

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROTOIURUS KRAEPELINI (VON UBISCH, 1922) (SCORPIONES: IURIDAE)
VE *AEGAEOBUTHUS GIBBOSUS* (BRULLI, 1832) (SCORPIONES:
BUTHIDAE) ZEHRİNİN BİYOFİLM ÜRETEN BAZI BAKTERİLER
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI

YAZAR
Hakan GENEÇİ

ORCID NUMARASI
0000-0001-9774-5559

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Halil KOÇ

SİNOP – 2021

TEZ KABUL

Hakan Geneci tarafından hazırlanan “***PROTOIURUS KRAEPELINI* (VON UBISCH, 1922) (SCORPIONES: IURIDAE) VE *AEGAEOBUTHUS GIBBOSUS* (BRULLI, 1832) (SCORPIONES: BUTHIDAE) ZEHRİNİN BİYOFİLM ÜRETEN BAZI BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**” başlıklı bu çalışma 12.07.2021 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak, jürimiz tarafından **YÜKSEK LİSANS tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan Dr. Öğr. Üyesi Zafer SANCAK
Kastamonu Üniversitesi/ Fen Edebiyat Fakültesi

İmza

Üye Dr. Öğr. Üyesi Halil KOÇ
Sinop Üniversitesi/ Fen Edebiyat Fakültesi

İmza

Üye Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YEĞİN
Sinop Üniversitesi/ Sağlık Hizmetleri. Meslek Yüksek Okulu

İmza

ETİK BEYANI

Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



ÖZET

PROTOIURUS KRAEPELINI (VON UBISCH, 1922) (SCORPIONES: IURIDAE) VE AEGAEOBUTHUS GIBBOSUS (BRULLI, 1832) (SCORPIONES: BUTHIDAE) ZEHRİNİN BİYOFİLM ÜRETEN BAZI BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, *Protoiurus kraepelini* ve *Aegaeobuthus gibbosus* akrep türleri araziden toplanarak zehir eldesi için laboratuvarında bakılmıştır. Akreplerden elektrostimulasyon tekniği kullanılarak zehirler alınarak taze ve liyofilize halde analize hazır hale getirilmiştir. Ham ve liyofilize zehirlerin bakterilere karşı gösterdiği antimikrobiyal etki, biyofilm oluşumu ve SDS-PAGE yöntemi ile protein molekül ağırlıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada üç adet Gram-pozitif, dört adet Gram-negatif bakteri ve iki adet fungus türü kullanılmıştır. İlk aşamada *P. kraepelini*'den alınan ham zehirlerin farklı konsantrasyonlarda mikroorganizmalar üzerine etkisinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. *P. kraepelini* ham zehrinin 1/1 konsantrasyonunda *S. aureus*'a karşı 17 mm zon çapı ölçülmüştür. Her iki türde liyofilize edilmiş akrep zehrinin etkisine bakıldığında ise *P. kraepelini*'ye ait liyofilize zehrin *A. gibbosus*'a göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Zehirlerin biyofilm giderim aktivitesine 96 kuyucuklu plate yöntemi ile bakılmış ve yine *P. kraepelini*'ye ait liyofilize ve ham zehir örneklerinin biyofilm oluşumunu önemli oranda engellediği gözlemlenmiştir. *A. gibbosus* zehir örneklerinin ise biyofilm oluşumuna azda olsa etki ettiği gözlemlenmiştir. Zehir örneklerinin molekül ağırlıklarının tespiti için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. *P. kraepelini* ham zehrinin ~8 - 277 kDa arasında, *A. gibbosus* ham zehrinin ise ~11 - 282 kDa arasında protein bant profilleri verdiği gözlemlenmiştir. Buna karşın, liyofilize zehir örneklerinin baskın birkaç bant dışında görünür bant profili oluşturmadığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre akrep zehirlerinin mikroorganizmalara karşı antibiyotik kullanımına alternatif olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumunun engellenmesi için etkili akrep zehirlerinin peptit fraksiyonlarına ayrılması planlanmakta ve aynı zamanda bu peptitlerden etkili olanların izole edilerek bu alanda kullanılması üzerine çalışmalar öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akrep zehri, Bakteri, Liyofilizasyon, Antimikrobiyal, Biyofilm, SDS-PAGE.

ABSTRACT

IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *PROTOIURUS KRAEPELINI* AND *AEGLAEOBUTHUS GIBBOSUS* VENOMS ON SOME BIOFILM-FORMING BACTERIA

In this study, scorpion species *Protoiurus kraepelini* and *Aegaeobuthus gibbosus* were collected from the field and fed in the laboratory for venom production. Venoms were taken from the scorpions using the electrostimulation technique and prepared for analysis in fresh and lyophilized form. It was aimed to determine the antimicrobial effect, biofilm formation and protein molecular weights of crude and lyophilized venoms against bacteria. Three Gram (+), four Gram (-) bacteria and two fungal species were used in the study. In the first stage, it was observed that the crude venoms taken from *P. kraepelini* had a high effect on microorganisms at different concentrations. A zone diameter of 17 mm was measured against *S. aureus* at 1/1 concentration of *P. kraepelini* crude venom. When the effect of lyophilized scorpion venom in both species was examined, it was observed that the lyophilized venom of *P. kraepelini* was more effective than *A. gibbosus*. The biofilm removal activity of the poisons was examined by the 96-well plate and it was observed that the lyophilized and crude venom samples of *P. kraepelini* significantly inhibited the biofilm formation. It was observed that *A. gibbosus* venom samples had a slight effect on biofilm formation. SDS-PAGE method was used to determine the molecular weights of the venom samples. It was observed that the crude venom of *P. kraepelini* gave protein band profiles between ~8-277 kDa, and the crude venom of *A. gibbosus* between ~11-282 kDa. On the other hand, it was observed that lyophilized venom samples did not form a visible band profile except for a few dominant bands. According to the results obtained, it has been determined that scorpion venoms can be used as an alternative to the use of antibiotics against microorganisms. In order to prevent biofilm formation, it is planned to separate the effective scorpion venoms into peptide fractions, and at the same time, studies are planned to isolate the effective ones from these peptides and use them in this field.

Key Words: Scorpion venom, Bacteria, Lyophilization, Antimicrobial, Biofilm, SDS-PAGE.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Halil Koç'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Dr. Cumhuriyet Avşar'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme sonsuz teşekkürler ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
ÇİZELGELER LİSTESİ	vii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİ	3
2.1. Akrelerin Genel Özellikleri.....	3
2.2. Akrelerin Vücut Yapıları	3
2.3. Akrep Zehrinin Özellikleri.....	8
2.3.1. Akrep Zehrinin Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkisi	9
2.4. Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliği.....	9
2.4.1. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	9
2.5. Bakterilerde Biyofilm Üretimi	10
3. LİTERATÜR ÖZETİ	12
4.MATERYAL METOT	18
4.1. Akrelerin Toplanması	18
4.2. Akrelerin Bakımı ve Beslenmesi	18
4.3. Akrep Zehrinin Sağımı	18
4.3.1. Zehir Örneklerinin Liyofilizasyonu	19
4.3.2. Biyolojik Aktivite için Zehir Örneklerinin Hazırlanması	21
4.4. Mikroorganizmaların Hazırlanması	22
4.5. Antibiyogram	24
4.6. Biyofilm Aktivitesi	26
4.7. SDS-PAGE	27
4.7.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	30
5.BULGULAR.....	33
5.1. Antibiyogram	33
5.2. Zehir Örneklerinin Biyofilm Giderim Aktivitesi	37
5.3. SDS Page ile Akrep Zehirlerinin Molekül Ağırlıklarının Tespiti	42
6.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
KAYNAKÇA.....	48
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Akrelerin vücut bölgeleri üstten görünümü (♂ <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> , Muğla, Yatağan, Bencik Dağı).....	4
Şekil 2.2 Akrelerin vücut bölgeleri alttan görünümü (♂ <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> , Muğla, Yatağan, Bencik Dağı).....	5
Şekil 4.1 Laboratuvar ortamında akrelerin beslenmesi.	18
Şekil 4.2 Laboratuvar ortamında akrelerden zehir sağımı.	19
Şekil 4.3 Liyofilizasyon cihazı.	20
Şekil 4.4 Liyofilize edilmiş akrep zehrinin toz halinde görünümü.....	20
Şekil 4.5 <i>Protoiurus kraepelini</i> akrep zehrinin µg olarak seyreltilmesi.	21
Şekil 4.6 <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> akrep zehrinin µg olarak seyreltilmesi.....	22
Şekil 4.7 Çeşitli oranlarda seyreltilmiş <i>Protoiurus kraepelini</i> zehir örnekleri.	22
Şekil 4.8 Laboratuvar ortamında taze kültür hazırlama işlemi.	24
Şekil 4.9 Ortalama değerlerine (OD) göre mikroorganizmaların biyofilm üretim kapasitelerinin saptanmasında kullanılan yöntem.	27
Şekil 4.10 (A) <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> bant konumlarının belirlenmesi, (B). <i>Protoiurus kraepelini</i> bant konumlarının belirlenmesi, (C). Cleaver Prestained Blue Protein Ladder 50µl (Cat. CSL-BBL Sample) ait bant konumlarının belirlenmesi.....	28
Şekil 4.11 (A) <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> (B) <i>Protoiurus kraepelini</i> (C) Cleaver Prestained Blue Protein Ladder 50 µl (Cat. CSL-BBL Sample), bant konumlarının belirlenmesinde bantların oluşturmuş olduğu yoğunluğa bağlı piksel değerlerine göre bantların konumlarının belirlenmesi.	29
Şekil 4.12 (A) <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> (B) <i>Protoiurus kraepelini</i> 'de tespit edilen bantların moleküler ağırlıklarını gösteren tablo.....	30
Şekil 5.1 Disk difüzyon çalışmasına ait görüntü.	33
Şekil 5.2 <i>Protoiurus kraepelini</i> 'nin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış zehir örneğinin <i>S. aureus</i> 'a karşı aktivitesi.	34
Şekil 5.3 Mikroorganizmaların tüp yöntemi ile biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi.	37

Şekil 5.4 (A) %0,25 glikoz içeren Tryptic Soy Agar (TSB)'da hazırlanmış taze ve liyofilize edilmiş akrep zehirlerinin plate görüntüsü, (B) %2'lik kristal viyole ile boyandıktan sonra plate görüntüsü.	39
Şekil 5.5 Akrep ham zehirlerinin SDS-PAGE ile elektroforetik ayrımı.(A). <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> ham zehrine ait bant dizilimi, (B). <i>Protoiurus kraepelini</i> ham zehrine ait bant dizilimi, (C). Cleaver Prestained Blue Protein Ladder 50 µl (Cat. CSL-BBL Sample) ait bant dizilimi.	42
Şekil 5.6 Akrep liyofilize zehirlerinin SDS-PAGE ile elektroforetik ayrımı. (A). <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> liyofilize zehir ait bant dizilimi, (B). <i>Protoiurus kraepelini</i> liyofilize zehir ait bant dizilimi.	43



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 4.1 Çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar.	23
Çizelge 4.2 Antibiyotik diskleri.....	26
Çizelge 5.1 <i>Protoiurus kraepelini</i> zehrinin çeşitli konsantrasyonlarının mikroorganizmalar üzerine etkisi.	34
Çizelge 5.2 Liyofilize edilmiş akrep zehrinin mikroorganizmalar üzerindeki etkisi ve kontrol sonuçları.	36
Çizelge 5.3 Mikroorganizmaların biyofilm değerleri.	38
Çizelge 5.4 (A) <i>Protoiurus kraepelini</i> ham ve liyofilize zehrinin bakteri biyofilm oluşumu üzerine etkisi, (B) <i>Protoiurus kraepelini</i> spektrofotometre ortalama sonuçları ve biyofilm üretimleri.	40
Çizelge 5.5 (A) <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> ham ve liyofilize zehrinin bakteri biyofilm oluşumu üzerine etkisi, (B) <i>Aegaeobuthus gibbosus</i> spektrofotometre ortalama sonuçları ve biyofilm üretimleri.	41

***PROTOIURUS KRAEPELINI* (VON UBISCH, 1922) (SCORPIONES: IURIDAE) VE *AEGAEOBUTHUS GIBBOSUS* (BRULLI, 1832) (SCORPIONES: BUTHIDAE) ZEHRİNİN BİYOFİLM ÜRETEN BAZI BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**

1.GİRİŞ

Çağımızda mikroorganizma kaynaklı hastalıklar insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir. Mikroorganizmalara karşı kullanılan antibiyotiklere karşı gün geçtikçe çoklu ilaç direnci gelişmekte ve antibiyotiklerin antimikrobiyal etkinliği azalmaktadır. Bu duruma doz artışı da kalıcı bir çözüm getirmemektedir. Geleneksel antibiyotiklerin yanı sıra yeni nesil antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Cao ve ark., 2012a). Bu bağlamda, sentetik antimikrobiyal ajanların yol açtığı çoklu ilaç dirençlilik sorununu önlemek amacıyla istisnasız dünyanın her bölgesinde bitki ve hayvanlardan üretilen doğal antimikrobiyal ajanlar üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bahsi geçen araştırmalarda başta bitki ekstratlarının antimikrobiyal ve antikanser etkilerinin üstünde durulmuş, yılan, örümcek ve akrelerin tehlike anında kendilerini savunmak ve avlanmak amacıyla salgıladıkları zehirler de antimikrobiyal ve antikanser çalışmalarında kullanılmıştır.

Dünya yüzeyinde varlıkları geç Devoniyen(~435 milyon yıl) devrine kadar uzanan (Gess, 2013) akrelerin şu ana dek 16 akrep ailesine dâhil 1500 kadar tanımlanmış tür bulunmaktadır. Bunlardan 50'sinin medikal önemi olduğu bildirilmiştir. Bu türler tropikal ve subtropikal iklim kuşaklarında yaygın bulunmakta ve tüm dünyaya yayılmakta, insan ve hayvanların sağlığını tehdit eden anthropodalar olarak rapor edilmektedir (Özkan ve Karaer, 2004). Akrepler, tüm dünyanın büyük çoğunluğunda dağılışı ve zehirleri nedeniyle insanlar tarafından korkulan hayvanların başında gelir. Tür çeşitliliğine rağmen, bu akreplerden sadece çok azı potansiyel olarak insanlarda ölümcül olabilir. Akrep sokmasına bağlı olarak dünyada her yıl 3 milyon zehirlenme gerçekleşmektedir (Al-Asmari ve ark., 2017). Akrep zehri özelleşmiş zehir bezleri tarafından üretilir. Avlanma ve savunma için zehirlerini kullanırlar. Telson içinde iki tane zehir bezi ve ucunda ise yukarı kıvrık zehir iğnesi bulunmaktadır. Zehir bezindeki kanallar zehir iğnesinin ucundaki delikten dışarı açılmaktadır. İğneyi batırdıktan sonra zehrini bu açıklıktan deri içine enjekte etmektedir.

Bu alışmada *Protoiurus kraepelini* ve *Aegaeobuthus gibbosus* akrep türlerinden elde edilen zehir örneklerinin antimikrobiyal, antibiyofilm ve SDS-PAGE total protein analizine dayalı karakterizasyonlarının yapılması planlanmıştır.



2.GENEL BİLGİ

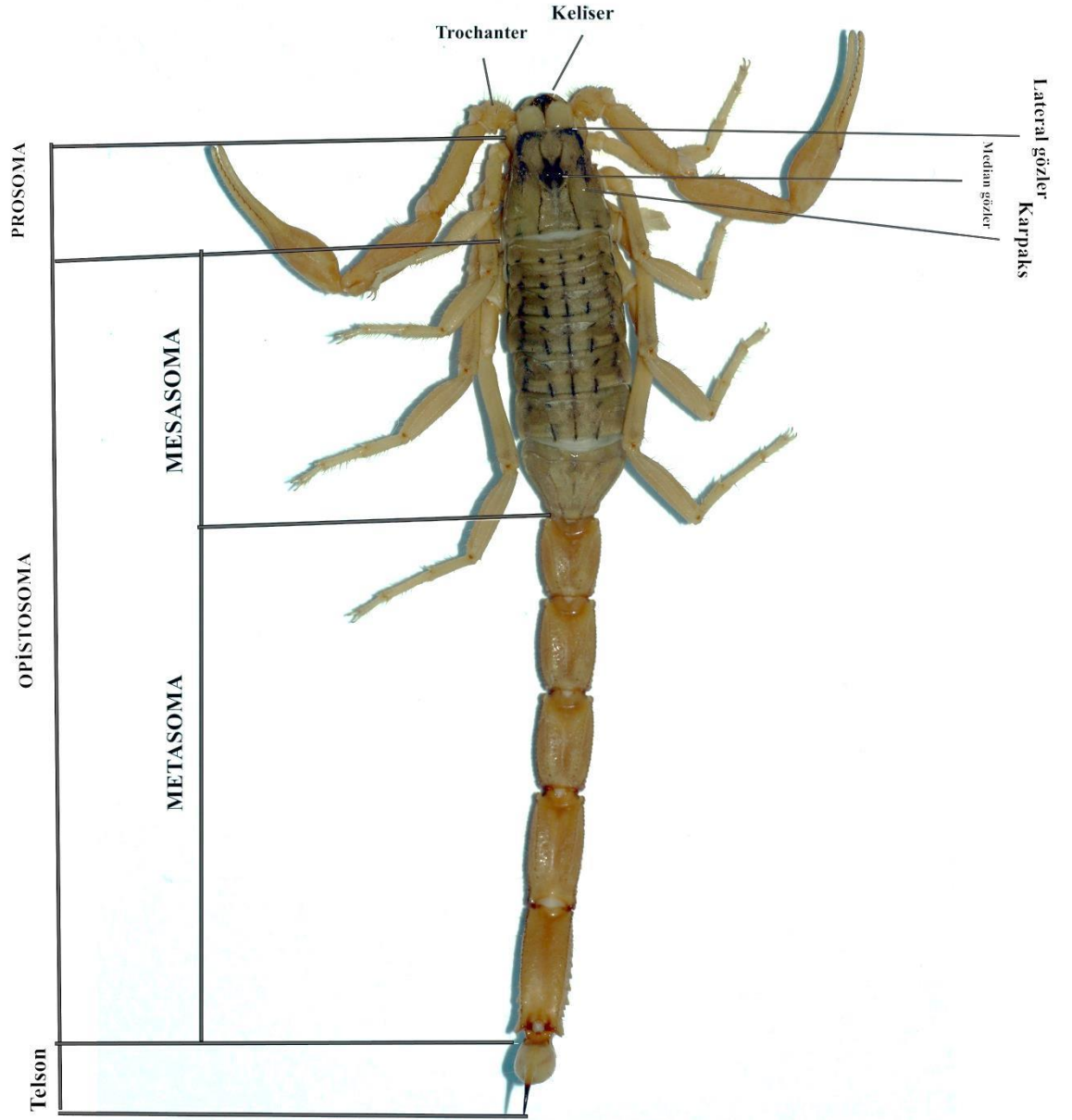
2.1. Akreplerin Genel Özellikleri

Akrepler yaklaşık 430 milyon yıllık evrimsel tarihleriyle en eski arthropodalardan biridir (Gao ve ark., 2007). Boylarının iki metreye ulaştığı ve yengeç şeklinde oldukları bilinmektedir. Yine denizde yaşadığı bilinen Merostomata'dan köken almaktadırlar. Ayrıca bilinen en eski ve ilk kara akrebi olan *Palaephonus nuncius*, Linstom ve Thorell tarafından Gotland adasında bulunmuştur (Brownell ve Polis, 2001; Yeşilyurt, 2005). 300 milyon yıl öncesinde yaşayan akrepler modern olarak tabir edebileceğimiz özellikleriyle günümüze kadar önemli derecede değişikliğe uğramadan gelmişlerdir. Bu özellikleri genellikle adaptasyon yeteneklerine ve dayanıklı yapılarına bağlanmış ve iyi saklandıklarından dolayı da zararlı ışıklardan etkilenmeden çok fazla değişime uğramadan günümüze kadar geldiği düşünülmektedir (Büyükkartal, 2018).

Bugün tropik ve subtropik bölgelerde yaygın olarak bulunan 16 akrep ailesi içerisinde 1500-2000 dolayında tür bilinmektedir (Özkan ve Karaer, 2004). Ancak son güncellemelerle birlikte Carcamo-Noriega ve ark. (2019) küresel düzeyde 2300'den fazla akrep türünün var olduğunu ve bunların sadece yaklaşık %1'nin venomunun karakterize edildiğini bildirmişlerdir. Bu akrep türlerinden sadece 50 türünün insan için tehlikeli dozda toksin bulundurduğu bilinmektedir (Kapu, 2014; Possani ve ark., 2000).

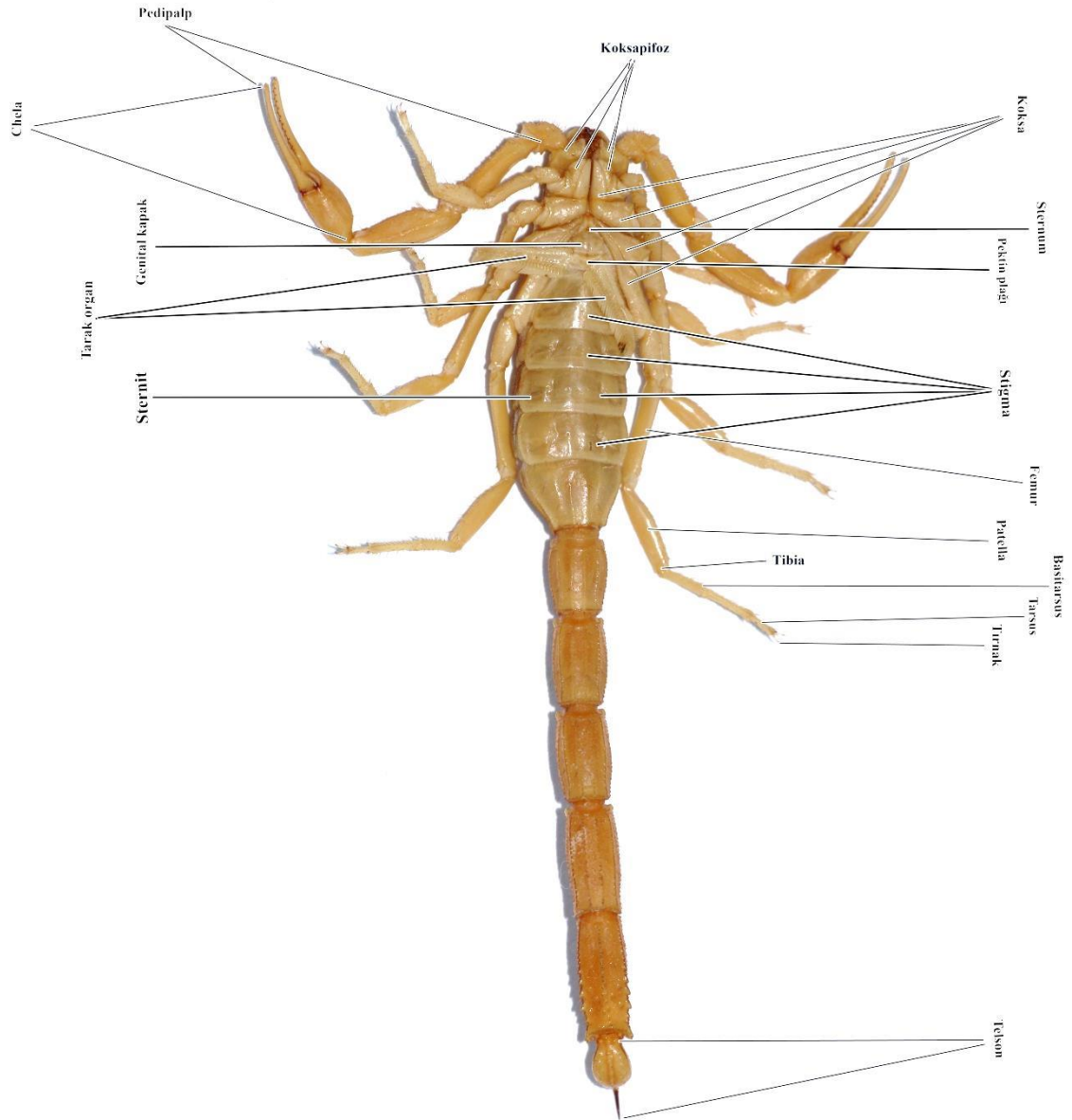
2.2. Akreplerin Vücut Yapıları

Akrepler, uzunlukları 13-220 mm arasında değişkenlik gösteren arthropodlardır. Vücutları sefalotoraks(prosoma) ve abdomen (opisthosoma) olarak şekil 2.1 deki gibi iki kısımdan oluşur (Akdeniz, 2018).



Şekil 2.1 Akrelerin vücut bölgeleri üstten görünümü (♂ *Aegaeobuthus gibbosus*, Muğla, Yatağan, Bencik Dağı).

Prosoma segmentsizdir ve sırt tarafı tek parçadan oluşan karapaks adı verilen kitin bir örtü ile kaplıdır. Prosomada; bir çift pedipalp, bir çift keliser, 4 çift bacak, bir çift median göz ile türlere göre değişiklik gösterebilen 2-5 çift lateral göz bulunmaktadır (Kamaoğlu, 2014).



Şekil 2.2 Akrelerin vücut bölgeleri alttan görünümü (*♂Aegaeobuthus gibbosus*, Muğla, Yatağan, Bencik Dağı).

Pedipalpler; 6 segmentten (koksa, trokanter, femur, tibia, hareketli parmak ve sabit parmak) oluşmaktadır. Bu segmentlerin son iki tanesi makas şekli meydana getirecek biçimde farklılaşmıştır. Bu yapı kela olarak isimlendirilir. Keliserlerden farklı olarak alttaki parça hareketlidir. Parmakların iç bölümlerinde iki sıra şeklinde kitin dış sıraları vardır (Şekil 2.2). Vücut üzerinde uzunluğu türlere göre değişiklik gösteren, ısıyı algılamayı sağlayan setalar bulunmaktadır. Bunun dışında pedipalpler üzerinde trikobotri denilen ve hava basıncındaki küçük farklılıkları hissederek ortamı ve avlarının yerini algılayabilen duyu organları bulunmaktadır. Keliserler ise her biri 3 parçalıdır (hareketli

parça, hareketsiz parça ve manus). Uç kısımdaki iki segment, üstteki hareketli ve alttaki sabit olacak şekilde kısaç oluşturur. Keliserler; familyalar ve bazı türler için karakteristik bir yapıdadır. Keliserler, besinlerin parçalanmasında, av hayvanlarını tutmada ve bazı zamanlarda da birbirlerine sürtülerek ses çıkarmada kullanılabilirler (Yeşilyurt, 2011).

Bacaklar, her bir göğüs halkasında bir çift olmak üzere toplamda dört çift olup üzerinde yerdeki titreşimleri algılamayı sağlayan ince tüyler vardır. Median gözler, karapaks üzerindeki konumundan dolayı önemli bir görüş açısına sahiptir. Lateral gözler, gece görüşü sağlamak içindir ve bundan dolayı çok zayıf ışıkların, hatta yıldızlardan çıkan ışıkların bile algılanabildiği görülmüştür (Kamaoğlu, 2014).

Abdomen ise preabdomen (mesosoma) ve postabdomen (metasoma) olarak iki kısma ayrılır (Şekil 2.1). Preabdomen, tüm genişliği ile sefalothoraksa bağlanır ve yedi segmentten oluşur. Kuyruk veya postabdomen ise telson ile toplamda altı segmentten oluşur. İlk beş segment, her biri tek parçadan oluşan kitin bir zırhla kaplıdır. Son segment olan telsonda iki zehir bezi, ucunda ise bir zehir iğnesi bulunur. Zehir bezlerinin kanalları iğnenin ucundaki deliklerden dışarı açılırlar. Zehrin etkisi nörotoksin olup, çoğunlukla avını yakalamak ve savunma için kullanılmaktadır (Büyükkartal, 2018).

Sıcak veya kurak bölgelerde, yerleşim yerlerinde, taşların altında hatta ev, ahır ve harabeler gibi insana yakın konumlarda bulunurlar. Akşam karanlık olduktan sonra ortaya çıkarak böcek, çıyan ve örümcek gibi canlıları avlayarak beslenirler (Uysal, 2014).

Akrepler, avlarını kısaçlarıyla yakalarlar ve kuyruklarını avına uzatıp sokarak zehirleri ile öldürürler. Akrepler, verecekleri zehir miktarını avlarına göre belirleyebilir. Büyük kısaçlara sahip olanlar, küçük avlarını güçlü kısaçlarını kullanarak öldürürken, zayıf kısaçlara sahip olan akrepler ise avı yakalayıp zehirlerini kullanarak avı sokar ve felç ederek öldürürler. Keliserini avına tamamen yerleştirir ve sindirim enzimleri salgılar böylece dokuları sıvılaştırır ve oluşan sıvıyı emerler. Soğukkanlı hayvanlar olduklarından dolayı az yiyeceklerle yetinebilirler, aylarca hatta iki yıl kadar aç kalabilirler. İnsan ve hayvanları beslenmek için değil, korunmak amacıyla sokarak zehirlenme ve ölümlere sebep olabilirler. Ülkemizde sekiz akrep türü insanlar üzerinde etkili zehre sahiptir ve bunlardan ikisi çok zehirli ve ölümcüldür (Doğan, 2015).

Akrepler ayrı eşeyli olup erkek ve dişi arasında eşeyssel farklılık (eşeyssel dimorfizm) vardır. Üreme davranışları oldukça değişiktir. Erkek akrep, dişi akrebin kollarından tutar ve karşılıklı olarak saatlerce devam edebilen dans başlar. Erkek, iplik şeklindeki spermaların olduğu spermatoforu uygun olan yere yapıştırır. Bundan sonra ise dişiye zorlayarak genital açıklığından bu spermatoforu almasını sağlar. Bazen dişi dans esnasında veya döllenme gerçekleştikten sonra erkeği yiyebilir. Embriyo gelişimi vivipar embriyonik olup birkaç aydan iki yıla kadar sürer. Anne yavrularını korur. Embriyo sonrası gelişim süresi 7-85 ay arasında değişebilir (İnanç, 2010).

Akreplerde fotolimünesans özelliği bulunduğu için U.V. ışık (365 nanometre) ile uyarıldığında fosforlu ışık verirler. Bu özelliğin adına floresans özelliği denilir (Şekil 2.3). Bu özellik ilk defa 1954 tarihinde bulunmuş ve türler arasında emisyon yoğunluğuna bağlı olarak çeşitlilik gösterdiği görülmüştür. Bu özellik akrep doğduktan sonra kutikulasının içinde 4-metil-7-hidroksi-kumarin birikmesiyle oluşur. Bundan dolayı yeni doğmuş yavrularda floresans özelliği görülmez (Kamaoğlu, 2014).



Şekil 2.3 U.V. ışık altında akrep görüntüsü.

Akreplerin vücut yapıları ince ve uzun yapıdadır. Boyları ortalama 4-10 cm arasında değişir ancak en küçükleri olan *Microbuthus pusillus* 13 mm boyunda; en büyükleri olan *Pandinus imperator* 22 cm'dir (Babaşoğlu, 1999).

2.3. Akrep Zehrinin Özellikleri

Antimikrobiyal peptitler (AMPs) düşük moleküler ağırlığa sahip olup yaşayan organizmalarda immün sistemlerinin bir parçası olarak bulunur ve geniş bir dağılım gösterir. AMPs geleneksel antibiyotik terapilerine bir alternatif olarak görülür. Bakterilerin zor kaçabileceği şekilde onların membranlarında geçici hasar oluşturarak dirençli olmalarındaki eğilimde azalma gösterir. Şu ana kadar sentezi keşfedilen veya sentez edilmiş 5000'den daha fazla AMPs vardır. Antimikrobiyal peptitler başlangıçta omurgasızlarda keşfedilmiş ve daha sonra omurgalılarda da tanımlanmıştır (Diaz ve ark. 2009). İlk antibakteriyal peptit olan hadrurin ve scorpin sırasıyla *Hadrurus astecus* ve *Pandinus imperator* akreplerinden izole edilmiştir (Gao ve ark., 2007).

AMPs tipik olarak kısa uzunlukta (5-100 aminoasit) peptitlerdir. Bu peptitler bitki veya hayvanların venomlarında, immün sistem hücre salgılarında ve kanında bulunur. Venom bitki ve hayvanlar tarafından düşmanlarına veya avlarına saldırı ve savunma için kullanılan bileşiklerin kompleks karışımıdır (Bea ve ark., 2017). AMPs'lerin yapısı genel olarak yüksek amfifilik topolojiye sahiptir. Bu yapıda moleküllerin karşılıklı yüzleri üzerine hidrofilik ve hidrofobik yan zincirler yerleşmiştir. Bu peptitler potansiyel olarak virüsler bakteriler parazitler ve funguslara karşı antimikrobiyal ajanlardır. Birçok AMPs akrep venomundan ve hemolinflerinden tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları hadrurin, scorpine, opistoporinler, parabutopirin, mucropirin, ISCTler ve StCT1'lerdir. (Cao ve ark., 2012a; 2012b).

AMP'ler üç temel gruba ayrılabilir; (1) İlk grup daha sık α -helikal yapılı ve sistein bulunmayan amfipatik linear peptitlerdir. (2) İkinci grup üçdisülfid bağından oluşan peptitlerdir. (3) Üçüncü grup genel olarak çok fazla bulunmayan prolin, arjinin, histidin veya triptofan gibi aminoasitlerin bulunduğu peptitlerdir (Diaz ve ark., 2009).

Akrepler özellikle bakteri saldırılarına karşı dirençlidir. Bu dirençlilik dolayısıyla sorumlu moleküllerin analiz edilmesinde araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Akrep zehirleri moleküler ağırlıklarına göre peptitler ve içerikleri açısından üç farklı gruba sahiptir. Birinci grup hiyaluronidaz, fosfolipaz ve sfingomiyelinaz gibi enzim aktivitesine sahip proteinlerden oluşur. İkinci grup temel olarak toksinler ve sitolitik bileşenler gibi 10 kilodaltondan (KDa) daha düşük moleküler ağırlıklı peptit fraksiyonlarından oluşur.

Üçüncü grup iyonlar, biyojenik aminler, nörotransmitterler, serbest aminoasitler, açıl poliaminler, heterosiklik bileşenler ve alkoloitler gibi bileşenlerden oluşur. (Baradaran ve ark., 2012).

Akreplerden izole edilen ilk antimikrobiyal peptit *Leiurus quinquestriatus hebraeus* haemolymph daha sonra antibakteriyel veya sitolitik peptitler Buthidae, Scorpionidae, Ischnuridae ve Iuridae familyalarının hemolinf ve venomlarına sahip akreplerden izole edilmiştir (Diaz ve ark., 2009).

2.3.1. Akrep Zehrinin Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkisi

Antimikrobiyal aktivitenin temel noktası bakterilerin plazma membranlarıdır. Bazı mikrobiyal peptitler hücre yüzeylerinin negatif iyon gruplarını iyonik olarak çeker. Burada membran üzerinde birikir ve α -helikal konformasyona sahip olurlar. Bu durum hücre lizisi, membran düzensizliği ve geçici porların oluşumu ile sonuçlanır. Diğer antimikrobiyal peptitler membran iyon kanalları ile interaksiyona girerek bakteri membran geçirgenliğinin düzensiz olmasına yol açar (Diaz ve ark., 2009).

2.4. Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliği

Antibiyotik direnci, mikroorganizma türlerinin bazı suşlarının antibiyotikten etkilenebilmesi veya antibiyotiğe duyarlı bir suşun bazı nedenlerle direnç kazanmasıdır (Ekmekçioğlu, 2019).

2.4.1. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Bakterilerde antibiyotik direnci çeşitli mekanizmalarla sağlanmasına rağmen, bu mekanizmalar temelde iki gruptur:

- Bakterilerin kromozomlarında meydana gelen mutasyonlar,
- Dirençli bakterinin direnç genini duyarlı bir mikroorganizmaya aktarması.

Bakterilerin kromozomunda mutasyonla kazanılmış olan direnç, o mikroorganizma ve ondan üreyen bakterilerde etkilidir. Antibiyotik baskısıyla bu dirençli klonun seçilimi ve hastalar arasında yayılması ya da alakalı hastanelerde bir salgına yol açabilmesi de

mümkündür. Bu yöntemle kazanılmış olan direnç, bir antibiyotik ya da bir antibiyotik grubunda geçerlidir. Fakat direnç kazanan bu klonun çoğalması sonucu oluşan popülasyon, başka bir mutasyon geçirebilir böylece direnç düzeyi artabilir ya da farklı bir antibiyotik veya antibiyotik grubuna da direnç oluşturabilir. Ayrıca, dirence neden olan kromozomal genin bir transpozona ve sonrada bir plazmide geçerek başka bakterilere aktarılması da gerçekleşebilir (Töreci, 2003).

Direnç geninin bakteriler arasında aktarılmasının antibiyotik direncinin yayılmasında, önemli bir rolü vardır. Bu aktarım transformasyon, transdüksiyon ve en önemlisi konjugasyonla gerçekleşebilir. Bakterilerde bulunan kendi kendini eşleyebilen, genellikle çok sayıda olan, kromozomdan ayrı dairesel ve çift sarmallı bir DNA parçası olan plazmidlerin çoğu konjugatif olup aynı veya benzer bakteriden bakteriye aktarımını sağlarlar. Konjugatif olmayan plazmidler de ise farklı bir genetik eleman ile sağlanan konjugasyonla diğer bakterilere aktarımı sağlanabilir. R faktörleri olarak da bilinen direnç plazmidleri 1-2'den 10-12'ye kadar direnç genine sahip olabilir ve bu genler duyarlı bir bakteriye aktarıldığında o bakteriyi taşıdığı direnç geni kadar antibiyotiğe dirençli kılabilir. Bundan dolayı plazmidlerin doğada dirençli bakterilerin çoğalmasında çok önemli bir rolü vardır (Töreci, 2003).

2.5. Bakterilerde Biyofilm Üretimi

Biyofilm, herhangi bir yüzeyde bakterilerin birbirleriyle haberleşerek hayatlarını devam ettirebildikleri organizasyon bütünüdür. Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşturan bakteriler yüzeye yapıştıktan sonra sadece yaşamlarını devam ettirmek için değil büyüme oranlarını arttıran bir koordinasyon içinde yaşayan biyolojik canlı gruplarıdır. İlk biyofilmi 17. yüzyılda Antoni van Leeuwenhoek diş üzerinden aldığı sürüntüden basit mikroskop kullanarak tespit etmiş biyofilmi bulduğunun farkına varamamıştır. Son 20 yılda yapılan çalışmalar taramalı elektron mikroskobu yardımıyla biyofilm hakkında bilgi sahibi olmamıza katkı sağlamıştır. Biyofilmin yapısına baktığımızda düzensiz dağılım gösteren polisakkaritlerden ve %73-%99 arasında sudan oluşmaktadır. Ayrıca besin ve oksijen taşınımını sağlayan su kanalları bulunmaktadır (Arar, 2015).

Mikroorganizmalar biyofilm oluşturmak için ilk önce yüzeye tutunurlar. Bu yüzeyler canlı dokular, medikal aletler, doğal su sistemleri, diş üniteleri, endüstriyel sistemler gibi ortamlardır (Subramani ve ark., 2009). Tutunma olayı sonrasında yapışma olayı

gerçekleşir. Mikrokoloniler halinde toplanır ve olgun biyofilmleri oluştururlar. Olgun biyofilmler yine kopma ile ayrılarak ortamda dağılıp çoğalırlar. Mikroorganizmalar biyofilmi oluşturma nedenlerinin başında savunma gereksinimi gelir. Antibiyotik, pH, besin yoksunluğu, dezenfektan gibi fiziksel şartlar karşı direnç sağlamada etkendirler. Diğer nedenleri de koloni oluşturmak, yaşanılabilir çevre oluşturmak ve komünite oluşturmak olarak sıralayabiliriz (Arar, 2015).



3. LİTERATÜR ÖZETİ

Moerman ve ark. (2002), Güney Afrika akrebi *Opisthophthalmus carinatus* venomundan izole ettikleri por oluşumunu sağlayan bir peptit olan opistoporin 1 ve yine Güney Afrika akrebi *Parabuthus schlechteri* venomundan izole ettikleri parabutoporin peptitlerinin antimikrobiyal aktivitelerini karşılaştırmışlardır. İki peptitin de en yüksek aktiviteyi gram negatif bakterilere (1,3-25 µm) karşı gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca funguslara karşı peptitlerin inhibe edici etkilerinin olduğunu da saptamışlardır. Antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra her iki peptitin hemolitik aktivitesini çalışmışlar ve potansiyeli düşük mastoparan ve yüksek litik etki gösteren melittin arasında orta derece aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Çakmak (2007), Türkiye’de dağılışı gösteren akrep türlerinden *Androctonus crassicauda* ve *Aegaeobuthus gibbosus* venomlarının fare vasdeferensleri üzerine çalışma yapmış ve iki türe ait akrep zehirlerinin bu organda farklı etkiler ortaya çıkardığı saptanmıştır. *A. crassicauda* KCI kasılmalarını sürekli hale getirmiş, Phe kasılmalarını durdurmuştur. Ayrıca *A. crassicauda* venomu K⁺ kanallarıyla da reaksiyonlar gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. *A. gibbosus* venomu ise KCI kasılmalarını belirli düzeyde arttırmıştır.

Gao ve ark. (2007), Çin’den topladıkları *Buthus martensii* akrep zehrinin antibakteriyel aktivitesi üzerine çalışma yapmışlardır. Zehrin gram negatif bakterilere nazaran gram pozitiflere karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca zehri direkt ve proteinaz K karışımı ile *Mikrococcus luteus* bakterisine karşı denemiş ve direkt zehrin inhibisyon zonunun daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Samy ve ark. (2007), *Buthotus hottentota hottentota* ve *Buthus martensii* akrep venomlarının Gram-pozitif *S. aureus* ve Gram-negatif *E. coli*, *E. aerogenes*, *P. auroginosa*, *Proteus vulgaris* ve *P. mirabilis* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitelerini çalışmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarında *Buthotus hottentota*’nın sadece *S.aureus*’a karşı etkili (15,4 mm) olduğu *Buthus martensii*’nin ise sadece *E. aerogenes*’e karşı etki (16,6 mm) gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Çalışkan (2008)’ın yaptığı çalışmada *Androctonus crassicauda* türüne ait zehrin peptit yapılarının ortaya konması ve zehirleme mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır.

Ayrıca zehrin farmakolojik açıdan önemi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Çalışmada akrep zehrinden peptitler ayrıştırılmış ve içlerinden özellikle Acra3 adını verdikleri peptit fareler üzerinde denenmiş ve beyinde şiddetli nörotoksik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca elde ettikleri Ac8, Ac9 ve Ac10 peptitlerin beyin tümörleri üzerinde iyileştirici etkiye sahip oldukları sonucuna ulaşmıştır.

Diaz ve ark. (2009), *Tityus discrepans* akrep zehrinden bactridines olarak isimlendirdikleri 6 yeni peptit izole etmişlerdir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı bactridineslerin MİK testlerini yapmışlar ve yüksek antimikrobiyal aktivite tespit etmişlerdir. Test ettikleri peptitlerin bakterilere bağlı olarak konsantrasyonlarının 20-80 μM düzeyinde ortamda bulunan bakterinin tümünün gelişimini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Hernandez-Aponte ve ark. (2011), Meksika akrebi olan *Vaejovis mexicanus* venomundan izole ettikleri ve vejovine ismi verdikleri yeni bir antimikrobiyal peptit elde etmişlerdir. Peptitin 47 aminoasitten oluştuğu ve moleküler ağırlığının 4873 Da olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmalarında vejovine peptitinin gram negatif çoklu ilaç direncine sahip klinik izolatların gelişimini inhibe etme potansiyelini test etmişler ve bakterilere karşı 4,4-50 mikromol (μM) oranlarında minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) gösterdiğini bildirmişlerdir.

Baradaran ve ark. (2012), İran'da medikal önemi olan *Buthidae* familyasına ait *Mesobuthus eupeus* un zehirlerinin cDNA kütüphanelerinden caerin benzeri antimikrobiyal peptitlerini izole etmişlerdir. Çalışmalarında *M. eupeus* zehirlerinden caerin benzeri antimikrobiyal peptitlerinin Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (Reverse kriptase Polimeraz Chain Reaction/RT-Pcr) kullanarak amplifiye etmişler ve cDNA'yı kodlayan sekans (238 baz baz çifti nükleotid ve 74 amino asit) elde ederek sonraki analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalıştıkları peptitin *M. martensii* ve *M. eupeus* gibi aynı genusun antimikrobiyal peptitlerine benzer moleküler karakteristiklere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Buna karşın diğer genoslarda görülen peptitlerden daha farklı olduğunu saptamışlardır.

Cao ve ark. (2012a), daha önce *M. martensii* akrep venomundan karakterize ettikleri BmKn2 antimikrobiyal peptitinden Kn2-7 peptitini elde etmeyi başarmışlar ve bu peptitin

düşük hemolitik aktivite ve antibakteriyel aktivitesini geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu peptitin gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Kn2-7 peptiti *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerini lipoteikoik asit (*S. aureus*'un hücre duvarında bulunur) ve lipopolisakkaritlere (*E. coli*'nin hücre duvarında bulunur) bağlanarak hızlıca inhibe eder. BmKn2 den türetilen bu peptitin hemolitik aktiviteyi önemli oranda düşürdüğü de raporlanmıştır.

Cao ve ark. (2012b), *Scorpiops tibetanus*'un cDNA kütüphanesindeki venomundan yeni bir antimikrobiyal peptit StCT2'yi tespit etmiş ve antimikrobiyal özelliklerini çalışmışlardır. Peptitin cDNA tüm uzunluğunun 369 nükleotitten oluştuğunu bildirmişlerdir. Peptitin *S. aureus*a karşı minimal inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) 6,25-25 µg/ml olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı zamanda in vivo tasarladıkları *S. aureus* enfeksiyonu taşıyan fare modelinde de antimikrobiyal aktivitenin yüksek bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Chen ve ark. (2012), mucroporin-M1 akrep venom peptidini üç RNA virüsüne (measles virüsü, sars-CoV ve H65N1) karşı antiviral aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Tasarladıkları yeni çalışmada ise daha önce antibakteriyel aktivitesinin olduğunu gösterdikleri Kn2-7 AMPs'nin anti-HIV-1'e karşı antiviral etkisini test etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre peptitin anti-HIV-1 etkisinin EC₅₀ değerinin 2,76 µg/ml ve aynı zamanda konak hücrelerine karşı düşük sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlarla beraber Kn2-7 peptidinin viral partiküllere direk interaksiyonu ile HIV-1'i inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Kapu (2014), *Androctonus crassicauda*, *Mesobuthus eupeus phillipsi*, *M. nigrocinctus* ve *A. gibbosus* türlerinden elde edilen venomları gökkuşağı balıklarına 0,5 ml dozda ve 63 ve 31,5 µl olmak üzere iki farklı konsantrasyonda periton içine uygulanmıştır. Tüm balıklara venom verildikten sonra kan değerlerinden karşılaştırma yapılmış akrep zehri ile kan değerleri arasındaki ilişkiler saptanmıştır.

Uysal (2014), *Androctonus crassicauda* ve *Mesobuthus nigrocinctus* türlerine ait akreplerden alınan venomların *Poecilia reticulata* türü balıklarda akut toksisitesini (LD₅₀) hesaplamıştır. Bu çalışmada asıl amaç rat ya da fare yerine balıkların kullanılarak benzer sonuçların alınıp alınamayacağının sorusu araştırılmıştır. Balıklara venomlar 0,05 ml'lik

dozlarda periton içine uygulanmıştır. Balıklarda da fare ve rattan alınan sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiş ve hayvansal toksisite araştırmalarında kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bunun yanı sıra aynı türe ait akrepler üzerinde yaptıkları denemelerde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçların akrelerin farklı coğrafi bölgelerde yaşaması, beslenme, iklim gibi etmenlerle ilişkili olabileceği bildirilmiştir.

Koçak (2015)'ın yaptığı çalışmada Buthidae familyasına ait *Androctonus crassicauda*, *Buthacus macrocentrus* türlerinden alınan venomlar sıvı kromatografi sistemi ile saflaştırılıp Acra3 ve Bu1 peptitleri elde edilmiştir. Acra3 peptitinin molekül ağırlığının 7620,3 Da ve 66 dizisine sahip aminoasitten oluşan polipeptit olduğu gözlemlenmiş, Bu1 peptitinin ise molekül ağırlığının 7263 Da, 65 aminoasit dizisinden oluşan bir polipeptit olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu peptitler biyoinformatik modelleme yapılarak 3 boyutları yapıları elde edilmiş, farklı venomlardan elde edilen peptit yapıları ile karşılaştırma yapılarak benzerlikleri karşılaştırılmıştır.

Doğan (2015), *Protoiurus kraepelini* zehrinin peptit içeriğini belirleyip molekül ağırlıklarını elde etmiştir. SDS-PAGE yöntemi ile ~10-240 kDa arasında bantları gözlemlemiştir. 10 kDa bölgesinde yoğun bant dağılımı gözlemlemiş Trisin SDS-PAGE yöntemini kullanarak ~2-10 kDa arasında bantları bulmuştur. Ayrıca ham zehrin *E. coli* ve *S. aureus*'a antimikrobiyal etkilerini göstermiştir.

Bea ve ark. (2017), yaptığı çalışmada doğal peptidlere karşı *Opisthacanthus madagascariensis* akrep venomunda bulunan IsCT1 ve IsCT2 α -helix peptitlerinin doğal 7 analogunun antibakteriyel ve hemolitik aktivitelerini karşılaştırmak üzere bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre alanin, valin ve lösin içeren sekansların 5 ve 9 pozisyonlu alt birimlerinde hidrofobik özellikleri arttıkça antibakteriyel aktivitenin de yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Ancak aynı zamanda hemolitik aktiviteninde artmış olduğunu saptamışlardır.

Ulutaş (2017), Gaziantep ve çevresinde geniş bir dağılımı olan *Leiurus abdullahbayrami* türünden elde edilen venomların kromatografik teknikle ayrıştırılmış toksik peptitin birincil yapısı elde etmişlerdir. Yine elektrofizyolojik yöntemlerle etkili olduğu iyon kanalı belirlenmiş bu türe ait ilk saflaştırılan peptit olması nedeniyle Lab1 olarak isimlendirmişlerdir.

Akdeniz (2018), *Euscorpius mingrelicus* akrep zehrinin protein miktarının oldukça fazla olması sebebiyle antikanser çalışmalarında kullanılabileceğini düşünerek meme kanseri, akciğer tümörü ve fare fibroblast hücrelerinde denemiş ve önümüzdeki süreçte akrep zehirlerinin kanserlerin saptanması ve tedavisinde kullanılabileceğine dair araştırma yapmıştır.

Büyükkartal (2018), *Aegaeobuthus gibbosus* akrep türüne ait ham zehrini farklı konsantrasyonlarda kullanarak meme kanserleri üzerindeki etkisini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle araştırmıştır. Ayrıca akrep zehrinin sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkilerini ortaya çıkarmaya çalışmıştır. Çalışmasını farenin fibroblast hücreleri ve akciğer kanser hücreleri karşılaştırılarak sonuçlandırılmıştır.

Gao ve ark. (2018), *Mesobuthus eupeus* akrep zehrinden izole ettikleri klasik α -helikal AMPs'nin 49 aminoasitten oluştuğu, multifonksiyel bir molekül olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı göstermiş olduğu yüksek aktiviteyle geniş spektruma (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Alcaligenes*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Salmonella* ve *Stenotrophomonas*) sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Ekmekçioğlu (2019), yaptığı çalışmada antibiyotiklere karşı direnç kazanmış olan özellikle *E. coli* ve *Acinetobacter baumannii* bakterilerine karşı *Androctonus crassicauda* ham venomunu kullanarak etkinlik ölçmüştür. Çalışma sonucunda az miktarda akrep zehrinin bile belirli oranda etkinlik sağladığı antibiyotiklere alternatif olarak tıp alanında kullanılabileceği ve bu çalışmaların yeni çalışmalarla desteklenip antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Zerouti ve ark. (2019), *Androctonus australis*'in antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Bu söz konusu türün zehri *B. cereus*, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı etkili olduğu buna karşın *E. faecalis*, *P. auroginosa*, *K. pneumoniae* ve diğer birkaç bakteriye karşı etki göstermediğini saptamışlardır. Ayrıca zehrin *Aspergillus niger* ve *Candida albicans* funguslarına karşı etkili olmadığını da bildirmişlerdir.

Li ve ark. (2020), *Didymocntrus krusi*'den tanımlanmış AMP MK049518 peptidinin sadece gram-pozitif bakterilere karşı önemli derecede antibakteriyal aktiviteye sahip olduğunu vurgulamışlardır. Yaptıkları çalışmada ise bu peptitten köken alan G2K-S3K peptidinin doğal peptite kıyasla önemli ölçüde geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sadece in vitro değil in vivo olarakta farede deri enfeksiyonuna neden olan *S. aureus* ve *P. auroginosa*'nın G2K-S3K ile yara üzerindeki sayılarının önemli derecede düştüğünü raporlamışlardır.



4. MATERYAL METOT

4.1. Akrelerin Toplanması

Bu çalışmamızda *Protoiurus kraepelini* ve *Aegaeobuthus gibbosus* türlerine ait akrepler kullanılmıştır. Akrepler 2020 yılı ağustos ayında Ege Bölgesi Aydın ilinden toplanmıştır. Örnekler geceleri U.V. ışık kullanılarak taş, kaya aralıklarından, bitki diplerinden pens yardımı ile yakalanarak kapaklı plastik kavanozlarla laboratuvara getirilmiştir.

4.2. Akrelerin Bakımı ve Beslenmesi

Bakımı ve beslenmesi için akrepler laboratuvar ortamında ayrı ayrı kutucuklarda tutulmuştur. Kutu zeminleri Cocopeat toprak ile kaplanmış ve akreplerin nem ihtiyaçları üç gün arayla distile su ile ıslatılmış pamuklarla sağlanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Laboratuvar ortamında akrelerin beslenmesi.

Klima ile ortamın nemi alınarak akrepler için uygun yaşama ortamları (24°C) sağlanmıştır. Beslenmeleri için haftada bir un kurtları verilmiştir.

4.3. Akrep Zehrinin Sağımı

Zehir sağım işlemi, akrepler sabitlendikten sonra 12-20 V AC akım verilerek telson uyarılmış ve zehir steril tüplerde toplanmıştır (Şekil 4.2). Zehir toplanırken buz üzerinde çalışılmasına dikkat edilmiş, diğer analizler için direkt çalışma başlatılmıştır.



Şekil 4.2 Laboratuvar ortamında akreplerden zehir sağımı.

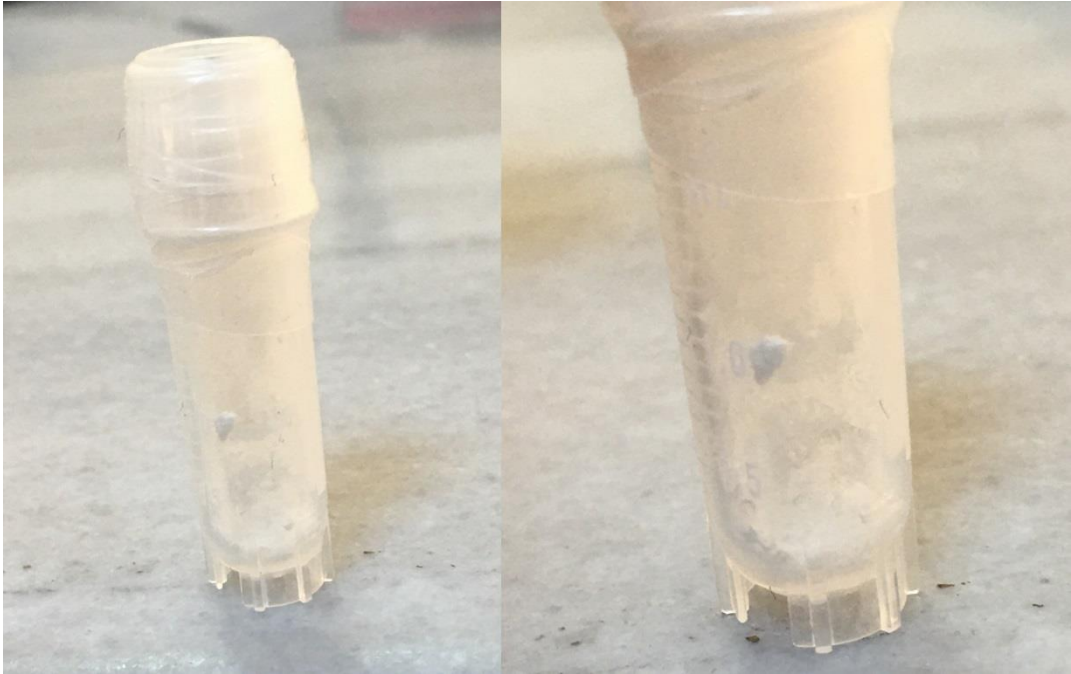
4.3.1. Zehir Örneklerinin Liyofilizasyonu

Liyofilizasyon işlemi Sinop Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı (Sübitam) Telstar IyoQuest liyofilizasyon cihazı kullanılarak (Şekil 4.3), CN101028287A patent numaralı metotta önerilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu işlem kısaca şu şekilde yapılmıştır; Zehir örnekleri sağıldıktan hemen sonra soğuk zincirde 15 dakika içerisinde liyofilizasyon cihazına yerleştirilip iki saat süresince -24°C 'de dondurulup, üç saat boyunca 0°C 'de vakumlama işlemi uygulanıp toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler -80°C saklanmıştır.



Şekil 4.3 Liyofilizasyon cihazı.

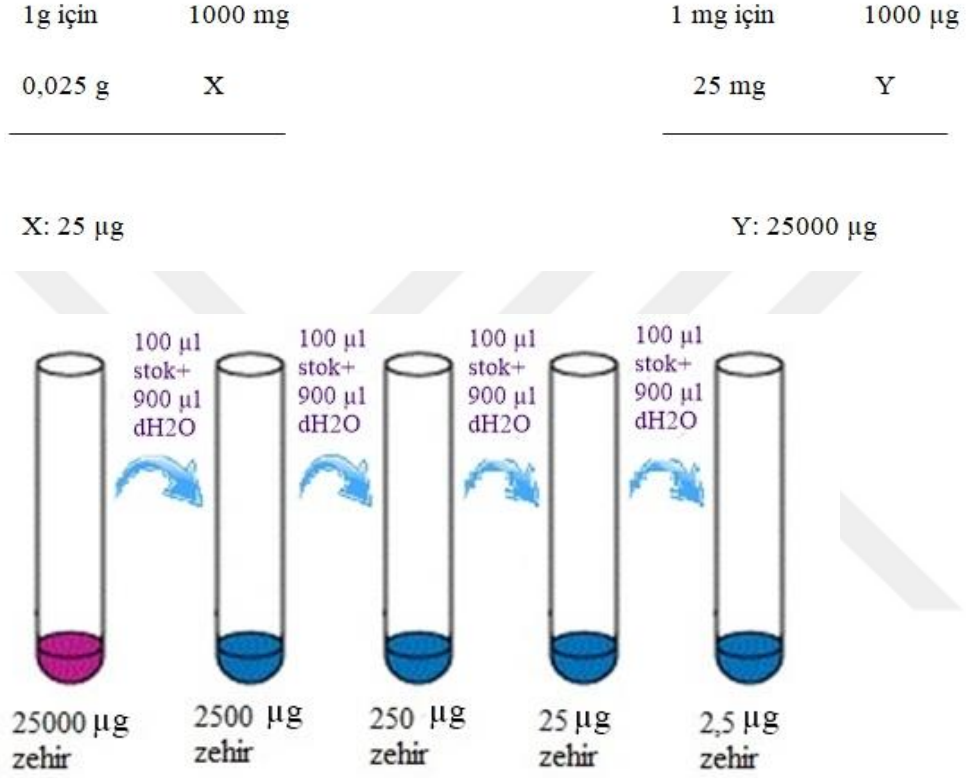
Liyofilize edilmiş *P. kraepelini* ve *A. gibbosus* türlerine ait zehirler toz olarak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Liyofilize edilmiş akrep zehrinin toz halinde görünümü.

4.3.2. Biyolojik Aktivite için Zehir Örneklerinin Hazırlanması

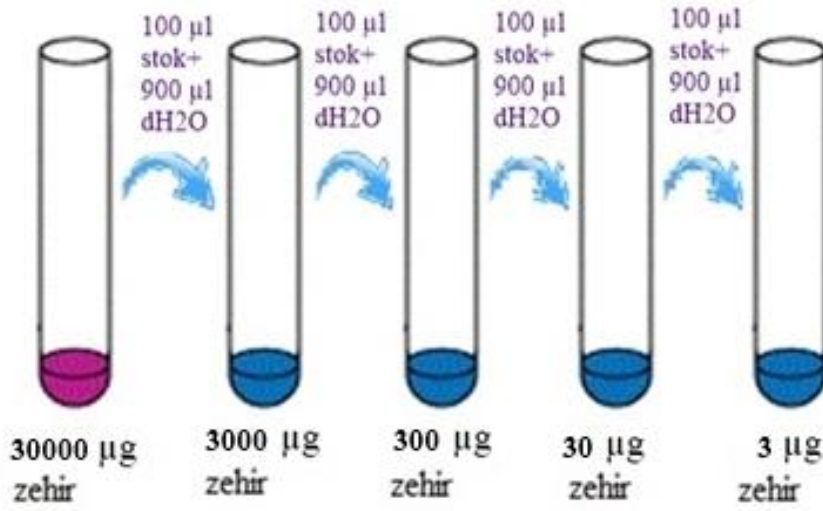
P. kraepelini ait zehir tozu tartımı yapılmış ve 0,025 miligram olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 *Protoiurus kraepelini* akrep zehrinin µg olarak seyreltilmesi.

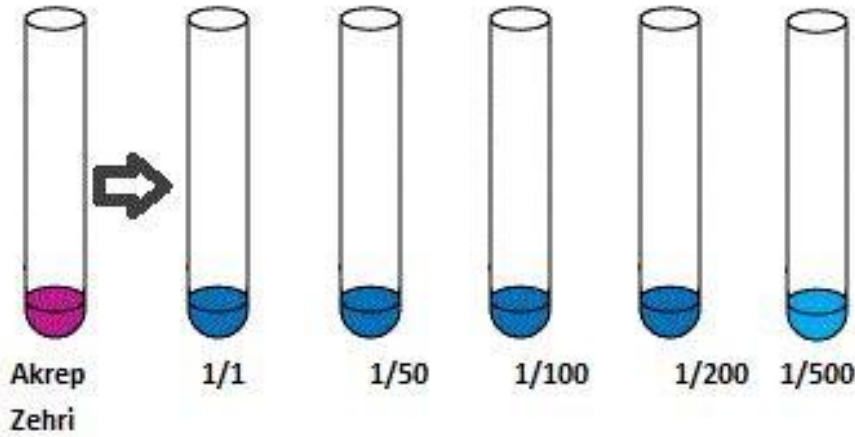
A. gibbosus ait zehir tozu tartımı sağlanmış ve 0,03 miligram olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).





Şekil 4.6 *Aegaeobuthus gibbosus* akrep zehrinin µg olarak seyreltilmesi.

Ayrıca *P. kraepelini* zehir örneklerinin sağıldıktan hemen sonra dH₂O ile dilüsyonları hazırlanmış (Şekil 4.7) ve taze kültürler üzerinde çalışılmıştır.



Şekil 4.7 Çeşitli oranlarda seyreltilmiş *Protoiurus kraepelini* zehir örnekleri.

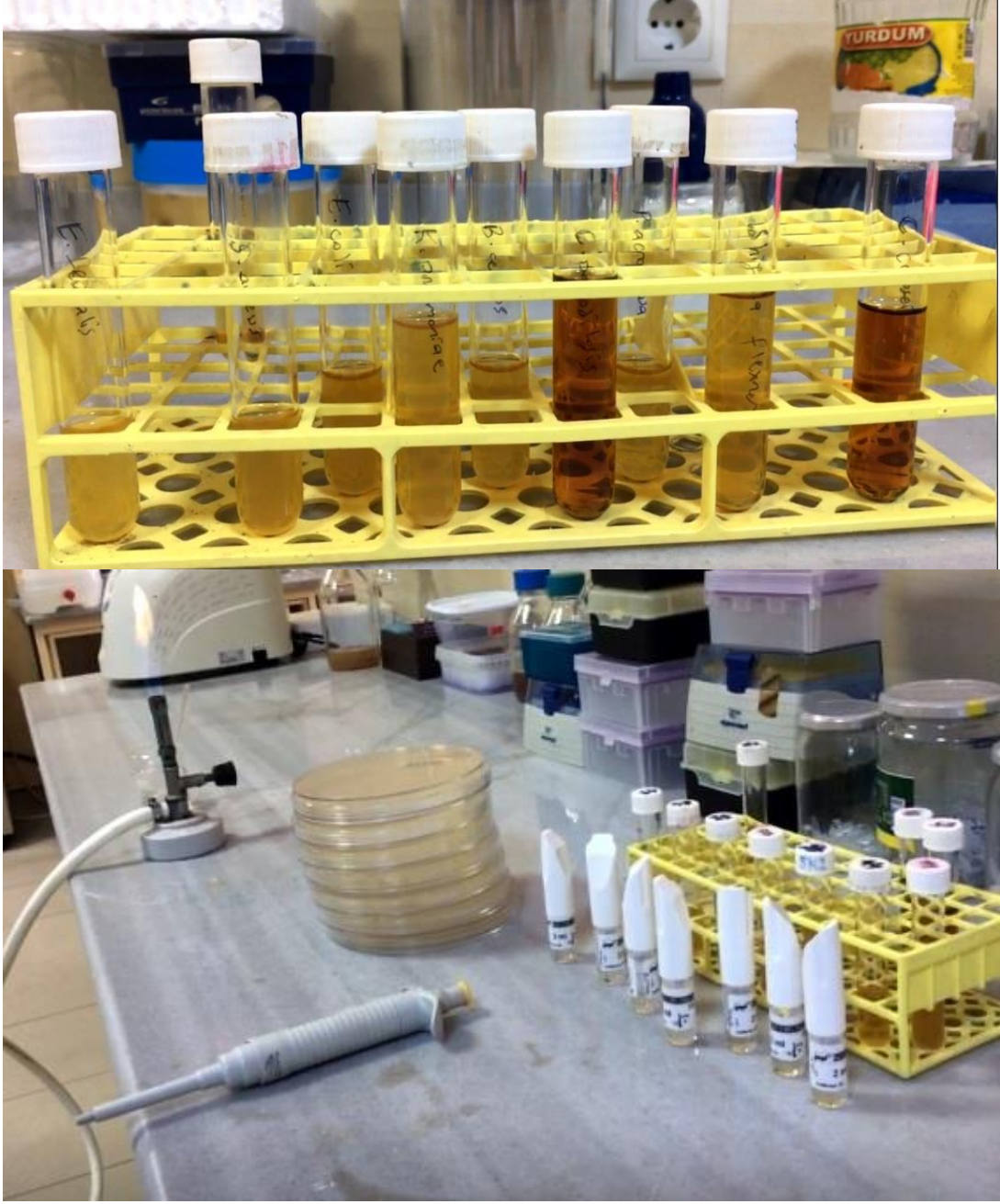
4.4. Mikroorganizmaların Hazırlanması

Mikroorganizmalar Sinop Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı canlı stok kültürlerinden üç Gram (+), dört Gram (-) ve iki fungus ile çalışılmıştır. Bu mikroorganizmalar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar.

Fungus	Gram-pozitif	Gram-negatif
- <i>Candida parapsilosis</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- <i>Candida krusei</i>	- <i>Bacillus cereus</i>	- <i>Shigella flexneri</i>
	- <i>Enterococcus faecalis</i>	- <i>Escherichia coli</i>
		- <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Stok halinde -80°C bulunan mikroorganizmalar buz üzerinde çözülmeleri sağlandıktan sonra bakteriler için nutrient broth da 37°C’de 24 saat, funguslar için Sabour dextrose broth da 28°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve taze kültürler hazırlanmıştır (Şekil 4.8). Taze örneklerin tekrardan stoğa alınması için %35 oranında gliserollü cryo tüp ortamında bakteriler -80°C’de stoklanmıştır.



Şekil 4.8 Laboratuvar ortamında taze kültür hazırlama işlemi.

4.5. Antibiyogram

Bir gecelik bakteri kültürleri antibiyogram çalışmasından önce McFarland 0,5 (yaklaşık olarak, $1 \text{ ila } 2 \times 10^8 \text{ CFU / mL}$) skalasına göre ayarlanmıştır. Kültür ekimi için bir gece önceden hazırlanmış Mueller-Hinton agara küçük petriler (9 ml) için 100 μl büyük petriler (18 ml) için 200 μl taze kültürlerden inoküle edilmiştir. İnokülasyon işleminden hemen sonra drigalski çubuğu ile yayma ekim yapılmıştır. Yayma işlemini

takiben petriler en az 15 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (bu aşamada aseptik koşulların sağlanmasına dikkat edilmiştir). Bu adımı takiben, şekil 4.5 ve şekil 4.6’da ifade edilen konsantrasyonlara göre hazırlanmış zehir örneklerinin emdirildiği boş antibiyotik diskler uygun mesafeler göz önünde bulundurularak petriye yerleştirilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol olarak çizelge 4.2’de gösterilen antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Çalışmada negatif kontrol olarak antibiyotik disklere emdirilmiş distile su kullanılmıştır. Son olarak petriler inkübasyon için etüve kaldırılmıştır. Bakteriler için 18-24 saat 37 °C, funguslar için 24-48 saat 37 °C’de inkübasyon koşulları sağlanmıştır. İnkübasyon işlemi bittikten sonra milimetrik cetvel ile zon çapları ölçülerek kayıtları alınmıştır. Deneysel işlemler iki tekrarlı yapılmıştır.



Çizelge 4.2 Antibiyotik diskleri.

Antibiyotik Diskler	Etkilediği Bakteri Türü
LNZ10 - Linezolid	Gram (+)
TPZ110 - Piperasilin-tazobaktam	Gram (-)
Lev5 - Levofloxacin	Gram (+) Gram (-)
Sxt25 - Trimetoprim-sulfametoksazol	Gram (-)
DA2 - Clindamycin	Gram (+)
VA5 - Vancomycin	Gram (+) Gram (-)
AM10 - Ampicillin	Gram (+) Gram (-)
E15 - Erythromycin	Gram (+)

4.6. Biyofilm Aktivitesi

Biyofilm aktivitesine sahip bakterileri tespit etmek üzere ilk adımda %0, %0,25, %1 ve %2,5 glikoz içeren 2 mL Tryptic soy broth (TSB) besiyeri hazırlanmıştır. Bu besiyerine çizelge 4.1’de verilen bakterilerin taze kültürleri inoküle edilmiş ve 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemini takiben besiyeri pipet kullanılarak ortamdan uzaklaştırılmış ve ters çevriltilerek açık havada kurumaya bırakılmıştır. Bu işlemin ardından 2 mL %0,25’lik safranin tüplere eklenerek bir dakika bekletilip ve sonrasında bir gece oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Sonuçlar tüpte safranin boyasının bıraktığı boya oranına göre biyofilm tutulumu hiç yok (0), zayıf (+), orta (++) ve yüksek (+++) olarak raporlanmıştır (Stepanovic ve ark. 2000). Bu aşamada beş adet ATCC suşu ve 96 kuyucuklu plate çalışmasına bu bakterilerle devam edilmiştir. 96 kuyucuklu plate çalışması için seçilen bakteriler *Staphylococcus aureus* Gram (+), *Enterococcus faecalis* Gram (+), *Escherichia coli* Gram (-), *Pseudomonas aeruginosa* Gram (-), *Klebsiella pneumoniae*, Gram (-)’dir. Steril olarak hazırlanmış % 0,25’lik glikoz içeren TSB besiyeri 170 µl oranında her bir kuyucuğa aktarılmıştır. Yine her bir kuyucuğa 20 µl akrep zehri ve 10 µl taze bakteri kültürü eklenmiştir. Bu plateler nazikçe karıştırılmıştır. Kapağı kapatıldıktan sonra

plateler 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda plateler mikropipet ile boşaltılmıştır. 300 µl PBS ile üç kez kuyucuklar yıkanmıştır. Bu adımda her bir yıkama için pipet kullanılmıştır. Her yıkama adımından sonra fiske vurularak platelerdeki sıvı boşaltılmış ve sonraki adıma öyle geçilmiştir. Yıkama işlemi bittikten sonra plate ters çevrilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra plateler sıcaklık fiksasyonu için 60°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Fiksasyondan sonra 150 µl metanol eklenmiş ve 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda metanol dökülerek tamamen uzaklaştırılmış ve plate ters çevrilerek oda sıcaklığında bir gece bekletilmiştir. Süre sonunda her bir kuyucuğa 150 µl %2’lik kristal viyole eklenerek 15 dakika boyanmıştır. Boyamadan sonra distile su ile yıkanmış ve her bir kuyucuğa 150 µl etanol dökülerek platelerin kapakları kapatılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra 570 nm’de Thermo Scientific Multiskan Go (Version 1.01.10) cihazında okuma yapılarak aşağıdaki formüllere göre (Şekil 4.9) hesaplamalar yapılmıştır. Negatif kontrol olarak sadece TSB eklenmiştir. Deneysel çalışmalar iki tekrarlı okumalar ise üç tekrarlı yapılmıştır.

ODc (sınır değer = cutt off) = Negatif kontrollerin ortalaması + 3 (negatif kontrollerin standart sapması)

OD (ortalama değer) = Örneklerin OD ortalamaları - ODc

ODc negatif çıkarsa sıfır olarak kabul edilir.

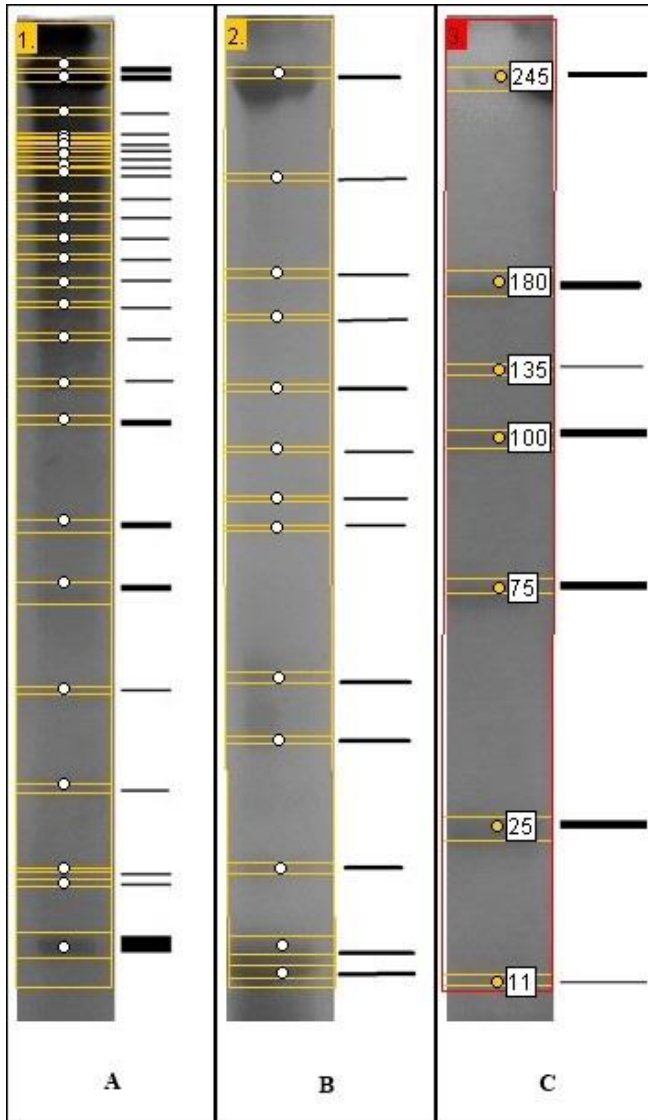
$OD \leq OD_c$	Biyofilm üretimi yok
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Zayıf biyofilm üretimi (+)
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Orta biyofilm üretimi (++)
$4 \times OD_c < OD$	Güçlü biyofilm üretimi (+++)

Şekil 4.9 Ortalama değerlerine (OD) göre mikroorganizmaların biyofilm üretim kapasitelerinin saptanmasında kullanılan yöntem.

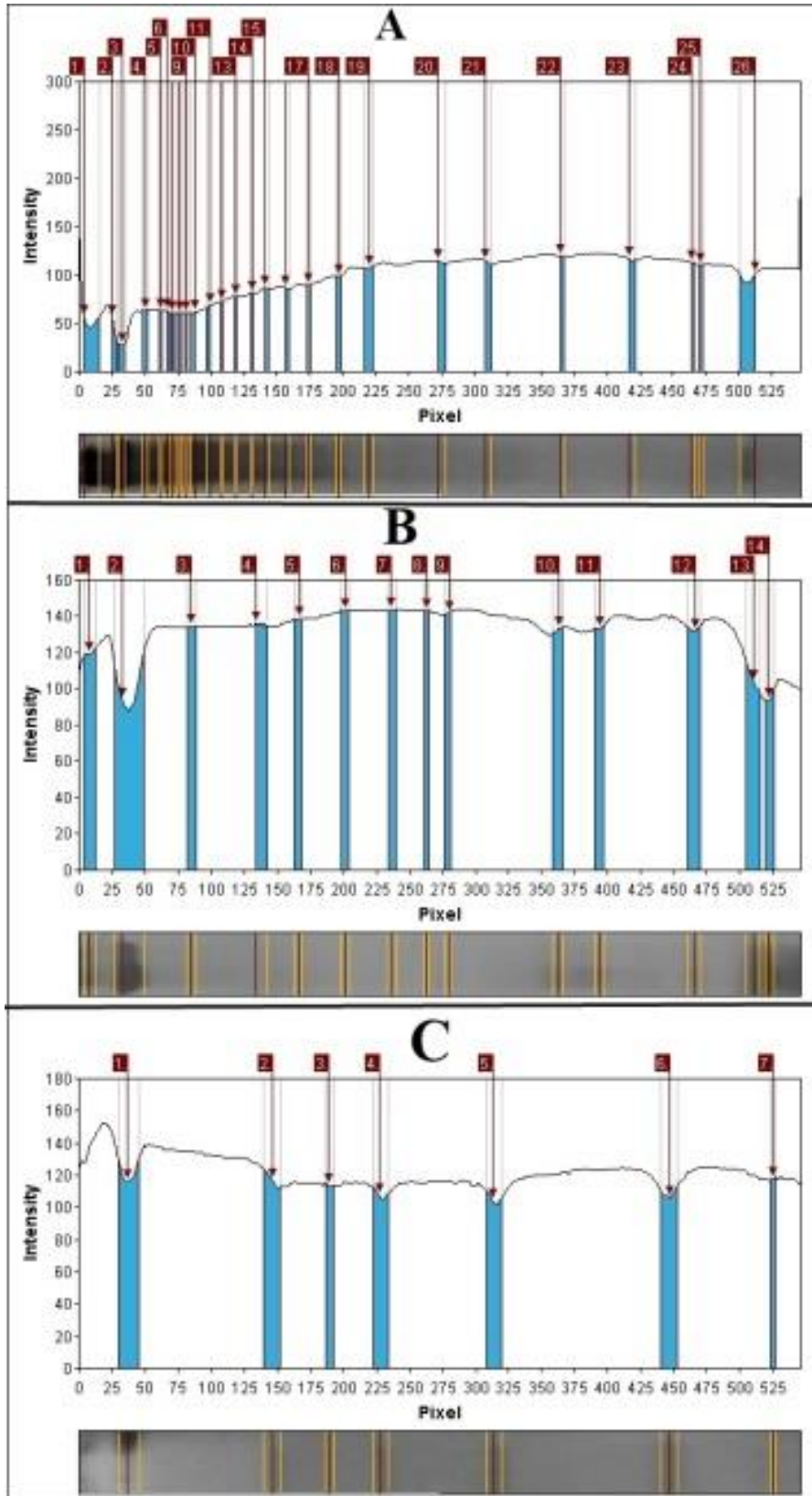
4.7. SDS-PAGE

P. kraepelini ve *A.gibbosus* akrep türlerine ait taze ve liyofilize edilmiş zehirler üzerlerine 100 µl Laemmli Buffer eklenmiş ve beş dakika 97°C’de proteinleri denatüre edilmiştir. Daha sonra 1 mm kalınlığında %5’lik istifleyici jeldeki tarak boşluklarına yükleme yapılmıştır. Ayrıca tarak boşluklarının birkaçına 50 µl Protein Ladder (Cleaver Prestained

Blue, Cat. CSL-BBL Sample) yüklenmiştir. Yürütme işlemi için elektroforez tankının anot ve katot uçlarına tank buffer solüsyonu eklenmiştir. İstifleyici jelde yürütme işlemi 20 mA olarak yapılmıştır. Ayırıcı jel kısmında ise 30 mA olarak sürdürülmüştür. Bir gece yürütme işlemi bittikten sonra jel Comassie Brilliant Blue ile boyanmıştır (Laemmli, 1970). Yine bir gece boyada bekleyen jel boya çıkarma solüsyonuna alınarak bantların görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Jeller fotoğraflanarak bilgisayara aktarılıp bantların protein markerlara karşılık gelen molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Bu işlem için Gel analyzer 1.91 programı kullanılmış ve programdan elde edilen protein bantlarının moleküler ağırlıkları aşağıda şekil 4.10, 4.11, 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.10 (A) *Aegaeobuthus gibbosus* bant konumlarının belirlenmesi, (B). *Protoiurus kraepelini* bant konumlarının belirlenmesi, (C). Cleaver Prestained Blue Protein Ladder 50 µl (Cat. CSL-BBL Sample) ait bant konumlarının belirlenmesi.



Şekil 4.11 (A) *Aegaeobuthus gibbosus* (B) *Protoiurus kraepelini* (C) Cleaver Prestained Blue Protein Ladder 50 µl (Cat. CSL-BBL Sample), bant konumlarının belirlenmesinde bantların oluşturmuş olduğu yoğunluğa bağlı piksel değerlerine göre bantların konumlarının belirlenmesi.

Band #	Rf	Raw volume	MW
1.	0,007	603	282
2.	0,046	211	261
3.	0,06	167	253
4.	0,091	317	238
5.	0,113	189	227
6.	0,122	186	223
7.	0,128	242	220
8.	0,139	180	215
9.	0,148	183	211
10.	0,161	245	206
11.	0,181	269	197
12.	0,197	219	190
13.	0,217	233	182
14.	0,239	243	173
15.	0,257	346	167
16.	0,285	344	157
17.	0,318	360	145
18.	0,359	496	131
19.	0,401	862	118
20.	0,496	790	92
21.	0,562	678	76
22.	0,666	478	54
23.	0,761	695	36
24.	0,847	337	23
25.	0,859	444	21
26.	0,934	1145	11

Band #	Rf	Raw volume	MW
1.	0,015	1199	277
2.	0,06	2299	253
3.	0,155	1075	208
4.	0,245	1355	171
5.	0,305	967	149
6.	0,367	1001	129
7.	0,431	1004	110
8.	0,481	715	96
9.	0,512	851	88
10.	0,664	1192	54
11.	0,72	1068	44
12.	0,852	1464	22
13.	0,932	1154	11
14.	0,954	763	8

Şekil 4.12 (A) *Aegaeobuthus gibbosus* (B) *Protoiurus kraepelini*'de tespit edilen bantların moleküler ağırlıklarını gösteren tablo.

4.7.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue (Sigma)	1,5 g
İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
dH ₂ O	650 ml

*Boya Whatman No:1 filtre kâğıdı ile süzülür amber şişede oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Tank Buffer

Trizma Bazı (Sigma)	1,21 g
Glisin	5,76 g

* 1000 ml dH₂O çözülür. (SDS- PAGE için %0,1 oranında SDS ilave edilir).

Laemmli Buffer

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	5,12 g
Gliserin (Merck)	8 g
dH ₂ O	3 ml
SD	2 ml
2-β-Merkaptoetanol	4 ml
Bromo Fenol Mavis (Merck)	0,025 ml

*Gün ışığına maruz bırakılmadan oda sıcaklığında saklanır.

Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue (Sigma)	1,5 g
İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
dH ₂ O	650 ml

*Hazırlanan bota Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülür ve oda sıcaklığında amber cam şişede saklanır.

Boya Çıkarma Çözeltisi

İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
dH ₂ O	650 ml

* Amber cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

Jel Saklama Çözeltisi

Jelin saklanması için %7'lik Glasiyal Asetik Asit çözeltisi kullanılır.

%10'luk Amonyum Per Sülfat (APS)

APS	1 g
Distile su	10 ml

*Her çalışmadan önce taze hazırlanır.

Jel Tamponu

3 M Tris Base, 1 M HCl, %0,3 SDS, pH: 8.45

Tris Base	363.2 g
dH ₂ O	600 ml
%10 SDS	30 ml
%37 HCl	86,2 ml

* pH kontrol edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

Akrilamid / Bisakrilamid (AB) Stok Çözelti

Akrilamid	48 g
Bisakrilamid	1,5 g
dH ₂ O	100 ml

%5'lık İstifleyici Jel Hazırlanışı

AB çözeltisi	0,5 ml
Jel tamponu	1 ml
dH ₂ O	4 ml
%10'luk APS	30 µl
TEMED	8 µl

%12'lik Ayırıcı Jel

AB çözeltisi	8 ml
Jel tamponu	6,68 ml
dH ₂ O	20 ml
%10'luk APS	25 µl
TEMED	20 µl

5. BULGULAR

5.1. Antibiyogram

Antibiyogram çalışması iki aşama olacak şekilde gerçekleştirildi. *P. kreapelinii* ait ham zehrin farklı konsantrasyonlarda boş disklere ekimi yapıldı (Şekil 5.1), çizelge 5.1’de sonuçları gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan 1/1 zehir konsantrasyonunun en yüksek aktiviteye sahip olduğu ve konsantrasyon azaldıkça gözlenen zon çaplarının düştüğü gözlemlenmiştir. En yüksek aktivite 1/1 konsantrasyonunda *S. aureus* (17 mm)’a karşı saptanmıştır (Çizelge 5.1), (Şekil 5.2). Gram (+) ve Gram (-) bakteriler arasında çok fark olmadığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra funguslara karşı da zehrin yüksek konsantrasyonlarda etkili olduğu görülmüştür.



Şekil 5.1 Disk difüzyon çalışmasına ait görüntü.



Şekil 5.2 *Protoiurus kraepelini*'nin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış zehir örneğinin *S. aureus*'a karşı aktivitesi.

Çizelge 5.1 *Protoiurus kraepelini* zehrinin çeşitli konsantrasyonlarının mikroorganizmalar üzerine etkisi.

Mikroorganizma	Akrep zehri konsantrasyon				
	<i>Protoiurus kraepelini</i> 1/1	<i>Protoiurus kraepelini</i> 1/50	<i>Protoiurus kraepelini</i> 1/100	<i>Protoiurus kraepelini</i> 1/200	<i>Protoiurus kraepelini</i> 1/500
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	17	15	12	11	10
<i>B. cereus</i> ATCC 7064	15	10	9	8	8
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	10	10	8	7	-
<i>E. coli</i> ATCC 11293	15	12	10	8	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27889	13	10	10	8	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	10	9	9	7
<i>C. parvulus</i> ATCC 22019	12	10	9	8	7
<i>C. kurusei</i> ATCC 6258	10	9	-	-	-

* *Aegaeobuthus gibbosus* örneklerinden tek seferde yeteri kadar zehir elde edilemediği için bu aşamada çalışmaya dahil edilmemiştir.

İkinci aşamada liyofilize halde elde edilen zehir örneklerinden *P. kraepelini* için 30000 µg - 3 µg ve *A. gibbosus* için 25000 µg – 2,5 µg oranında hazırlanan konsantrasyonlara ait sonuçlar çizelge 5.2’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre direkt zehir örneklerinden hazırlanan konsantrasyonların, liyofilize örneklerden hazırlanan konsantrasyonlara göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. İki akrep türüne ait liyofilize zehir örneğinin aktivite sonuçları karşılaştırıldığında *P. kraepelini*’nin daha yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Her iki zehir örneğinin Gram (-) bakteriler olan *S. flexneri* ve *K. pneumoniae* üzerinde tüm konsantrasyonlarının etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca her iki zehir örneğinin yüksek konsantrasyonlarının Gram (+) *S. aureus* üzerinde etkilerinin yüksek (13 mm) oldukları gözlenmiştir. Çizelge 5.2 incelendiğinde *B. cereus* üzerinde sadece *P. kraepelini*’nin en yüksek konsantrasyonun etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yine funguslar üzerinde *P. kraepelini*’nin en yüksek konsantrasyonunun kayda değer etki gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 5.2 Liyofilize edilmiş akrep zehrinin mikroorganizmalar üzerindeki etkisi ve kontrol sonuçları.

Mikroorganizma	Akrep zehiri-1					Akrep zehiri-2					Pozitif kontrol						
	<i>Protoiurus kraepelini</i> 30000 µg	<i>Protoiurus kraepelini</i> 3000 µg	<i>Protoiurus kraepelini</i> 300 µg	<i>Protoiurus kraepelini</i> 30 µg	<i>Protoiurus kraepelini</i> 3 µg	<i>Aegaeobuthus gibbosus</i> 25000 µg	<i>Aegaeobuthus gibbosus</i> 2500 µg	<i>Aegaeobuthus gibbosus</i> 250 µg	<i>Aegaeobuthus gibbosus</i> 25 µg	<i>Aegaeobuthus gibbosus</i> 2,5 µg	DA2 – Clindamycin	AM10 – Ampicillin	Lev5 - Levofloxacin	VA5 – Vancomycin	E15 - Erythromycin	Sxt25 - Trimetoprim-sulfametoksazol	TPZ110 - Piperasilin-tazobaktam
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	13	10	7	7	7	13	-	-	-	-	23	19	24				
<i>B. cereus</i> ATCC 7064	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23			17	24		
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	10	8	8	7	7	8	8	8	-	-		18	21		9		
<i>E. coli</i> ATCC 11293	12	10	7	-	-	-	-	-	-	-		15	30		12	20	
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	15	13	11	8	7	10	9	8	8	8					12	21	23
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27889	12	10	10	8	8	9	9	8	8	7			30	7	10	15	23
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	12	10	8	7	-	8	7	7	7	-		23	21			21	23
<i>C. parapilopsis</i> ATCC 22019	10	8	-	-	-	-	-	-	-	-							
<i>C. kurusei</i> ATCC 6258	10	8	7	-	-	8	7	7	-	-							

5.2. Zehir Örneklerinin Biyofilm Giderim Aktivitesi

Zehir örneklerinin biyofilm giderim aktivitesi 96 kuyucuklu platelerde çalışılmadan önce test edilecek bakterilerin biyofilm oluşturabilme yetenekleri klasik tüp tekniği ile çalışılmıştır. %0,25'lik safranin ile yapılan boyamanın şekil 5.3 görünümü elde edilmiştir.



Şekil 5.3 Mikroorganizmaların tüp yöntemi ile biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi.

İşlemin ardından çizelge 5.3'de verilen sonuçlar göz önünde bulundurularak %0,25 glikoz içeren TSB ortamının uygun olduğu ve elde edilen sonuçlara göre *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. Aeruginosa* ve *K. Pneumoniae*'e karşı biyofilm oluşturdukları gözlenmiştir.

Ayrıca şekil 5.4'de biyofilm oluşturan bu izolatların 96 kuyucuklu platelerde biyofilm oluşturma aktivitesi test edilmiş ve bu yolla bu izolatlar ile 96 kuyucuklu platelerde çalışma yapılmıştır.

Çizelge 5.3 Mikroorganizmaların biyofilm değerleri.

	Pozitif Kontrol	
Mikroorganizma	Ortalama değer	Biyofilm oluşumu
<i>Staphylococcus aureus</i> Gram (+) ATCC 6538	0,135	++
<i>Enterococcus faecalis</i> Gram (+) ATCC 51299	0,369	+++
<i>Escherichia coli</i> Gram (-) ATCC 11293	0,195	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Gram (-) ATCC 27853	0,280	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , Gram (-) ATCC 27889	0,405	+++

*Elde edilen sonuçlarla ilgili hesaplamalar aşağıda verilmiştir.

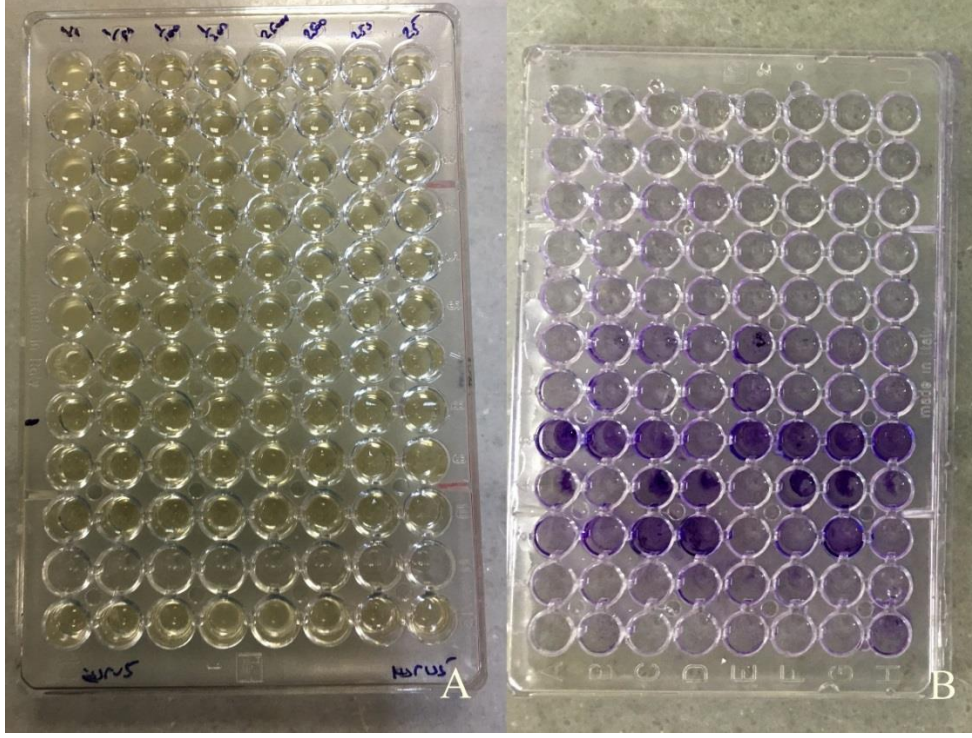
Negatif kontrol ortalaması: 0,054

Negatif kontrol standart sapması:0,00378

ODc: $0,054 + 3(0,00378) = 0,065$

$OD \leq 0,065$	Biyofilm üretimi yok
$0,065 < OD \leq 0,130$	Zayıf biyofilm üretimi (+)
$0,130 < OD \leq 0,260$	Orta biyofilm üretimi (++)
$0,260 < OD$	Güçlü biyofilm üretimi(+++)

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan taze ve liyofilize edilmiş akrep zehirlerinin biyofilm giderim aktiviteleri yukarıda biyofilm oluşturdıkları doğrulanmış bakteriler üzerinde denenmiştir (Şekil 5.4 A-B).



Şekil 5.4 (A) %0,25 glikoz içeren Tryptic Soy Agar (TSB)’da hazırlanmış taze ve liyofilize edilmiş akrep zehirlerinin plate görüntüsü, (B) %2’lik kristal viyole ile boyandıktan sonra plate görüntüsü.

P. kraepelini zehir örneklerinin (taze ve liyofilize) farklı konsantrasyonlarda bakteriler üzerindeki biyofilm giderim aktivite sonuçları çizelge 5.4 ve çizelge 5.5 ‘de detaylı olarak verilmiştir. Çizelge 5.4 ve çizelge 5.5 incelendiğinde taze zehir ve liyofilize örneklerinin biyofilm giderim aktivitesi açısından kayda değer bir farklılık gözlenmemiştir (ancak konsantrasyonları hazırlanan zehir miktarlarının eşit olmadığı göz önünde bulundurulmalıdır). Zehrin, biyofilm giderim aktivitesi açısından bakıldığında *S. aureus* dışında diğer bakterilerin biyofilm oluşturma kapasitesini engellediği gözlemlenmiştir. Çizelge 5.3 ile çizelge 5.4 karşılaştırıldığında normal şartlarda biyofilm oluşturma kapasitesi yüksek olan (++ veya +++ pozitif) bakteriler biyofilm üretemedikleri tespit edilmiştir

Çizelge 5.4 (A) *Protoiurus kraepelini* ham ve liyofilize zehrinin bakteri biyofilm oluşumu üzerine etkisi, (B) *Protoiurus kraepelini* spektrofotometre ortalama sonuçları ve biyofilm üretimleri.

(A)

	<i>Protoiurus kraepelini</i> zehir konsantrasyonları				<i>Protoiurus kraepelini</i> liyofilize akrep zehri			
	1/1	1/50	1/100	1/200	25000 µg	2500 µg	250 µg	25 µg
<i>Staphylococcus aureus</i> Gram (+)	0,116 +	0,101 +	0,333 ++	0,236 ++	0,285 ++	0,332 ++	0,342 ++	0,379 ++
<i>Enterococcus faecalis</i> Gram (+)	0,055 Biyofilm yok	0,060 Biyofilm yok	0,078 Biyofilm yok	0,066 Biyofilm yok	0,084 Biyofilm yok	0,073 Biyofilm yok	0,058 Biyofilm yok	0,062 Biyofilm yok
<i>Escherichia coli</i> Gram (-)	0,068 Biyofilm yok	0,065 Biyofilm yok	0,079 Biyofilm yok	0,047 Biyofilm yok	0,082 Biyofilm yok	0,079 Biyofilm yok	0,091 Biyofilm yok	0,064 Biyofilm yok
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Gram (-)	0,079 Biyofilm yok	0,061 Biyofilm yok	0,078 Biyofilm yok	0,070 Biyofilm yok	0,056 Biyofilm yok	0,064 Biyofilm yok	0,057 Biyofilm yok	0,057 Biyofilm yok
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , Gram (-)	0,061 Biyofilm yok	0,063 Biyofilm yok	0,062 Biyofilm yok	0,067 Biyofilm yok	0,056 Biyofilm yok	0,078 Biyofilm yok	0,063 Biyofilm yok	0,066 Biyofilm yok

(B)

Negatif kontrol ortalaması: 0,10025

Negatif kontrol standart sapması:0,000485

ODc: 0,10025+3(0,000485)=0,101705

OD ≤ 0,101705

0,101705 < OD ≤ 0,20341

0,20341 < OD ≤ 0,40682

0,40682 < OD

Biyofilm üretimi yok

Zayıf biyofilm üretimi (+)

Orta biyofilm üretimi (++)

Güçlü biyofilm üretimi(+++)

Çizelge 5.5 (A) *Aegaeobuthus gibbosus* ham ve liyofilize zehrinin bakteri biyofilm oluşumu üzerine etkisi, (B) *Aegaeobuthus gibbosus* spektrofotometre ortalama sonuçları ve biyofilm üretimleri.

(A)

	<i>Aegaeobuthus gibbosus</i> zehir konsantrasyonları				<i>Aegaeobuthus gibbosus</i> liyofilize akrep zehri			
	1/1	1/50	1/100	1/200	30000 µg	3000 µg	300 µg	30 µg
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Staphylococcus aureus</i> Gram (+)	0,077	0,073	0,97	0,077	0,077	0,073	0,079	0,262
	+	+	+	+	+	+	+	++
<i>Enterococcus faecalis</i> Gram (+)	0,095	0,094	0,077	0,151	0,079	0,083	0,107	0,129
	+	+	+	++	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> Gram (-)	0,101	0,091	0,184	0,186	0,072	0,78	0,080	0,085
	+	+	++	++	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram (-)	0,73	0,143	0,411	0,468	0,089	0,154	0,271	0,174
	+	++	+++	+++	+	++	++	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Gram (-)	0,116	0,120	0,131	0,768	0,208	0,182	0,170	0,314
	+	+	+	+++	++	++	++	+++

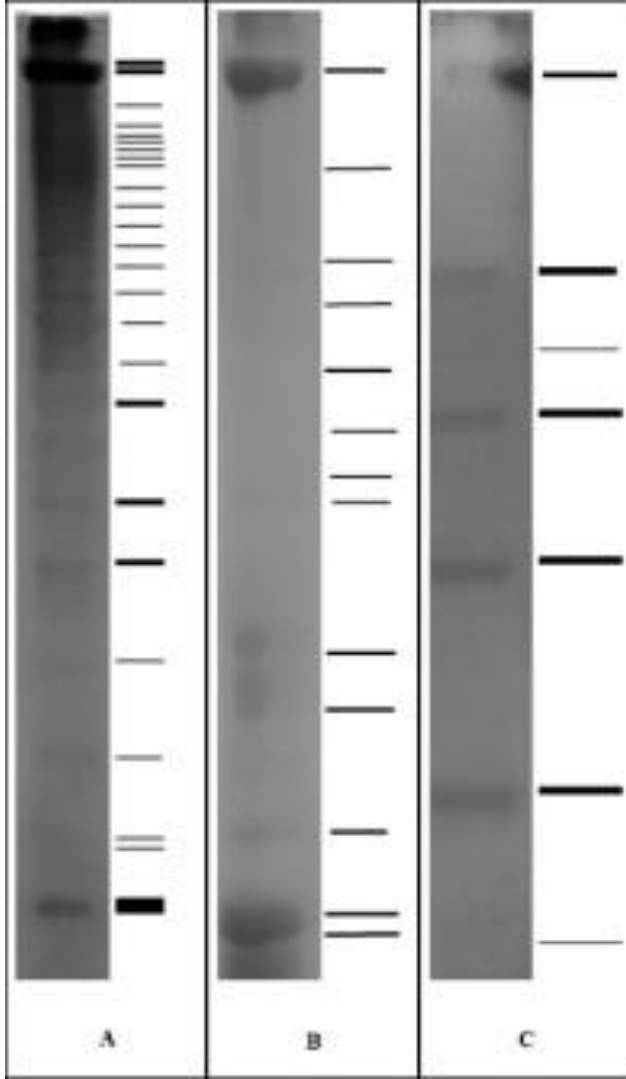
(B)

Negatif kontrol ortalaması: 0,0605	
Negatif kontrol standart sapması:0,00342	
ODc: 0,0605+3(0,00342)=0,07076	
OD≤ 0,07076	Biyofilm üretimi yok
0,07076 < OD ≤ 0,14152	Zayıf biyofilm üretimi (+)
0,14152 < OD ≤ 0,28304	Orta biyofilm üretimi (++)
0,28304 < OD	Güçlü biyofilm üretimi(+++)

P. kraepelini ve *A. gibbosus* taze ve liyofilize zehirlerinin bakterilerin biyofilm oluşumu üzerine etkileri karşılaştırıldığında *P. kraepelini* ait hem taze hem de liyofilize zehirlerin bakteri üzerinde daha etkili olduğu ve biyofilm üretimini daha fazla engellediği gözlemlenmiştir. *S. aureus* dışında diğer bakterilere karşı *P. kraepelini*'nin zehir örneklerinin biyofilm oluşumunu tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir.

5.3. SDS Page ile Akrep Zehirlerinin Molekül Ağırlıklarının Tespiti

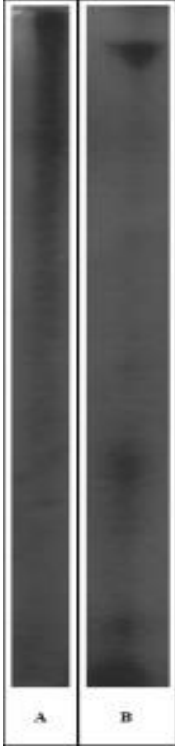
Çalışmamızda *P. kraepelini* ve *A. gibbosus* akrep türlerine ait taze ve liyofilize edilmiş zehirler Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak protein ağırlıkları elde edilmiştir.



Şekil 5.5 Akrep ham zehirlerinin SDS-PAGE ile elektroforetik ayrımı.(A). *Aegaeobuthus gibbosus* ham zehrine ait bant dizilimi, (B). *Protoiurus kraepelini* ham zehrine ait bant dizilimi, (C). Cleaver Prestained Blue Protein Ladder 50 µl (Cat. CSL-BBL Sample) ait bant dizilimi.

SDS-PAGE jel profil analizinde *P. kraepelini* ham zehrinin toplamda 14 adet bant verdiği bu bantların ~8 kDa ile ~277 kDa arasında olduğu görölmüştür (Şekil 5.5B). Bu 14 banttandır şekil üzerinde görüldüğü gibi ~8, 149, 277 kDa'luk bantların baskın olduğu tespit edilmiştir.

SDS-PAGE jel profil analizinde *A. gibbosus* ham zehrinin toplamda 26 adet bant verdiği bu bantların ~11 kDa ile ~282 kDa arasında olduğu görölmüştür (Şekil 5.5A). Bu 26 banttandır şekil üzerinde görüldüğü gibi ~11, 76, 92, 118, 261, 282 kDa'luk bantların baskın olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.6 Akrep liyofilize zehirlerinin SDS-PAGE ile elektroforetik ayrımı. (A). *Aegaeobuthus gibbosus* liyofilize zehir ait bant dizilimi, (B). *Protoiurus kraepelini* liyofilize zehir ait bant dizilimi.

SDS-PAGE jel profil analizinde *P. kraepelini* ve *A. gibbosus* akrep türlerine ait liyofilize zehirler yürütölmüş (üç tekrarlı), yukarıda ham zehir örneklerinde tespit edilen baskın bantlar dışında diğeri bantlar görölmemiştir (Şekil 5.6).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde akrep sokmaları yıllık 1,5 milyon insanın hastalık ve ölümünün en önemli kaynağı olarak görülmektedir. Akrep zehri üzerine yapılan ilk araştırmalar zehrin bileşenlerinin izolasyon ve yapısal karakterizasyonuna odaklanmışlardır. Böyle çalışmalar etkili antivenom terapilerini geliştirmek üzere planlanmıştır. Ancak daha sonra akrep venomundaki tüm bileşenlerin insanlara hastalık oluşturan etmenler olmadığı gözlenmiştir. Özellikle son yıllarda antibakteriyal, antimalaryal ve antienflamatör aktivite özellikleri ile birçok faydalı bileşenin tanımlandığı görülmüştür (Carcamo-Noriega ve ark., 2019). Bu çalışmalardan anlaşıldığı üzere araştırmaların odak noktası ilaç geliştirme üzerinedir ve bu da akrep zehrine ilgiyi arttırmıştır. Tez konusunun amacı da iki farklı akrep türünden elde edilen ham ve liyofilize edilmiş zehirlerin biyofilm kapasitesine sahip bakterilerin biyofilm oluşumunu inhibe etmek, zehrin mikrobiyal gelişmeyi engellemesi ve basit düzeyde zehrin karakterizasyonunun yapılması hedeflenmiştir. Ancak daha öncede antibiyogram çalışmalarında belirtildiği üzere *A. gibbosus* türüne ait akreplerden alınan ham zehrin tek seferde antimikrobiyal çalışmamızı yeterli olamayacağı gözlemlenmiştir. Akreplerin zehirleri liyofilize edilip toplanarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

Doğan (2015), yaptığı çalışmada *P. kraepelini* ham zehir örneğinin (1 mg/1 ml) *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiğini elde ettiği peptit fraksiyonlarından ise RPF6 olarak tanımladığı fraksiyonun 80 µg/ml konsantrasyonun da *E. coli*'nin büyümesini inhibe etmeye başladığı 300 µg/ml ise tamamen öldürdüğünü bildirmiştir. Araştırmacının bulgularına paralel olarak *P. kraepelini* zehri ile yapmış olduğumuz antimikrobiyal aktivite çalışmasında *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 5.1). Araştırmacının peptit fraksiyonlarıyla yapmış olduğu farklı konsantrasyon etkisi, liyofilize zehir örneklerinin farklı konsantrasyonlarında elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir (Çalışmamızda bu aşama ham zehrin liyofilize hali kullanılmıştır), (Çizelge 5.2).

Erdeş ve ark. (2014), *Leiurus abdullahbayrami* akrep zehrinin peptit profillerini sitotoksik etkilerini ve antimikrobiyal aktivitelerini çalışmışlardır. Antimikrobiyal aktivitesinin Gram-negatif bakterilere karşı daha güçlü etki gösterdiğini belirtmiştir. Antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan zehir konsantrasyonunu 20 mg/ml olarak belirlemiş ancak bizim çalışmamızda konsantrasyon miktarı tespit edemediğimiz için net bilgi elde

edilmese de mikroorganizmalara karşı *P. kraepelini* zehri *L. abduallahbayrami* akrep zehrine paralel sonuçlar vermiştir (Çizelge 5.1). *A. gibbosus* zehir örneklerinin ise diğer iki akrep türüne (*P. kraepelini* ve *L. abduallahbayrami*) nazaran daha düşük etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 5.2).

Çalışmamızda elde ettiğimiz etkin antimikrobiyal aktiviteye benzer çalışmalar farklı ülkelerden toplanan akrep zehirlerinin üzerine de yapılmış ve birçok araştırmacı tarafından literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışmalardan birisi Moerman ve ark. (2002), tarafından Güney Afrika akrebi *O. carinatus* venomu ile denenmiş ve gram-negatif bakterilere karşı yüksek aktivite gözlemlenmiştir. Diğer Bir çalışmada Gao ve ark. (2007), Çin'den topladıkları *B. martensii* zehrinin gram-negatif bakterilere nazaran gram-pozitiflere karşı daha etkili olduğunu gözlemlenmiştir. Samy ve ark. (2007), *B. hottenota* zehrinin denemiş oldukları gram-pozitif bakteriler arasında sadece *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu, *B. martensii* zehrinin ise denenilen gram-negatifler arasında sadece *E. aerogenes*'e karşı etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Diaz ve ark. (2009), *T. discrepans* zehrinden altı yeni peptit izole etmiş ve bu peptitlerin antimikrobiyal MİK testinde 20-80 µM düzeyinde ortamda bulunan bakterilerin tümünün gelişimini inhibe ettiğini bildirmiştir. Hernandez-Aponte ve ark. (2011), Meksika'dan topladıkları *V. mexicanus* zehrinden AMP izole etmiş ve bu peptitin çoklu ilaç direncine sahip klinik gram-negatif bakterilere karşı 4,4-50 µM oranında etki gösterdiğini saptamışlardır. Gao ve ark. (2018), *M. eupeus* zehrinden elde ettikleri AMP'nin birçok Gram (+) ve Gram (-) bakteriye karşı yüksek aktiviteyle geniş spektruma sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Teerapo ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* bakterisine karşı akrep zehrinden izole ettikleri BmKn-22 peptitlerinin hem biyofilm oluşumunu engellediği hem de daha önceden oluşmuş olan biyofilmler üzerinde etkili olduğunu gözlemlenmişlerdir. Ayrıca *P. aeruginosa* maruz bırakılmış memeli hücreleri üzerinde yine BmKn-22 peptitleri eklendiğinde düşük toksisite gözlemlenmiştir. Bulgularımızda *P. kraepelini* ait ham zehrinin ve liyofilize zehrin az miktarları bile *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşmasını tamamen engellediği, *A. gibbosus* ait ham zehrinin ve liyofilize zehrin biyofilm oluşumuna kayda değer etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.

Doğan ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada *P. kraepelini* akrep türüne ait zehrin tris glisin jel üzerindeki protein bant profilini çıkartmışlardır. Çalışmalarında ~10 - 250 kDa

aralığında toplamda 22 bant tespit etmişler ve bunlardan ~10 kDa bandın temel bant olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca ~10 kDa'dan daha küçük peptitler için çalışma yapılmış ~2 - 10 kDa arasında da bantlar oluştuğunu gözlemlemişlerdir. *P. kraepelini* ham zehrinin SDS-PAGE protein profili analizi sonucunda elde ettiğimiz bulgular ile Doğan ve ark. (2018) çalışmasını karşılaştırdığımızda toplamda 14 bant elde ettiğimiz ve ~8 - 277 kDa aralığında olduğu (Şekil 5.5) göz önünde bulundurulduğunda uyumlu sonuçlara ulaşılmıştır.

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda (Chen ve ark., 2003; Li ve ark., 2018) akrep zehirlerinin liyofilize halleri çeşitli biyolojik analizlerde kullanılmıştır. Çalışmamızın bir safhasında ham zehre karşı liyofilize örneğinin antimikrobiyal, antibiyofilm ve SDS-PAGE protein profil analizini çalıştık. Elde ettiğimiz sonuçlarda zehrin liyofilize halinin ham zehre nazaran biyolojik aktiviteler açısından daha az etkili olduğu ve protein profil analizinde daha az bant gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda liyofilize akrep zehri ile yapılacak çalışmalarda muhtemelen daha az biyolojik etki göstereceği ve daha az peptit fraksiyonları vereceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Akrep zehirleri üzerinde yaptığımız çalışmalarda ham ve liyofilize zehirlerin az miktarları bile antibakteriyel etki gösterdiği ancak *P. kraepelini* akrep zehrinin, *A. gibbosus*'a göre bakteriler üzerinde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.2). Yine ATCC suşlar üzerinde yaptığımız çalışmalarda bakterilerin biyofilm aktiviteleri ölçülmüştür. Akrep zehri eklenmiş ortamlar karşılaştırılarak hem ham zehir kullanılan hem de liyofilize zehirler akreplerin biyofilm oluşturma potansiyellerini düşürdüğü ancak *P. kraepelini* akrep zehirlerinin *A. gibbosus*'a göre biyofilm oluşumunu daha aza indirdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 5.4 ve 5.5). Zehirler SDS-PAGE yöntemi kullanılarak moleküler ağırlıkları hakkında da bilgi verilmiştir (Şekil 5.5). Buna göre *P. kraepelini* akrep türüne ait zehirlerin molekül ağırlığı ~8, 277 kDa, *A. gibbosus* akrep türüne ait zehirlerin molekül ağırlığı ise ~11, 282 kDa arasında gözlemlenmiştir.

Bir çok farklı ülkeden araştırmacı tarafından akrep zehirlerinin peptitleri elde edilmiş ve bu peptitlerden türetilen peptit fraksiyonlarının mikrobiyal ve kanser çalışmalarında kullanıldıkları literatür özeti kısmında kapsamlı olarak verilmiştir. Çalışmamız kapsamında SDS-PAGE analizi ile elde ettiğimiz bant profil verileri akrep zehirlerinin farklı proteinlere sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmamızın devamında bu proteinlerin tespit edilip peptit

fraksiyonlarının keşfedilmesi ve hangi peptitlerin antibiyofilm etkiye sahip olduğunun ortaya konulması planlanmaktadır. *A. gibbosus* ve *P. kraepelini* akrep zehirlerinin az miktarı bile bakterileri inhibe ettiği, yapılacak çalışmalar ile antibiyotiğe direnç gösteren bakterilere karşı kullanılabileceği ortaya çıkmıştır. Ayrıca söz konusu akrep zehirlerinden elde edilecek peptitler, biyofilm kapasitesi olan mikroorganizmaların etkinliğini azaltmada ve yok etmede kullanılabilecektir. İleri düzeyde yapılacak çalışmalardan yeni peptitlerin tanımlanarak bu peptitlerden yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilecektir. Mikrobiyolojik çalışmaların yanı sıra onkolojik araştırmalarda da akrep zehrinin etkileri üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Bu doğrultuda ilerleyen çalışmalarda akrep zehrinin kanser oluşumunu önlemesi ya da kanserin tedavi aşamasında uygulanabilecek alternatif biyolojik ajan olarak kullanılması üzerine proje planlamaktayız.



KAYNAKÇA

- Akdeniz, M. 2018. *Euscorpius mingrelicus* (Scorpiones: Euscorpiidae) akrep hamzehrinin anti-tümör etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 57 s.
- Al-Asmari, A., Manthiri, RA., Abdo, N., Al-Duaiji, F., and Khan H., 2017: Saudi medicinal plants for the treatment of scorpion sting envenomation. Saudi Journal of Biological Sciences, Vol. 24(6), pp. 1204-1211.
- Arar, D. 2015. Bakteriyal Biyofilm Oluşumu. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 85 s.
- Babaşoğlu, A., 1999, Örümcekgiller (Arachnida), N. Ü. Yayını, 67 s.
- Baradaran, M., Jalali, A., Jolodar, A., and Ghasemian S., 2012: A new caerin-like antibacterial peptide from the venom gland of the Iranian scorpion *Mesobuthus eupeus*: cDNA amplification and sequence analysis, African Journal of Biotechnology, Vol. 11(44), pp. 10176-10181.
- Bea, R., Petraglia, A., Ascutto, M. and Buck, Q., 2017: Antibacterial Activity and Toxicity of Analogs of Scorpion Venom IsCT Peptides. Antibiotics, Vol: 6(13).
- Brownell, P. and Polis, G., 2001: Scorpion Biology and Research, Oxford University Press.
- Büyükkartal, O. 2018. *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae) akrep ham zehrinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemini kullanarak mcf-7 meme kanser hücre hattı üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 56 s.
- Cao, L., Dai, C., Fan, Z., Song, Y., Wu, Y., Cao, Z., and Li, W., 2012a: Antibacterial Activity and Mechanism of a Scorpion Venom Peptide Derivative In Vitro and In Vivo. Plosone, Vol. 7(7).

- Cao, L., Li, Z., Zhang, R., Wu, Y., Li, W., and Cao, Z., 2012b: StCT2, a new antibacterial peptide characterized from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. *Peptides*, Vol. 36, pp. 213-220.
- Carcamo-Noriega, E.N., Sathyamoorthi, S., Banerjee, S., Gnanamani, E., Mendoza-Trujillo, M., Mata-Espinosa, D., Hernández-Pando, R., Veytia-Bucheli, J.I., D. Possani, L. and N. Zare, R., 2019: 1,4-Benzoquinone antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* derived from scorpion venom. *PNAS*, Vol. 116, No. 36, pp. 12642-12647.
- Chen, T., Folan, R., Kwok, H., O'Kane, E. J., Bjourson, A. J., & Shaw, C. (2003): Isolation of scorpion (*Androctonus amoreuxi*) putative alpha neurotoxins and parallel cloning of their respective cDNAs from a single sample of venom. *Regulatory peptides*, Vol.115(2), pp. 115-121.
- Chen, Y., Cao, L., Zhong, M., Zhang, Y., Han, C., Li, Q., Yang, J., Zhou, D., Shi, W., He, B., Liu, F., Yu, J., Sun, Y., Cao, Y., Li, Y., Li, W., Guo, D., Cao Z., and Yan H., 2012: Anti-HIV-1 Activity of a New Scorpion Venom Peptide Derivative Kn2-7. *Plusone*, Vol. 7(4).
- Çakmak, A. 2007. *Androctonus crassicauda* ve *Mesobuthus gibbosus* Türü Akrep Venomlarının İzole Sıçan Vas Deferans üzerinde Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 116 s.
- Çalışkan, F. 2008. *Androctonus crassicauda* Türü Akrep Venomundan Peptid Toksinlerin Saflaştırılması Gen Klonlanması ve Hücre Kültüründe Biyokimyasal Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 101 s.
- Diaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, j., Sherman, N., and Fox, j., 2009: Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon*, Vol. 54, pp. 802-817.

- Doğan, T. 2015. *Protoiurus kraepelini* (Scorpiones: Iuridae) Zehrinin Peptidomik Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Taraması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 132 s.
- Doğan, T., İğci, N., Biber, A., Gerekçi, S., Hüsnügil, H.H., İzbrak, A. ve Özen, C., 2018: Peptidomic characterization and bioactivity of *Protoiurus kraepelini* (Scorpiones: Iuridae) venom. Turkish Journal of Biology, Vol. 42, pp. 490-497.
- Ekmekçioğlu, G. 2019. Çoklu İlaç Direncine Sahip Biyofilm Oluşturan Nozokomial Bakterilere Karşı Akrep (Scorpionidae) Zehrinin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kastamonu, 64 s.
- Erdeş, E., Doğan T., Çoşar, İ., Danışman, T., Kunt, K., Şeker, T., Yücel, M., and Özen C., 2014: Characterization of *Leiurus abduhbayrami* (Scorpiones: Buthidae) venom: peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, Vol. 20(48).
- Extracting purification of scorpion venom. Chine., 2007. <https://patents.google.com/patent/CN101028287A/en> (Erişim tarihi: 05.09.2007).
- Gao, B., Tian, C., and Zhu, S., 2007: Inducible antibacterial response of scorpion venom gland. Peptides, Vol. 28, pp. 2299-2305.
- Gao, B., Dalziel, J., Tanzi S., and Zhu, S., 2018: Meucin-49, a multifunctional scorpion venom peptide with bactericidal synergy with neurotoxins. Amino Acids, Vol. 50, pp. 1025-1043.
- Gess, R.W. 2013: The earliest record of terrestrial animals in Gondwana: A scorpion from the Famennian (Late Devonian) Witpoort Formation of South Africa. African Invertebrates, Vol.54 (2), pp.373–379.
- Hernández-Aponte, C., Silva-Sanchez, J., Quintero-Hernández, V., Rodríguez-Romero, A., Balderas, C., D. Possani, L., B. Gurrola, G., 2011: Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. Toxicon, Vol. 57, pp. 84-92.

- İnanç, M. 2010. Muğla İli ve Civarının Akrep (Scorpiones) Faunasının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir 52 s.
- Kamaoğlu, A. 2014. *Calchas nordmanni* Venomunda Bulunan Peptidlerin Antibakteriyal Aktivitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 67 s.
- Kapu, F. 2014. Akrep Zehirlerinin Alabalıklarda Kan Parametreleri Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep 47 s.
- Koçak, D. 2015. Akrep Venom Peptidlerinin Kristalizasyonu, Yapısal Karakterizasyonu ve Benzeşim Modellemesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara 85 s.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, Vol. 227(5259), pp. 680-685.
- Li, B., Lyu, P., Xi, X., Ge, L., Mahadevappa, R., Shaw, C., & Kwok, H. F. (2018): Triggering of cancer cell cycle arrest by a novel scorpion venom-derived peptide-Gonearrestide. Journal of cellular and molecular medicine, Vol. 22(9), pp. 4460-4473.
- Li, Z., Yuan, Y., Li, S., Deng, B., and Wang Y., 2020: Antibacterial activity of a scorpion-derived peptide and its derivatives *in vitro* and *in vivo*. Toxicon, Vol. 186, pp. 35-41.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe1, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Van Eldere, J., Walt J., and Verdonck F., 2002: Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. Eur. J. Biochem, Vol. 269, pp. 4799–4810.

- Özkan, Ö. ve Karaer, K.Z. 2004. Akreplerin Vücut Yapıları. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji-Entomoloji Bilim Dalı, Ankara 58 s.
- Possani, L. D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F. and Becerril, B., 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion. Channels Biochimie, Vol.82, pp.861-868.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., Thwin, M.M., Chow, T.K.V., Bow, H., Yap E.H., and Thong, T.W.J. 2007: Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology, Vol. 102, pp. 650–659.
- Subramani, K., Jung, R.E., Molenberg, A. and Hämmerle, C. H. F. 2009: Biofilm on Dental Implants: A Review of the Literature. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants Vol. 24, pp. 616–626.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., and S`vabic-Vlahovic M., 2000: A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, Vol. 40(2009), pp. 175-179.
- Teerapo, K., Roytrakul, S., Sistayanarain, A. and Kunthalert, D., 2019: A scorpion venom peptide derivative BmKn-22 with potent antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. PlosOne, Vol. 14(6), pp.1-17.
- Töreci, K., 2003. Antibiyotik Kullanımı ve Direnç İlişkisi. Flora Vol. 8, No. 2, pp.89-110.
- Ulutaş, V. 2017. *Leiurus abdullahbayrami* Türü Akrep Venomunun Proteomik Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 53 s.
- Uysal, İ. 2014. Akrep Zehrinin Balık Üzerinde Median Lethal Doz (LD50) Oranının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Gaziantep 46 s.

Yeşilyurt, F. 2005. Anadoludaki Bazı Akrelerin Sistematığı ve Biyoekolojisi (Arachnida: Scorpionida). Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırklareli, 91 s.

Yeşilyurt, F. 2011. Güneybatı Anadolu Bölgesi Akrelerinin Taksonomisi Ve Biyoekolojisi (Arachnida: Scorpionida). Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırklareli, 156 s.

Zerouti, K., Khemili, D., Laraba-Djebari, F., and Hammoudi-Triki, D., 2019. Nontoxic fraction of scorpion venom reduces bacterial growth and inflammatory response in a mouse model of infection. In: Taylor and Francis Group, Toxin Reviews, Algiers, Algeria, pp. 1-15.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı Hakan Geneci

Eğitim Bilgileri

Önlisans Anadolu Üniversitesi/ Yunus Emre Meslek Yüksekokulu/
Tıbbi Laboratuvar Teknikleri ,
Mezuniyet 11.06.2011

Lisans Anadolu Üniversitesi/ İşletme Fakültesi/İşletme,
Mezuniyet 03.06.2013

Lisans-2 Sinop Üniversitesi/ Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji,
Mezuniyet 02.06.2019

Yüksek Lisans Atatürk Üniversitesi/ Sosyal Bilimler Enstitüsü/Sağlık
Yönetimi/ Sağlık Kurumları İşletmeciliği,
Mezuniyet 25.02.2015

İş Deneyimi

21.06.2010–30.07.2010 Erciyes Üniversitesi Merkez Laboratuvarı, Hematoloji
Laboratuvarı

26.08.2013 - 15.10.2014 T.C. Sağlık Bakanlığı Narman İlçe Devlet Hastanesi,
Laboratuvar

30.10.2014 -09.03.2016 Samsun Kavak Toplum Sağlığı Merkezi, Laboratuvar

23.03.2016- Sinop Halk Sağlığı Laboratuvarı, Laboratuvar
