. Santrifüj edildi. Santrifüjü takiben UV – spektrofotometre de hyaluronidaz mikrarının belirlenmesi için 582 nm'de örneklerin absorbansları okundu. Çalışma 3 tekrar şeklinde yapıldı ve hesaplamada bu tekrarların ortalaması kullanıldı.

### **İstatistiksel Analiz**

Çalışma alanından toplanan araştırmada kullanılan sülüklerin anterior ve posterior bölgelerinde tespit edilen hyaluronidaz düzeylerinin ortalamaları, standart sapmaları aritmetik ortalamaları ve standart hataları Minitab for Windows 10.1 adlı bilgisayar istatistik programı kullanılarak saptandı. Aylar arası hyaluranidaz dağılımı arasındaki önem Kruskal-Wallis testi ile araştırıldı. Önem saptanan parametrelere Mann-Whitney U testi uygulanarak önemin hangi aylar arasında olduğu belirlendi. Ağırlık, boy sıcaklık, sertlik, pH, organik madde miktarına göre sülüklerdeki hyaluronidazın dağılım grafikleri çıkarıldı.

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada Tıbbi Sülük *Hirudo medicinalis*'in anterior-posteriör bölgesinde hyaluronidaz miktarının aylık ve mevsimsel değişimi araştırıldı.

Çalışmada kullanılan 168 adet sülüğün ortalama ağırlıkları  $2.19 \pm 0.23$  g (1.04 -3.76 g), ortalama uzunlukları ise  $12.31 \pm 0.96$  cm (7 - 16 cm) olarak ölçüldü. Sülüklerin ağırlıkları en yüksek ( $2.50 \pm 0.71$  g) Eylül ayında, en düşük ise ( $1.88 \pm 0,57$  g) Haziran ayında belirlendi. Sülüklerin boyları ise Mart ayında en uzun ( $14.4 \pm 1.95$  cm), Nisan da ise en kısa ( $10.6 \pm 2.15$  cm) olarak tespit edildi (Tablo 4.1).

**Tablo 4. 1.** İncelenen *H.medicalis*'in sayısı, ortalama ağırlık ve uzunluk değerleri

Aylar	İncelen Sülük Sayısı	Ağırlık (g)	Boy Uzunluğu (cm)
Eylül	18	2,502±0,71	13,4±2,00
Ekim	18	1,970±0,49	11,9±2,54
Şubat	3	2,040±0,55	12,3±1,27
Mart	17	2,353±0,62	14,4±1,95
Nisan	21	2,197±0,46	10,6±2,15
Mayıs	25	2,416±0,52	11,5±2,57
Haziran	24	1,889±0,57	12,5±2,10
Temmuz	22	2,449±0,53	13,2±2,22
Ağustos	20	1,978±0,61	11,4±2,24

Çalışma alanı olan Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip Balık Üretim ve Araştırma tesisindeki sülük üretim ve yetiştirme havuzlarından her ay düzenli olarak alınan su örneklerinin kimyasal özellikleri incelendi. Havuzlarda çözülmüş oksijen miktarı aylara göre 5.11- 11.90 mg/L, pH 7.00-8.71, sıcaklık 3-26 °C, toplam sertlik 340-425 mg CaCO<sub>3</sub>/L ve organik madde 2-4 mg/L arasında belirlendi (Tablo 4.2).

**Tablo: 4.2** Suyun kimyasal özelliklerinin aylara göre dağılımı

Aylar	Sıcaklık (°C)	Ç. O	pH	T.S	O.M
Eylül	18	6,95	8,08	370	4
Ekim	14	9,16	8,10	365	3
Kasım	10	5,11	8,08	340	3
Aralık	3	12,0	8,16	357	4
Ocak	4	11,90	8,13	350	2
Şubat	5	11	8,10	365	3
Mart	8	11,2	8,71	342	2
Nisan	12	9,50	8,33	353	4
Mayıs	14	9,00	8,24	346	4
Haziran	20	8,80	8,42	350	4
Temmuz	24	8,08	7,00	425	3
Ağustos	26	7,60	8,13	416	3

**Ç.O:** Çözülmüş Oksijen (mg/l) **T.S :** Toplam sertlik (mgCaCO<sub>3</sub>/L) **O.M :** Organik madde (mg/l)

#### 4. 1. Aylık Hyaluronidaz Miktarı

Çalışmada kullanılan sülüklerin aylara göre hyaluronidaz miktarının değişimi incelendi. Hyaluronidaz miktarı en yüksek ( $1692,68 \pm 288,32 \mu\text{mol/L}$ ) Mart ayında bulundu. Bu dönemdeki sülüklerin anterior kısmındaki hyaluronidaz miktarı  $1696,22 \pm 317,37 \mu\text{mol/L}$ , posterior kısmında ise  $1689,15 \pm 273,39 \mu\text{mol/L}$  olarak tespit edildi. Bu aydaki ortalama değer ise  $1692,68 \pm 288,32 \mu\text{mol/L}$  olarak bulundu. Aylara göre hyaluronidaz miktarı Mayıs ayında  $1070,32 \pm 326,73 \mu\text{mol/L}$ , Ağustosda  $752,90 \pm 489,03 \mu\text{mol/L}$ , Temmuzda  $749,50 \pm 298,45 \mu\text{mol/L}$ , Nisanda  $601,05 \pm 322,27 \mu\text{mol/L}$ , Ekimde  $454,21 \pm 71,76 \mu\text{mol/L}$ , Şubatta  $445,60 \pm$

79,67 µmol/L, Haziranda 442,27 ± 11,14 µmol/L ve Eylül ayında 318,73 ± 69,54 µmol/L olarak belirlendi (Tablo 4.3).

Mart ayındaki Hyaluronidaz miktarı diğer aylardan istatistiksel olarak farklı bulundu ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ). Aylara göre hyaluronidaz aktivitesindeki farklılığın istatistiksel olarak önemi Tablo 4.3. de verilmiştir ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ).

**Tablo: 4. 3.** *Hirudo medicinalis*'in anterior, posterior ve totalindeki hyaluronidaz miktarı

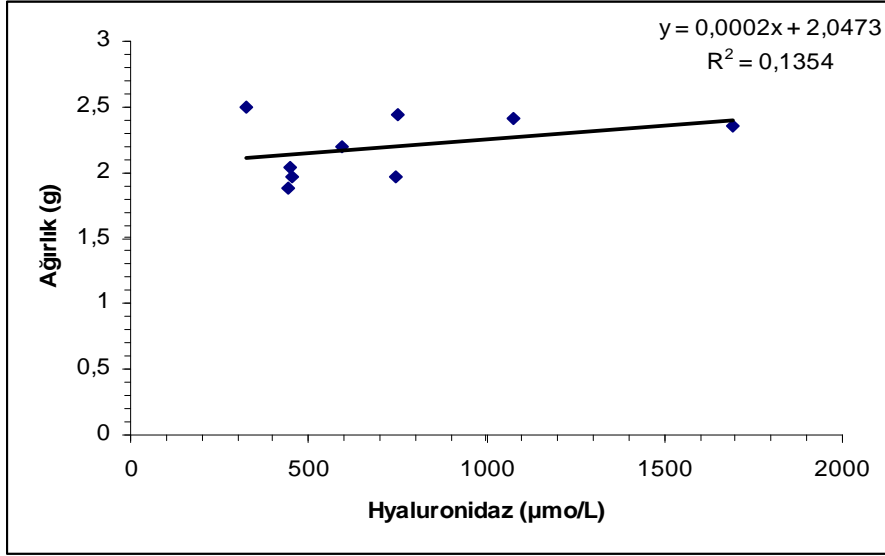
<b>Hyaluronidaz Miktarı (µmol/L)</b>			
<b>Aylar</b>	<b>Anteriör</b>	<b>Posteriör</b>	<b>Ortalama ± SD</b>
<b>Eylül</b>	322,61±84,09	298,69±36,39	318,73±69,54
<b>Ekim</b>	421,08±72,27	487,34±56,64	454,21±71,76 <sup>a1</sup>
<b>Şubat</b>	460,06±77,13	431,14±96,40	445,60±79,67 <sup>a1</sup>
<b>Mart</b>	1696,22±317,37	1689,15±273,39	1692,68±288,32 <sup>c1, 7, 3, 2, 5, 8, 9,</sup> b 6
<b>Nisan</b>	602,50±339,48	599,61±322,49	601,05±322,27 <sup>b1, 7, 3, 2</sup>
<b>Mayıs</b>	1239,65±293,14	900,99±275,18	1070,32±326,73 <sup>c1, 7, 3, 2, b 5, a</sup> 8, 9
<b>Haziran</b>	446,22±155,02	438,31±148,68	442,27±144,14 <sup>a1</sup>
<b>Temmuz</b>	761,86±333,13	737,13±293,42	749,50±298,45 <sup>c 1, b 7, 3, 2</sup>
<b>Ağustos</b>	770,94±454,97	734,86±545,12	752,90±489,03 <sup>c 1, b 7, 3, 2</sup>

1: Eylül, 2: Ekim, 3: Şubat 4: Mart, 5: Nisan 6: Mayıs, 7: Haziran, 8: Temmuz, 9: Ağustos

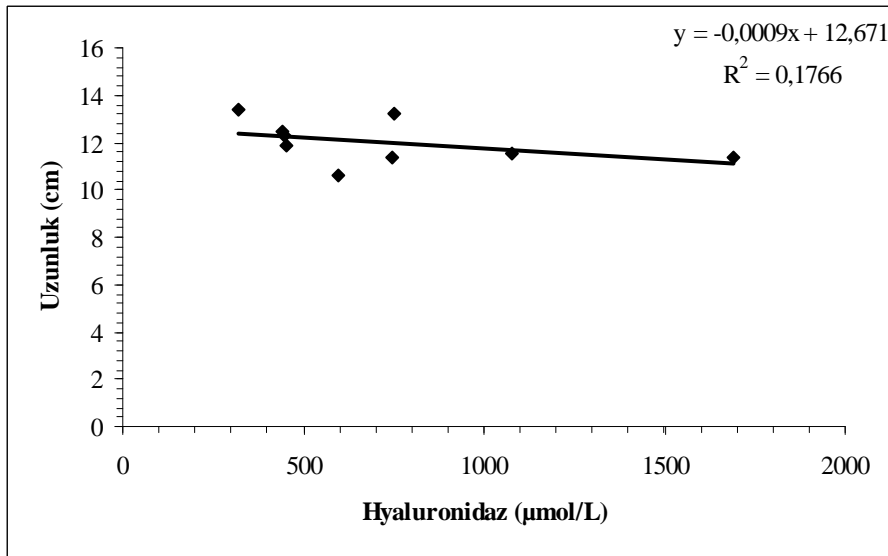
a:  $p<0.05$ , b:  $p<0.01$ , c:  $p<0.001$

Sülük ağırlığına bağlı olarak hyaluronidaz miktarının değişimi anterior ve posterior bölgeye göre incelendiğinde istatistiksel olarak farkın önemli olmadığı görüldü ( $p>0.05$ ). Yapılan korelasyon analizinde pozitif yönlü zayıf bir ilişki ( $r= 0.0179$ ) tespit edildi (Şekil 4.1)

Sülük boyuna bağlı olarak hyaluronidaz miktarının değişimi anterior ve posterior bölgeye göre incelendiğinde istatistiksel olarak farkın önemli olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ). Yapılan korelasyon analizinde pozitif yönlü zayıf-orta derecede bir ilişki ( $r= 0.4202$ ) belirlendi (Şekil 4.2)

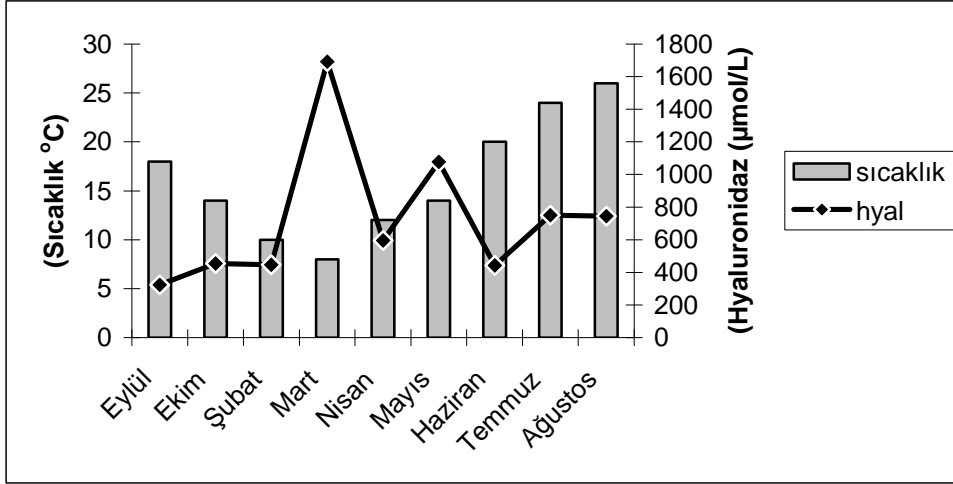


Şekil 4. 1. *H.medicinalis*'in ağırlığına göre hyaluronidaz miktarındaki dağılımı

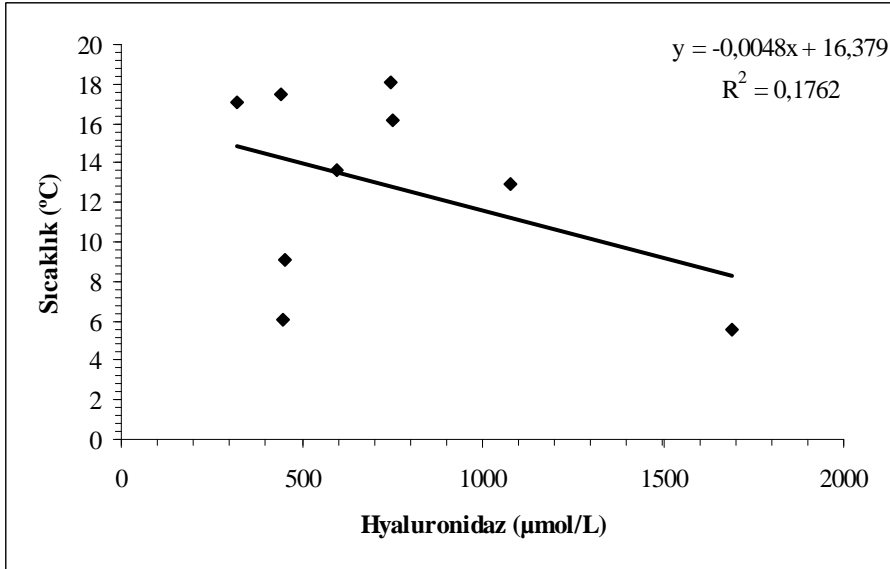


Şekil 4.2. *H.medicinalis*'in uzunluğuna göre hyaluronidaz miktarındaki dağılımı

Su sıcaklığına bağlı olarak hyaluronidaz miktarının değişimi anterior ve posterior bölgeye göre incelendiğinde istatistiksel olarak farkın önemli olmadığı görüldü ( $p>0.05$ ). Yapılan korelasyon analizinde pozitif yönlü zayıf-orta derecede ( $r=0.4197$ ) bir ilişki bulundu (Şekil 4.3, Şekil 4.4).



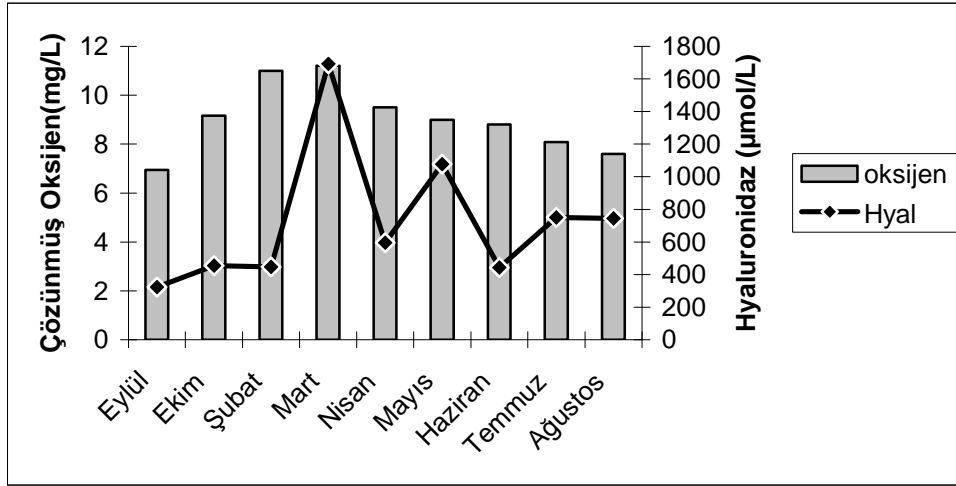
Şekil 4.3. *H. medicinalis*'teki hyaluronidazın su sıcaklığına bağlı olarak değişimi



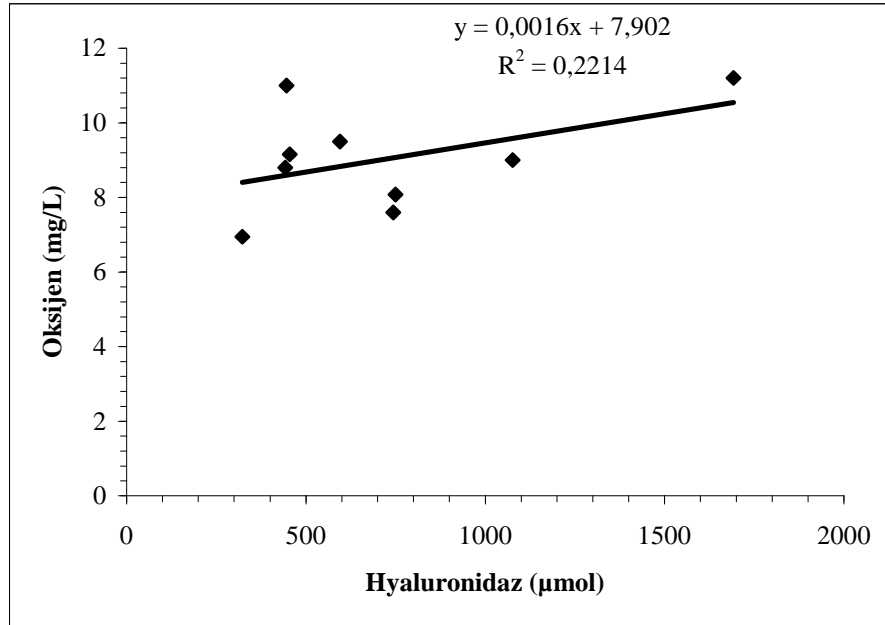
Şekil 4.4. *H. medicinalis*'teki hyaluronidazın su sıcaklığına bağlı olarak dağılımı

Çözülmüş oksijen miktarına göre hyaluronidaz miktarının değişimi anterior ve posterior bölgeye göre incelendiğinde istatistiksel olarak farkın önemli olmadığı saptandı

( $p>0.05$ ). Yapılan korelasyon analizinde pozitif yönlü zayıf ( $r=0.4705$ ) bir ilişki tespit edildi (Şekil 4.5, Şekil 4.6)

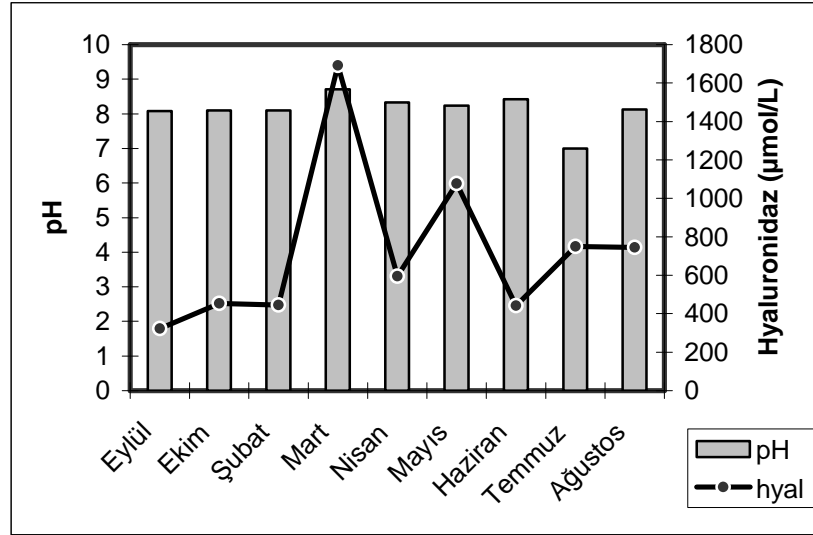


Şekil 4.5. *H. medicinalis*'teki hyaluronidazın çözünmüş oksijen miktarına bağlı olarak değişimi

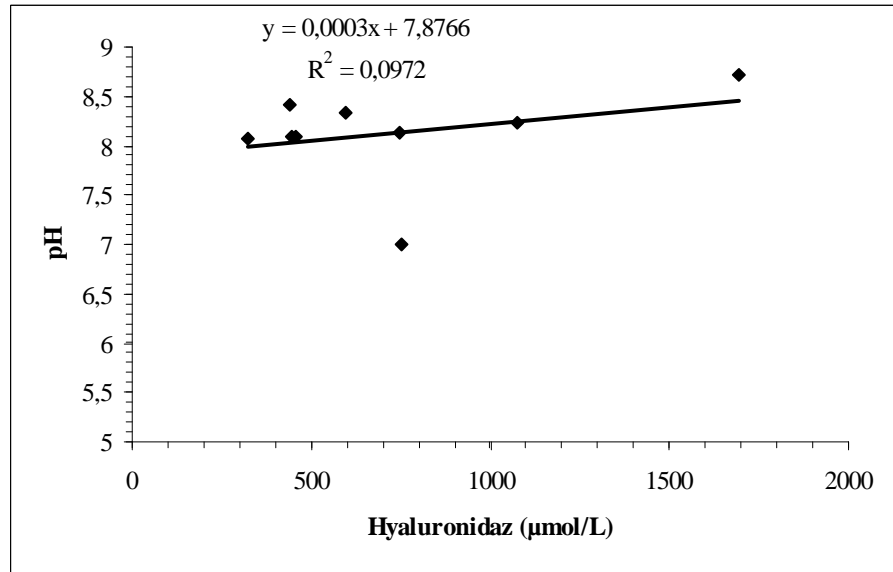


Şekil 4.6. *H. medicinalis*'teki hyaluronidazın çözünmüş oksijen miktarına bağlı olarak dağılımı

Hyaluronidaz miktarının pH'ya bağı olarak değişimi anterior ve posterior bölgeye göre incelendiğinde istatistiksel olarak farkın önemli olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ). Yapılan korelasyon analizinde pozitif yönlü zayıf-orta derecede ( $r=0.311$ ) bir ilişki görüldü (Şekil 4.7, Şekil 4.8)

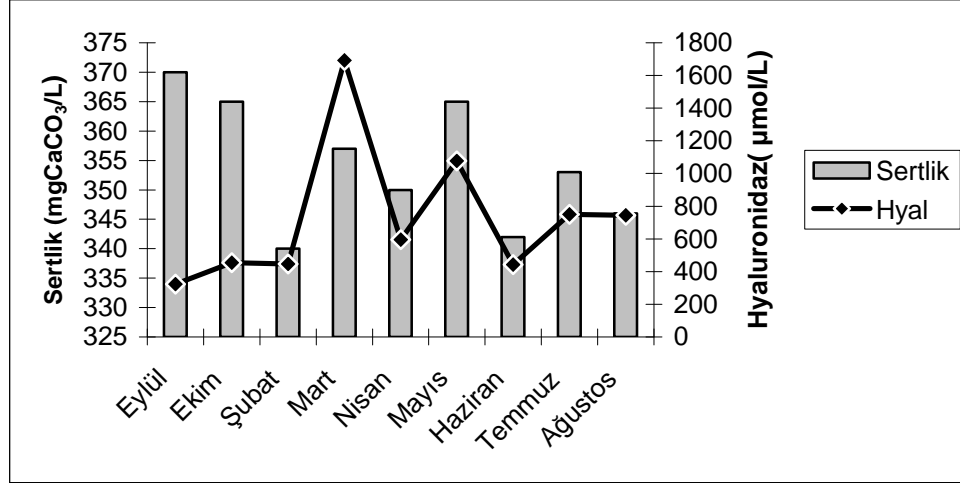


Şekil 4.7. *H. medicinalis*'teki hyaluronidazın pH miktarına bağı olarak değişimi

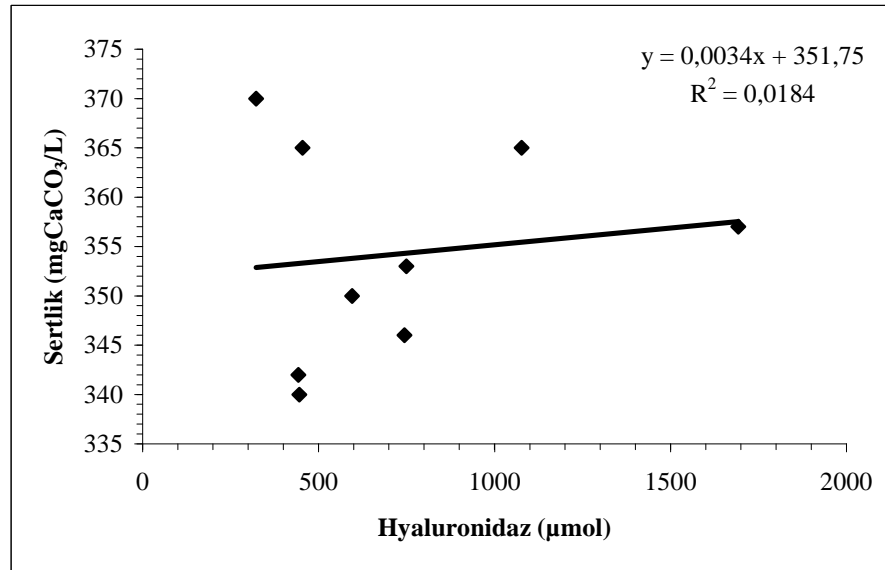


Şekil 4.8. *H. medicinalis*'teki hyaluronidazın pH miktarına bağı olarak dağılımı

Toplam sertliğe göre hyaluronidaz miktarının değişimi anterior ve posterior bölgeye göre incelendiğinde istatistiksel olarak farkın önemli olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ). Yapılan korelasyon analizinde pozitif yönlü zayıf ( $r=0.135$ ) bir ilişki saptandı (Şekil 4.9, Şekil 4.10).

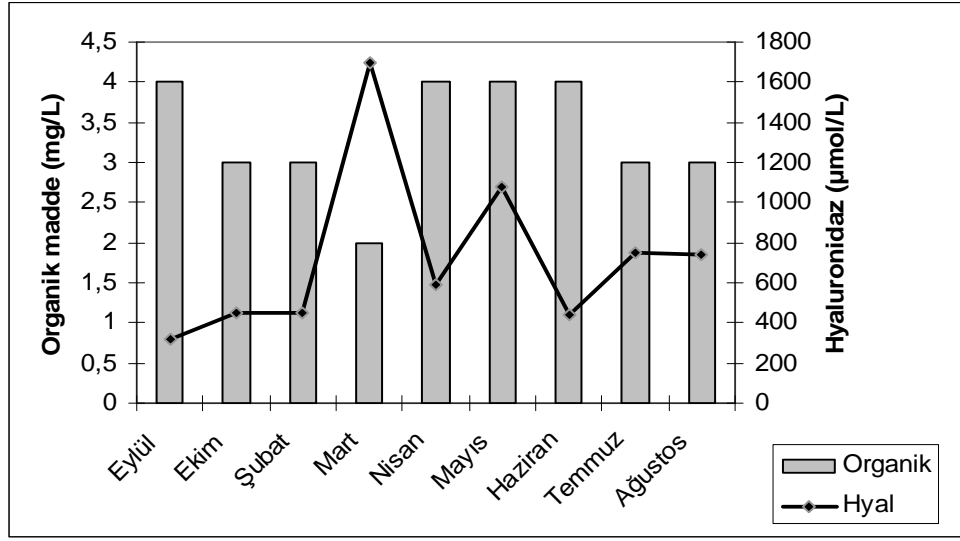


Şekil 4.9. H. medicinalis'teki hyaluronidazın sertlik miktarına bağlı olarak değişimi

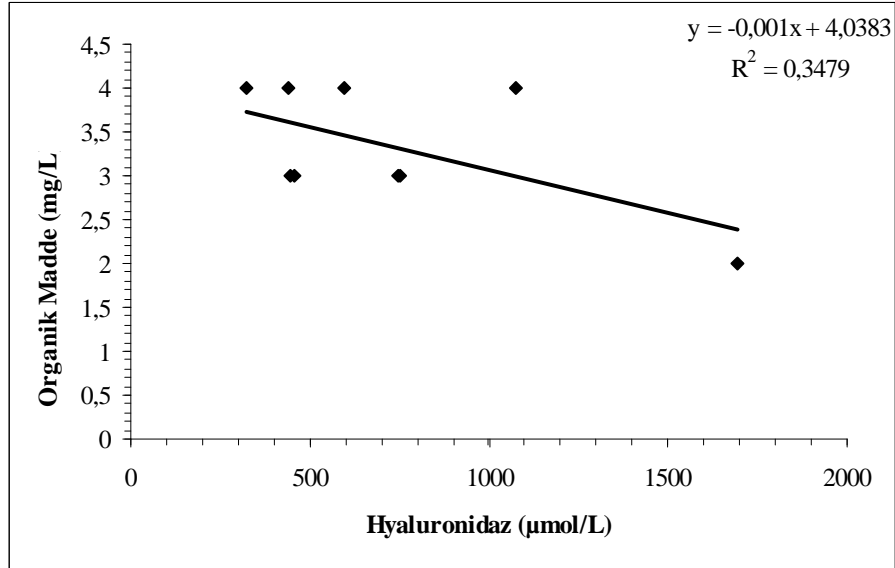


Şekil 4.10. H. medicinalis'teki hyaluronidazın sertlik miktarına bağlı olarak dağılımı

Organik madde dağılımına göre hyaluronidaz miktarının değişimi anterior ve posterior bölgeye göre incelendiğinde istatistiksel olarak farkın önemli olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ). Yapılan korelasyon analizinde pozitif yönlü iyi ( $r=0.589$ ) bir ilişki olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11, Şekil 4.12)



Şekil 4.11. *H. medicinalis*'teki hyaluronidazın organik madde miktarına bağlı olarak değişimi



Şekil 4.12. *H. medicinalis*'teki hyaluronidazın organik madde miktarına bağlı olarak dağılımı

#### 4. 2. Mevsimsel Hyaluronidaz Miktarı

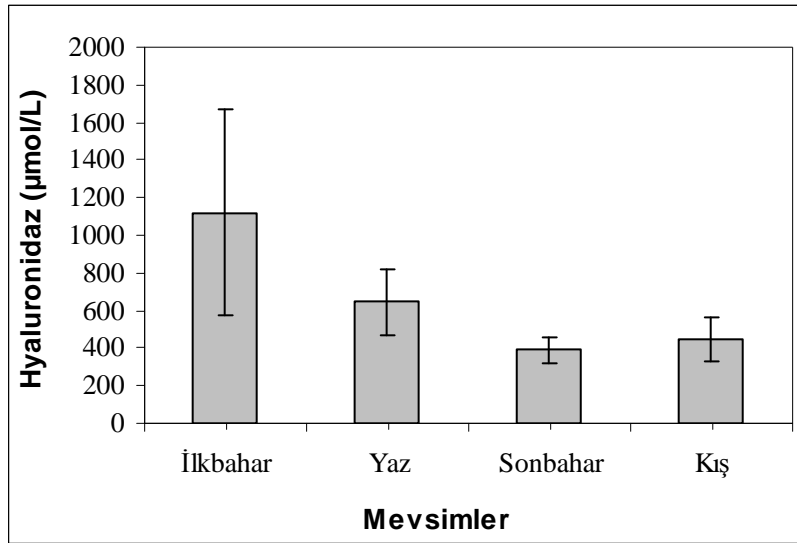
Mevsimsel olarak sülüklerdeki hyaluronidaz düzeylerine bakıldığında ilkbahar mevsiminde en yüksek ( $1121,307 \pm 550,32 \mu\text{mol/L}$ ) bulundu. Daha sonra sırasıyla bu değerler yaz mevsiminde  $645,18 \pm 175,82 \mu\text{mol/L}$ , kışın  $445,60 \pm 119,56 \mu\text{mol/L}$  ve sonbahar mevsiminde  $388,74 \pm 65,76 \mu\text{mol/L}$  olarak saptandı (Tablo 4.4, Şekil 4.13).

**Tablo 4.4.** Mevsimlere göre Hyaluronidaz düzeyindeki değişim

Mevsimler	Hyaluronidaz Düzeyi ( $\mu\text{mol/L}$ )
Sonbahar	$388,74 \pm 65,76$
Kış	$445,60 \pm 119,56^{a1}$
İlkbahar	$1121,307 \pm 550,32^{c1,2,4}$
Yaz	$645,18 \pm 175,82^{b1, a2}$

1: Sonbahar, 2: Kış, 3: İlkbahar, 4: Yaz a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.01$ , c:  $p < 0.001$

İlkbahar mevsimindeki Hyaluronidaz miktarı diğer mevsimlerden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). Mevsimlere göre hyalunoridaz aktivitesindeki farklılığın istatistiksel olarak önemi Tablo 4.3. de verilmiştir ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ).



**Şekil 4. 13.** Hyaluronidaz miktarının mevsimlere göre dağılımı

## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada; spektrofotometrik yöntemle, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip balık üretim ve araştırma tesisindeki sülük üretim havuzlarından temin edilen tıbbi sülük *Hirudo medicinalis*'in kas dokusunda hyaluronidaz düzeyleri ve aylara göre dağılımı araştırıldı.

Hyaluronidaz memelilerden, farelerin karaciğerinden, bakterilerden, insan plesantasından, civcivlerin fibroblastından, yılan, karides, sülük dokularından ve boğa ile diğer bazı memeli hayvanların spermallerden elde edilebilmektedir (Sawyer, 1986; Wilkinson ve diğ., 1995; Frost ve diğ., 1997; Krishnapillai ve diğ., 1998; Hovingh ve Linker, 1999; Toida ve diğ., 1999; Meyers 2001; Kudo ve Tu 2001; Tanyıldızı ve diğ., 2003; Bozkurt ve diğ., 2003). Bu çok farklı hayvan guruplarındaki hyaluronidaz seviyesinin belirlenmesinde bilim adamları farklı yöntemler kullanmıştır. Dünyada ve ülkemizde yapılan birçok çalışmada hyaluronidaz aktivitesinin tespitinde klorometrik, florimetrik, viskosimetrik ve HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır (Linker ve diğ., 1959; Frost ve diğ., 1997; Menzel, 1998; Krishnapillai ve diğ., 1998; Kudo ve diğ., 2001; Ikegami ve diğ., 2002; Mayumi, 2002; Oettly ve diğ., 2002; Takashi ve diğ., 2003). Hem ekonomik olması hem de kullanım pratikliği açısından spektrofotometrik metot oldukça yaygındır. Dünyada ve ülkemizde yapılmış birçok çalışmada (Wilkinson ve diğ., 1995; Hovingh ve Linker, 1999; Tanyıldızı ve Bozkurt, 2001; Alkrad ve diğ., 2002; Bozkurt ve diğ., 2003) bu yöntem kullanılmıştır. Yürütülen bu çalışmada da *Hirudo medicinalis*'teki hyaluronidaz miktarının aylık olarak değişiminin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntem başarılı bir şekilde kullanılmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada Kasım, Aralık, Ocak aylarında sülük örneklerinin bulunmamasının nedeni sülüklerin bu aylar boyunca toprak altına çekilmesine bağlanmıştır. Yine Şubat ayında da yok denecek kadar az sülük örneğine rastlanmıştır. Brown (1967), Halton (1989), Davies (1991), Wilkin ve Scofield (1991) ve Sağlam (2000) sülüklerin kışın suların soğumasıyla birlikte toprağın derinliklerinde yuvalar açarak buralara çekildiklerini, ilkbaharda ise sıcaklığın artışı ile uyarılarak yumurta bıraktıklarını ifade etmişlerdir. Bu sonuç araştırmacıların verdikleri bilgilerle paralellik göstermektedir.

Bayomy ve diğ. (2001) yapmış oldukları çalışmada hibernasyon ve estivasyon görülen gerek omurgalı gerekse omurgasız hayvanlarda bu sürenin bitiminden sonra vücut yapılarındaki kan ve hyaluronidaz aktivitesinde daha fazla artış olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da İlkbaharın başladığı Mart ayında sıcaklığın artmaya başlaması ile birlikte toprağın derinliklerinden çıkmaya başlayan sülüklerden alınan örneklerde hyaluronidaz aktivitesinin

diğer aylara göre çok daha yüksek olduğunun tespit edilmesi Bayomy ve diğ. (2001) ile uyum göstermektedir.

Sülüklerdeki hyaluronidaz aktivitesinin belirlenmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada (Hovingh ve Linker; 1999), hyaluronidaz'ın en fazla sülüğün anteriör kısmında olduğu belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada da her ay düzenli olarak alınan sülük örneklerinde tespit edilen hyaluronidaz miktarının anteriör bölgede posteriördekiye göre fazla olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Bu sonuç Hovingh ve Linker; 1999 ile uyum içindedir.

Bingöl (1977), Bayşu (1979), Menteş (1986), Kaya (1993) ve Pamuk (2000) enzimlerin reaksiyon hızının sıcaklık ile doğru orantılı olarak artış gösterdiğini ifade etmişlerdir. Fakat yapılan bu çalışmada hyaluronidaz düzeyinin, sıcaklığın en yüksek olduğu Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarına göre sıcaklığın daha düşük olduğu Mart ayında en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiki analiz sonucuna göre de sıcaklık ile hyaluronidaz arasında pozitif yönlü zayıf-orta derecede bir ilişkinin bulunduğu belirlenmiştir.

Sülüklerin gerek kendileri ve gerekse onlardan elde edilen enzimlerden biri olan hyaluronidaz insan tedavisinde aranılan ilaçlar olarak yer almıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada dünyada önemli bir pazarı bulunan ve ülkemizde de bulunan Tıbbi sülük *Hirudo medicinalis*'in kas dokusundaki hyaluronidaz aktivitesi aylık ve mevsimsel olarak tespit edilmiştir. *Hirudo medicinalis*'ten hyaluronidazın elde edilmesi düşünüldüğünde kış uykusundan çıkan sülüklerin toplanarak değerlendirilmesi hyaluronidazın elde edilmesi açısından uygun olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Alkrad, J., Mrestani, Y., Strehl, D., Wartewing, S. and Neubert, R., 2003. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31: 545-550.
- Barnes, R.D., 1987. *Invertebrate Zoology*, WB.Saunders Compony. Philadelphia, Washington, pp. 233-316
- Bayom, M., Shalan, A., Bradshaw, S., Withers, P., Stewart, T., Thompson, G., 2001. Water content, body weight and acid mucopolysaccharides, hyaluronidase and  $\beta$ -glucuronidase in response to aestivation in Australian desert frogs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 131: 881-892
- Bayşu, N., 1979. *Temel Biyokimya*. Atatürk Üniv. Basımevi, Ankara, 577s.
- Bingöl, G., 1978. *Ankara Üniv. Ecz. Fakültesi Yayınları*. Ankara Üniv. Basımevi, Ankara, 366s.
- Bonazinga, M., 1995. *Medicinal Leeches, Restoring venous circulation in osmetic, plastic and reconstructive surgery*. Leeches U.S.A. Ltd. 12p.
- Boyd, C.E., 1982. *Water Quality Management for Pond Fish Culture*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York, 318 pp.
- Bozkurt, T., Tanyıldızı, S. and Türk, G., 2003. Effect of levamisole on hyaluronidase and sperm characteristics in rams. *Theriogenology*, 62: 323-329.
- Brown, Jr.f.A., 1967. *Selected Invertebrate Types*. John Wiley and Sons. New York, London, Sdney, pp. 271-317
- Canpolat, İ., Sağlam, N., 2004. Yaygın hematomu bulunan bir köpeğin tıbbi sülük *Hirudo medicinalis* ile sağaltımı, Fırat Üniversitesi Doğu Anadolu Bölgesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Elazığ, 2,2, 98-100.
- Çağlar, M., 1973. *Omurgasız Hayvanlar*. İstanbul Üniv.Yayımlarından Sayı: 1803, Fen Fak. Sayı:115, 1. Kısım. 2. Baskı, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 419 s.
- Davies, R.W., 1991. *Annelida, Leeches, Polychates and Acanthobdellids, Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrate* (eds. Thorp, J. H. and Covich, P.), Second edition. Academic press. Canada, pp. 437-479
- Davies, R.W., and Govedich, F.R., 2001. *Annelida: Euhirudinea and Acanthobdellidae. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrate* (eds. Thorp, J. H. and Covich, A. P.), Second edition. Academic press. USA. pp. 465-504
- Demirhan, A., 1979. *Folklorik Tıpta Sülük Kullanımı ve Evrimsel Gelişimi*. İstanbul Tıp Fak. Mecmuası Sayı: 42, 523-529.

- Demirsoy, A., 1982. Yaşamın Temel Kuralları/Omurgasızlar, Meteksan A.Ş. Ankara, 139-158s.
- Dörücü, M., 1990. Cip Tesisine Gelen ve Çıkan Sularda, Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerin Sene İçindeki Değişimleri'nin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Elazığ, 38 s.
- Eldor, A., Orevi, M., Rigbi, M., 1996. The Role of the Leech in Medical Therapeutics. The Hebrew University of Jerusalem, Israel, pp. 201-209
- Elliott, J.M., and Mann, K.H.,1979. British Freshwater Leeches with Notes On Their Life Cycles and Ecology, Department of Biology Dalhousie University.Canada, 60p.
- Frost, G., Csoka, T., Wrong, T. and Stern, R., 1997. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. Biochemical and Biophysical Research Communications 236: 10-15.
- Geldiay, R., Geldiay, S., 1991. Genel Zooloji. Ege Ün. Basımevi. İzmir, 453s.
- Gönenç, B., 2000. Sülüklerin Genel Özellikleri, Patogenite ve Tedavi Şekilleri. Kafkas Ün. Veteriner Fak. Dergisi, 6(1-2); 137-144.
- Halton, C.M., 1989. Those Amazing Leeches. Dillon Press. Minneapolis, Minnesota, 120 p.
- Hovingh, P. and Linker, A., 1999. Hyaluronidase activity in leeches (Hirudinea). Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 124: 319-326.
- Ikegami, M., Takahashi, T., 2002. Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity, Analytical Biochemistry 311: 157- 165
- Kaya, N., 1993. Biyokimya. Erzurum, Kars Veteriner Fak. Yayınları No: 2. Atatürk Ün. Basımevi 292 s.
- Keasner, A., 1967. Invertebrate Zoology, Volume 1., Interscience Publishers, A Division of John Wiley And Sons. New York, London, Sdney, 597 p.
- Krishnapilla, A.M., Taylor, A., Morris, A. E. and Quantick, P., 1999. Extraction and purification of hyaluronoglucosidase from Norway lobster (Nephrops norvegicus). Food Chemistry, 65: 359-365.
- Kudo, K., Tu, A., 2001. Characterization of hyaluronidase isolated from Agkistrodon contortrix contortrix (Southern Copperhead) venom. Archives of Biochemistry and Biophysics, 386: 154 162
- Linker, A., Meyer, K., Hoffman, P., 1959. The production of hyaluronate oligosaccharides by leech hyaluronidase and alkali. The Journal of Biological Chemistry, 235: 924-927
- Lutz, F.E., Galtsoff, P., Welch, P., Needham, J.G., 1959. Culture Methods For Invertebrate Animals. Manufactured in the United States of America Dover Publications, Inc. New York, 590p.

- Mayumi, I., Takashi, T., 2002. Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry*, 331: 157-165
- Menteş, N., Menteş, G., 1986. Harper'in Biyokimya'ya Bakışı. Ege Üniv. Basımevi, İzmir 442s.
- Menzel, E., Farr, C., 1998. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: Biochemistry, biological activities an therapeutic uses. *Cancer Letters*, 131: 3-11
- Meyers, S., 2001. Equine sperm-occyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase *Animal Reproduction Science*, 68: 291-303
- Moore, J., 2001. Introduction to the Invertebrates. Emeritus Fellow of Newhall, Cambridge, And Researcher, Department of Zoology.London, pp. 201-204
- Oettly, M., Hoehstetter, J., Asen, I., Benhardt, G., Buschauer, A., 2003. Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from streptococcus agalactiae in pharmaceutical preparations. *Eropean Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18: 267-277
- Pamuk, F., 2000. Biyokimya. Gazi Kitabevi, Ankara, 322 s.
- Pennak, R.W., 1991. Freshwater Invertebrates of the United States Protozoa of Mollusca, Emeritus of Biology University of Colorado. New York, pp. 314-334
- Rao, J., Whitaker, I.S., 2003. Use of *Hirudo medicinalis* by Maksillofacial Surgical Units in the United Kingdom, pp. 54-55
- Sağlam, N., 1994. Sülükler ve Balıklarla İlişkisi. Doktora Semineri, Elazığ. 34 s.
- Sağlam, N., 2000. Sülük Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri.Ticari Balık Türlerinin Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri Hizmet İçi Eğitim Semineri 1-5 Mayıs. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Su Ürünleri Daire Başkanlığı, Ankara. 51-56.
- Sağlam, N., 2004.Sülük Yetiştiriciliği. Lisansüstü Ders Notları. Elazığ.
- Sağlam, N.ve Sarıeyyüpoğlu, M. 1998.Tatlısu Sülüğü (*Nephelopsis obscura*)'nün Biyolojisi, Morfolojisi, Bazı Kimyasak Maddelerle Kontrolü ve Alabalığa (*Oncorhynchus mykiss*) Olan Etkisi. F. Ü. Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi, 10(2), Elazığ, 105-123s. (Doktora Tezinden,Özetlenmiştir).
- Sawyer, R.T., 1986. Leech Biology and Behaviour. Oxford Science Publications, 1065 p.
- Saygı, G., 2002. Temel Tıbbi Parazitoloji. Cumhuriyet Üniv. Tıp Fak. Parazitoloji Anabilim Dalı,Esnaf Ofset Matbaası. Sivas, 260s.
- Smith, D.G., 2001. Pennak's Freswater Invertebrates of the United States Rotifera to Crustasea . John wiley and sons, New York, 638 p.

- Şen. B., Çelikkake. S., Erbaş. S., Yazar. Y., Hobanoğlu. M., vd. 2001. Elazığ . Sülük, Midye ve Kurbağa Yetiştiriciliği, Ekonomi Kurultayı. Elazığ Eğitim, Sanat, Kültür, Tanıtma, ve Hizmet Vakfı, Elazığ. 167-176 s.
- Takahashi, T., Kawai, I., Okuda, R. and Suzuki, K., 2003. A fluorimetric Morgan – Elson assay method for hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry* 322: 257 -263.
- Tanyıldızı, S., and Bozkurt, T., 2001. Effects of progesterone and testosterone on the Hyaluronidase activities and sperm characteristics in sheep. *Turk J Vet Anim Sci*, 26: 1137-1143.
- Tanyıldızı, S., and Türk, G., 2003. The effect of diminazene aceturate and ceftriaxone on ram sperm. *Turk J Vet Anim Sci*, 61: 529 – 535.
- Toida, T., Ogita, Y., Suzuki, A., Toyoda, H., Imanari, T., 1999. Inhibition of hyaluronidase by fully o-sulfonated glycosaminoglycans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 370: 176-182.
- URL 1 Hirudo. <http://www.biol.paisley.ac.uk/biomidia/gallery/hirudo>
- URL 2, Hirudo medicinalis. [www.populermedical.com/suluk/htm](http://www.populermedical.com/suluk/htm)
- URL 3, The Digestive Tract Symbiosis of Aeromonas. <http://sp.ucon.edu>
- URL 4, Blutegeltherapie. [www.homepageswhich.edu](http://www.homepageswhich.edu)
- URL 5, Annelida-Hirudinea. <http://biodidak.bio.uottaaw.ca/thumbnails>
- URL 6, Hirudinea. [www.leeches.info/leechshop.htm](http://www.leeches.info/leechshop.htm)
- URL 7, The Reasons for an Industrial Breeding of Medicinal Leeches. [www.leeches.-medicinalis.com/searchemicine.htm](http://www.leeches.-medicinalis.com/searchemicine.htm)
- URL 8, Animalia. [www.bioweb.uwlax.edu/zoolab](http://www.bioweb.uwlax.edu/zoolab). Hirudinea.
- Wilkin, P.J., Scofield, A.M., 1991. The Structure of a Natural Population of the Medicinal Leech, *Hirudo medicinalis*, at Dungeness, Kent. Department of Biological Sciences, Collage (University of London), Wye, Ashford, pp. 539-546
- Wilkinson, C., Bower, L. and Warren, C., 1995. Measurement of hyaluronidase activity in normal human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 14: 707-712.

## ÖZGEÇMİŞ

Elazığ'da 01.03.1980 tarihinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'ne 1999 yılında kayıt yaptırđım ve aynı fakülteden 2003 yılında mezun oldum. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı'nda 2003 yılında yüksek lisans yapmaya başladım.

Ayşegül ŞAHİN

Yüksek Lisans Öğrencisi