

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**Bazı Kurbağa Deri Salgılarının Biyoaktivitelerinin
Belirlenmesi**

Mert KARIŞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bayram GÖÇMEN

İkinci Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim dalı kodu: 401.04.00

Sunuş Tarihi: 18.12.2017

Bornova- İZMİR

2017

Mert KARIŞ tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Bazı Kurbağa Deri Salgılarının Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.12.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Bayram GÖÇMEN

İmza

.....

Raportör Üye: Doç. Dr. Hüsniye Tansel YALÇIN

.....

Üye : Prof. Dr. Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ

.....

Üye : Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI

.....

Üye : Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Bazı Kurbağa Deri Salgılarının Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

21 / 11 / 2017

İmzası

Mert KARIŞ

ÖZET**BAZI KURBAĞA DERİ SALGILARININ BİYOAKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

KARIŞ, Mert

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bayram GÖÇMEN

İkinci Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Aralık 2017, 88 sayfa

Bu çalışmada, bazı kurbağa/semender deri salgılarının biyoaktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda farklı bölgelerde dağılışı gösteren beşi kuyuksuz kurbağa (*Anura*), diğer beşi de kuyruklu kurbağa (*Urodela*) olmak üzere toplam 10 farklı kurbağa/semender deri salgısı örneği ile çalışılmıştır. Bu taksonlar; Kırmızı Kurbağa (*Bombina bombina*), Ağaç Kurbağası (*Hyla orientalis*), Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*), Levanten Ova Kurbağası (*Pelophylax bedriagae*), endemik Anadolu Kurbağası (*P. caralitanus*), endemik Fazıla'nın Likya Semenderi (*Lyciasalamandra fazilae*), endemik Marmaris Kara Semenderi (*L. flavimembris*), Pürtüklü Semender (*Triturus ivanbureschi*), endemik Anadolu Benekli Semenderi (*Neurergus strauchii strauchii*) ve endemik Baran'ın Anadolu Benekli Semenderi (*N. s. barani*)'dir.

Bireysel farklılıkları standardize etmek amacıyla aynı türün farklı bireylerinden çok küçük elektriksel uyarı verilerek toplanan deri salgısı örnekleri örnekleme havuzunda bir araya getirilmiş ve denemelerde kullanılmak üzere liyofilize edilmiştir. Elde edilen ham deri salgılarının total protein miktarları, SDS-PAGE protein profilleri, antimikrobiyal aktiviteleri, normal ve kanserli hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, salgıların eritrositler üzerindeki hemolitik etkileri de belirlenmiştir.

Taranan 10 farklı deri salgısı örneğinin de yüksek biyoaktivite gösterdiği ortaya konmuştur. En yüksek total protein miktarı *B. bufo* (3100 µg/ml) ham deri

salgısında saptanmıştır. SDS-PAGE protein profillerine bakıldığında en yüksek protein fraksiyonu sayısı *T. ivanbureschi*'de (20 fraksiyon) belirlenmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 1.95 µg/ml MIC değeri ile *P. bedriagae* deri salgısı *C. albicans* üzerine göstermiştir. Belirlenen en yüksek sitotoksik etkiyi 0.35 ve 0.85 µg/ml IC₅₀ değerleri ile *B. bufo* deri/parotoid bez salgısı, sırasıyla sağlıklı HEK-293 (insan embriyonik böbrek) ve A549 (akciğer) kanser hücre hattı üzerine göstermiştir. Tavşan kırmızı kan hücreleri (eritrositler) üzerindeki en yüksek hemolitik etki yüzdesi *T. ivanbureschi* (%115.1) deri salgısında belirlenirken, *B. bufo*, *L. flavimembris* ve *L. fazilae* salgılarında hemolitik etki saptanmamıştır.

Sonuç olarak çalışılan kurbağa/semender deri salgılarının biyoaktiviteleri literatürde ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca, sonuçlar kurbağa/semender deri salgılarının yüksek miktarda protein/peptid içerdiğini, kanser hücreleri ve mikroorganizmalar üzerinde önemli oranlarda inhibisyon sağlayarak terapötik potansiyeli yüksek doğal kaynaklar olduklarını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Kurbağa, deri salgısı, protein miktarı, SDS-PAGE, antimikrobiyal aktivite, sitotoksiste, hemolitik etki.

ABSTRACT**DETERMINATION OF BIOACTIVITIES OF SOME AMPHIBIAN SKIN SECRETIONS**

KARIŞ, Mert

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Bayram GÖÇMEN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

December 2017, 88 pages

In this study, the main aim was to determine the bioactivities of some amphibian skin secretions. Within this scope, skin secretion samples of five tailless amphibians (Anura) and five tailed amphibians (Urodela) from different regions were studied. These taxa are; Fire-bellied Toad (*Bombina bombina*), Tree Frog (*Hyla orientalis*), Common Toad (*Bufo bufo*), Levantine Frog (*Pelophylax bedriagae*), endemic Anatolian Frog (*P. caralitani*), endemic Fazıla's Lycian Salamander (*Lyciasalamandra fazilae*), endemic Marmaris Salamander (*L. flavimembris*), Balkan-Anatolian Crested Newt (*Triturus ivanbureschi*), endemic Anatolian Spotted Newt (*Neurergus strauchii strauchii*) and endemic Baran's Anatolian Spotted Newt (*N. s. barani*).

In order to standardize individual differences, the secretion samples were collected from various individuals of the same species via very mild electrical stimulation and then gathered in the sampling pool followed by lyophilisation in order to be used in the experiments. The total protein amounts, SDS-PAGE protein profiles, antimicrobial activities, cytotoxic effects of these crude skin secretions on normal and cancer cell lines were determined. In addition, hemolytic effects of skin secretions on the erythrocytes were investigated.

Consequently, all of the 10 different skin secretion samples showed high bioactivities. The highest total protein amount was found in *B. bufo* (3100 µg/ml) skin-parotoid secretion. The highest numbers of protein fractions were determined

with SDS-PAGE in the skin secretion of *T. ivanbureschi* (20 fractions). The most potent antimicrobial activity was observed by *P. bedriagae* skin secretion with a MIC value of 1.95 µg/ml on *C. albicans*. *B. bufo* skin-parotoid secretion was showed the highest cytotoxic effects on non-cancerous HEK-293 (human embryonic kidney) and cancerous A549 (lung) cell lines with IC₅₀ values of 0.35 and 0.85 µg/ml. No hemolytic effect was found with the skin secretions of *B. bufo*, *L. flavimembris* ve *L. fazilae* while the highest hemolytic effect on erythrocytes was determined with 50 µg/ml concentration of *T. ivanbureschi* skin secretion (115.1%).

As a result, bioactivities of the studied amphibian skin secretions were determined for the first time in literature. Besides, the results indicated that these crude skin secretions have high inhibition on cancer cell lines and microorganisms with a high amount of protein/peptide content making them valuable natural resources with high therapeutic potential.

Keywords: Amphibian, skin secretion, protein amount, SDS-PAGE, antimicrobial activity, cytotoxicity, hemolytic effect.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden sürekli yararlandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Bayram GÖÇMEN'e, çalışmam süresince bana yol gösteren ve başta sitotoksosite testleri olmak üzere her aşamada yönlendiren ikinci danışman hocam sayın Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a, antimikrobiyal aktivite testlerindeki destekleri başta olmak üzere çalışmamın genelinde verdiği desteklerden dolayı sayın Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN'a, protein profillerinin belirlenmesi (SDS-PAGE) aşamalarında verdikleri destekler ve öneriler için Yrd. Doç. Dr. Naşit İĞCİ ve Dr. Ramazan URANLI'ya, sitotoksosite testlerini gerçekleştirdiğimiz E.Ü. AREL laboratuvarı ve personeline, liyofilizasyon ve santrifüj gibi cihaz gerektiren aşamalardaki destekleri için sayın Prof. Dr. İhsan YAŞA'ya tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Doktora çalışmama 114Z599 nolu proje ile destek veren TÜBİTAK'a, 15-FEN-004 nolu proje ile destek veren Ege Üni. BAP'a, 15-BİL-006 nolu proje ile destek veren EBİLTEM'e sağladıkları maddi destek için teşekkürü borç bilirim.

Son olarak doktora öğrenimim süresince yanımda olan beni her zaman destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Türkiye’de Dağılışı Gösteren Kurbağalar ve Genel Dağılışı Alanları	3
2.2. Kurbağa Deri ve Salgılarının Genel Özellikleri	5
2.3. Antimikrobiyal Peptidler	7
2.3.1. Anyonik antimikrobiyal peptidler	9
2.3.2. Katyonik antimikrobiyal peptidler	10
2.4. Kurbağa Deri Salgılarının Biyoteknolojik Kullanımı ve Terapötik Potansiyeli	14
2.5. Kurbağa Deri Salgılarının Antimikrobiyal, Sitotoksik ve Hemolitik Etkileri ..	16
3. MATERYAL METOD.....	29
3.1. Arazi Çalışmaları	29
3.2. Deri/Parotoid Bez Salgısı Sağımı	29
3.3. Liyofilizasyon ve Sterilizasyon	30

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.4 Total Protein Miktar Tayini	31
3.5. Protein Profillerinin Belirlenmesi (SDS-PAGE).....	32
3.6. Antimikrobiyal Aktivite	34
3.7. Sitotoksosite Testleri.....	36
3.8. Hemolitik Etki Testleri.....	37
4. BULGULAR.....	39
4.1. Arazi Çalışmaları	39
4.2. Liyofilizasyon	41
4.3 Total Protein Miktarları.....	42
4.4 Protein Profilleri (SDS-PAGE).....	43
4.5. Antimikrobiyal Aktivite	48
4.6. Sitotoksosite	52
4.7. Hemolitik Etki	61
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	63
6. ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.2.1. Kurbağa derisinin yapısı ve tabakalanmaları.....	6
2.2.2. Likya semenderlerinde salgı açıklıklarının (SAB) genel görünüşü	7
2.3.2.1. Antimikrobiyal peptidin α -helikal yapısı.....	11
2.3.2.2. Etki mekanizması için SMH (Shai-Matsuzaki Huang) modeli.....	12
2.3.2.3. Antimikrobiyal peptid modelleri.....	13
3.2.1. Kırmızı Kurbağa (<i>Bombina bombina</i>)’da temsili deri salgısı sağımı.....	30
4.1.1. Deri salgıları ile çalışılan kurbağa/semender türlerinin temsili fotoğrafları.....	40
4.1.2. Kurbağa semender türlerinin bulundukları lokasyonlar.....	41
4.3.1. BSA standart protein absorbansları ile hazırlanan eğri, denklemi ve eğimi	42
4.4.1. <i>B. bombina</i> deri salgısının moleküler ağırlıklarına göre protein profili.....	43
4.4.2. <i>B. bufo</i> deri salgısının moleküler ağırlıklarına göre protein profili	44
4.4.3. <i>T. ivanbureschi</i> deri salgısının moleküler ağırlıklarına göre protein profili	45
4.4.4. <i>L. flavimembris</i> , <i>P. bedriagae</i> ve <i>P. caralitanus</i> deri salgılarının moleküler ağırlıklarına göre protein profilleri	46
4.4.5. <i>L. fazilae</i> , <i>H. orientalis</i> , <i>N. s. barani</i> ve <i>N. s. strauchii</i> deri salgılarının moleküler ağırlıklarına göre protein profilleri	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6.1. Farklı konsantrasyonlarda kurbağa/semender deri salgıları uygulanan farklı hücre hatlarında 48 saat sonunda gözlenen canlılık oranları (%).	55
4.6.2. HEK-293 hücre hattı.....	56
4.6.3. CaCo-2 hücre hattı.....	57
4.6.4. HeLa hücre hattı.....	58
4.6.5. A549 hücre hattı.....	58
4.6.6. U87MG hücre hattı.....	59
4.6.7. MPanc-96 hücre hattı	59
4.6.8. PC-3 hücre hattı.....	60
4.6.9. MDA-MB-231 hücre hattı	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.1. Türkiye’de dağılışı gösteren kurbağa türleri ve dağılışı alanları	3
4.1.1. Deri salgıları ile çalışılan taksonlar	39
4.2.1. Liyofilize salgı örneklerinin kuru ağırlıkları	41
4.3.1. Deri salgılarının total protein miktarları.....	42
4.5.1. Ham deri salgıları ve standart mikrobiyal ajanların MIC değerleri.....	50
4.5.2. Ham deri salgılarının MBC ve MFC değerleri	51
4.6.1. Kurbağa/semender deri salgılarına maruz bırakılan hücre hatlarının IC ₅₀ değerleri	54
4.7.1. Kurbağa/semender deri salgılarına maruz bırakılan tavşan kırmızı kan hücrelerinde tespit edilen hemolitik etkiler.....	62



1. GİRİŞ

Hayvansal salgılar çok eski dönemlerden beri doğa bilimcilerin, araştırmacıların ve hatta toplumun ilgisini çekmiştir. Son yıllarda peptid/protein tabanlı ilaç geliştirme çalışmalarının ön plana çıkması ile doğal kaynaklar olan ve yüksek protein/peptid içeriğine sahip olan hayvansal salgılara olan ilgi oldukça artmış ve hızla artmaya da devam etmektedir.

Dünya genelinde farklı kurbağa ve semender türlerinin deri salgıları yüzyıllardır geleneksel olarak bazı toplumlarda kullanılmış ve kullanılmaya devam etmektedir. Bazı toplumlar (özellikle Asya ve Uzakdoğu ülkeleri) yaraların ve hastalıkların tedavisinde bu salgıların iyileştirici etkisinden faydalanmakta iken, bazı ilkel toplumlar ise zehirli türlerden elde edilen salgılara batırdıkları okları avlanma/savunma amaçlı kullanmış ve halen kullanmaktadırlar. Çok zengin bir içeriğe ve karmaşık bir yapıya sahip olmasının yanında yüksek terapötik potansiyele sahip olması nedeniyle bu doğal bileşikler değerli birer biyolojik kaynak olarak özellikle son yıllarda bilimsel alanda büyük önem kazanmaya başlamıştır.

Kurbağa ve semender deri salgılarının biyolojik olarak aktif içeriği türden türe farklı olmakla birlikte özellikle peptidler/proteinler, steroidler, alkaloidler, biyojenik aminler ve enzimleri içermesinden dolayı oldukça zengindir. Bazı türlerin deri salgıları çok yüksek toksisite gösterip ölümlü sonuçlanabilecek etki oluşturabilirken; diğer bazı türlerin deri salgılarının ise belli konsantrasyonlarda uygulandığında sitotoksik, antibakteriyal, antifungal, antiparazitik/antiprotozoal, antidiyabetik, antiviral, yara iyileştirici, analjezik, antineoplastik, immünomodulator, kardiyotonik, antiaritmik, miyotropik, anjiyotensinojenik, antioksidatif etkilere; ayrıca mast hücre degradasyonu, nitrik oksit sentetaz inhibisyonu, proteaz inhibisyonu gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları, yapılan uluslararası çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Kurbağa ve semender deri salgılarının gösterdiği bu potansiyel nedeniyle ilaç geliştirme çalışmalarının doğal kaynaklarından biri olabileceği düşüncesi ile bu alanda yapılan bilimsel çalışmaların son zamanlarda hızlandığı ve günden güne artmaya başladığı görülmüştür.

Çalışmanın temel amacı Kırmızı Kurbağa (*Bombina bombina*), Ağaç Kurbağası (*Hyla orientalis*), Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*), Levanten Ova Kurbağası (*Pelophylax bedriagae*), Anadolu Kurbağası (*P. caralitanus*), Fazıla'nın Likya Semenderi (*Lyciasalamandra fazilae*), Marmaris Kara Semenderi (*L. flavimembris*), Pürtüklü Semender (*Triturus ivanbureschi*), Anadolu Benekli Semenderi (*Neurergus strauchii strauchii*) ve Baran'ın Anadolu Benekli Semenderi (*N. s. barani*) türlerine ait salgılarının biyoaktivitelerinin belirlenmesidir. Bu kapsamda, bireysel farklılıkları standardize etmek amacıyla aynı türün farklı bireylerinden çok küçük elektriksel uyarı verilerek toplanan deri salgısı örnekleri örnekleme havuzunda bir araya getirilmiş ve denemelerde kullanılmak üzere liyofilize edilmiştir. Farklı türlerden alınan salgı örnekleri için total protein miktarı, SDS-PAGE protein profili, antimikrobiyal aktivite [*Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* 0157:H7 (RSKK234), *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* DSM 13590, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10239 ve *C. tropicalis* RSKK 2412] [minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) yöntemi] ve sağlıklı (HEK-293) ve kanserli hücre hatları (PC-3, CaCo-2, MDA-MB-231, HeLa, A549, U87MG, MPanc-96) üzerindeki sitotoksik (MTT yöntemi) etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, kurbağa/semender salgılarının hemolitik etkileri de tavşan kırmızı kan hücreleri (eritrositler) üzerinde test edilmiştir.

Bu çalışma ile Türkiye'de yayılış gösteren Edirne'den Kırmızı Kurbağa (*Bombina bombina*), Rize-Artvin sınırından Ağaç Kurbağası (*Hyla orientalis*), Antalya'dan Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*), İzmir'den Levanten Ova Kurbağası (*Pelophylax bedriagae*), Antalya-Muğla sınırından endemik Anadolu Kurbağası (*P. caralitanus*), Muğla'dan endemik Fazıla'nın Likya Semenderi (*Lyciasalamandra fazilae*), Muğla'dan endemik Marmaris Kara Semenderi (*L. flavimembris*), Edirne'den Pürtüklü Semender (*Triturus ivanbureschi*), Bingöl'den endemik Anadolu Benekli Semenderi (*Neurergus strauchii strauchii*) ve Malatya'dan endemik Baran'ın Anadolu Benekli Semenderi (*N. s. barani*)'ye ait deri salgılarının temel biyolojik aktiviteleri ve protein profilleri ortaya koyulmuş, gelecek ileri düzey çalışmalar için altyapı hazırlanmış ve bu deri salgılarının terapötik potansiyelleri belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Türkiye’de Dağılışı Gösteren Kurbağalar ve Genel Dağılışı Alanları

Türkiye’de dağılışı gösteren kurbağa türleri iki *Ordo* (takım) olarak ayrılabilir. Bunlardan ilki *Anura* (Kuyruksuz kurbağalar), diğeri ise *Urodela* (Kuyruklu kurbağalar-Semenderler) olarak adlandırılır. Güncel taksonomik verilere göre Türkiye’de dağılışı gösteren 33 kurbağa türü bulunmaktadır (Çizelge 2.1.1). Bunların 15’i kuyruklu kurbağa, 18’i de kuyruksuz kurbağa türleridir. Aralarında tamamen sucul (akuatik) ya da yarı-sucul (semi-akuatik) türlerin bulunmasının yanı sıra tamamı karasal yaşama uyum sağlamış olan (*terrestrial*) türler de bulunmaktadır (Budak ve Göçmen, 2014; Veith et al., 2016; www.turkherptil.org, 2017).

Çizelge 2.1.1. Türkiye’de dağılışı gösteren kurbağa türleri ve dağılışı alanları

Cins	Tür	Türkçe	Dağılışı Alanları
URODELA (TAKIM)			
Salamandridae (Familya)			
<i>Salamandra</i>	<i>infraimmaculata</i>	Lekeli Semender, Türk Semenderi	Geniş (Doğu Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi)
<i>Lyciasalamandra</i>	<i>antalyana</i>	Antalya Semenderi	Antalya ve Burdur
<i>Lyciasalamandra</i>	<i>atifi</i>	Atıf’ın Semenderi, Alanya Semenderi	Antalya
<i>Lyciasalamandra</i>	<i>billae</i>	Bille’nin Kara Semenderi, Beldibi Semenderi	Antalya
<i>Lyciasalamandra</i>	<i>fazilae</i>	Fazıla’nın (Gökçeovacık) Kara Semenderi	Muğla
<i>Lyciasalamandra</i>	<i>flavimembris</i>	Marmaris Semenderi	Muğla
<i>Lyciasalamandra</i>	<i>luschani</i>	Kara Semenderi, Luschan’ın Likya Semenderi	Antalya ve Muğla

<i>Mertensiella</i>	<i>caucasica</i>	Kafkas Semenderi	Geniş (Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi)
<i>Neurergus</i>	<i>crocatus</i>	Urmiye Semenderi, Hakkari Benekli Semenderi	Hakkari, Şırnak ve civarı
<i>Neurergus</i>	<i>strauchii</i>	Benekli Semender	Doğu Anadolu Bölgesi (Malatya, Bingöl, Bitlis civarı)
<i>Lissotriton</i>	<i>vulgaris</i>	Küçük Semender	Geniş (Marmara ve Ege Bölgesi)
<i>Ommatotriton</i>	<i>ophryticus</i>	Kuzey Şeritli Semenderi	Geniş (Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi)
<i>Ommatotriton</i>	<i>vittatus</i>	Şeritli semender	Doğu Akdeniz (Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay civarı)
<i>Triturus</i>	<i>ivanbureschi</i>	Pürtüklü Semender	Geniş (Marmara ve Ege Bölgesi)
<i>Triturus</i>	<i>anatolicus</i>	Anadolu semenderi	Geniş (Kuzey Anadolu)
ANURA (TAKIM)			
Bombinatoridae (Familya)			
<i>Bombina</i>	<i>bombina</i>	Kırmızılı Kurbağa	Marmara Bölgesi (Trakya ve Sakarya civarı)
<i>Bombina</i>	<i>variegata</i>	Sarı Karınlı Kurbağa	Edirne
Pelobatidae (Familya)			
<i>Pelobates</i>	<i>syriacus</i>	Toprak Kurbağası	Türkiye Geneli fakat lokal
Pelodytidae (Familya)			
<i>Pelodytes</i>	<i>causicus</i>	Kafkas Kurbağası	Geniş (Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi)
Ranidae (Familya)			
<i>Rana</i>	<i>camerani</i>	Şeritli Kurbağa	Geniş (İç Anadolu, Doğu Karadeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi)
<i>Rana</i>	<i>dalmatina</i>	Çevik Kurbağa	Geniş (Marmara ve Karadeniz Bölgesi)
<i>Rana</i>	<i>holtzi</i>	Toros Kurbağası	Bolkar Dağları

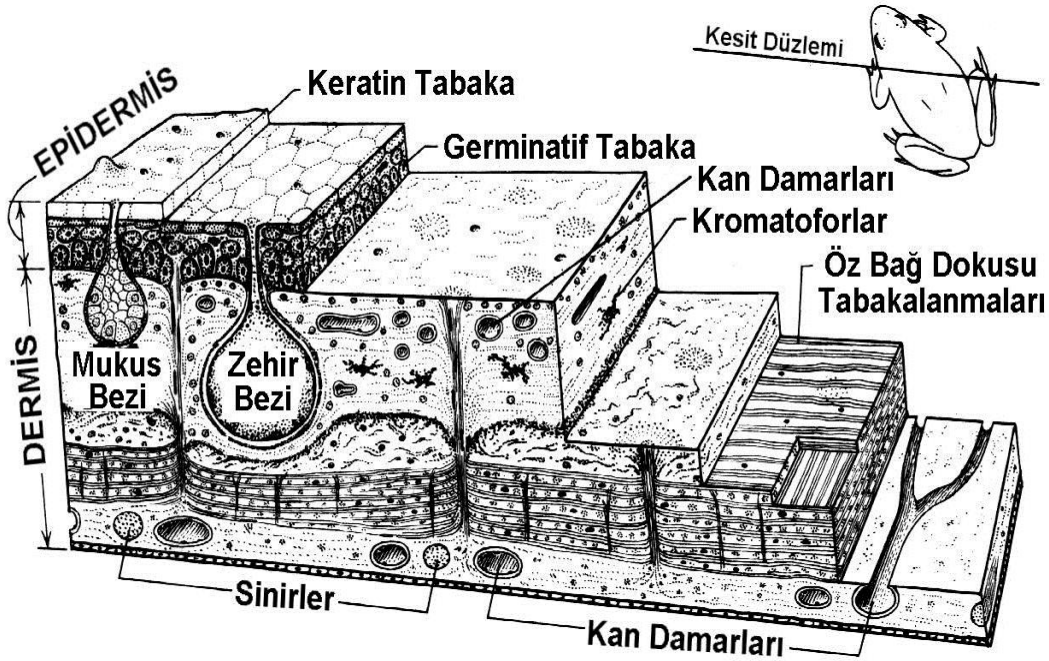
<i>Rana</i>	<i>macrocnemis</i>	Uludağ Kurbağası	Türkiye Geneli (Güneydoğu Anadolu hariç)
<i>Rana</i>	<i>tavasensis</i>	Tavas Kurbağası	Denizli ve çevre iller
<i>Pelophylax</i>	<i>bedriagae</i>	Levanten Ova Kurbağası, Levant Bataklık Kurbağası	Geniş (Ege ve Akdeniz Bölgesi)
<i>Pelophylax</i>	<i>caralitanus</i>	Anadolu Kurbağası, Beyşehir Kurbağası	Denizli, Isparta, Konya, Burdur, Antalya civarı
<i>Pelophylax</i>	<i>ridibundus</i>	Ova Kurbağası, Bataklık Kurbağası	Geniş (Ege ve Akdeniz Bölgesi hariç tüm bölgeler)
Bufonidae (Familya)			
<i>Bufo</i>	<i>bufo</i>	Siğilli Kurbağa	Geniş (Marmara, Ege, İç Anadolu ve Akdeniz Bölgesi)
<i>Bufo</i>	<i>verrucosissimus</i>	Kafkas Siğilli Kurbağası	Doğu Karadeniz (Trabzon, Rize, Artvin civarı)
<i>Bufo</i>	<i>variabilis</i>	Değişken Desenli Gece Kurbağası	Trakya hariç Türkiye Geneli
<i>Bufo</i>	<i>viridis</i>	Gece Kurbağası	Trakya
Hylidae (Familya)			
<i>Hyla</i>	<i>orientalis</i>	Oriental Ağaç Kurbağası, Ağaç Kurbağası	Geniş (Marmara, Ege, Karadeniz, İç Anadolu ve Akdeniz Bölgesi)
<i>Hyla</i>	<i>savignyi</i>	Levanten Ağaç Kurbağası, Yeşil Kurbağa	Geniş (Doğu Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesi)

2.2. Kurbağa Deri ve Salgılarının Genel Özellikleri

Deri (Şekil 2.2.1); morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ve fizyolojik işlevleri ile amfibilerin hayatta kalabilmesi için anahtar rol oynayan organdır.

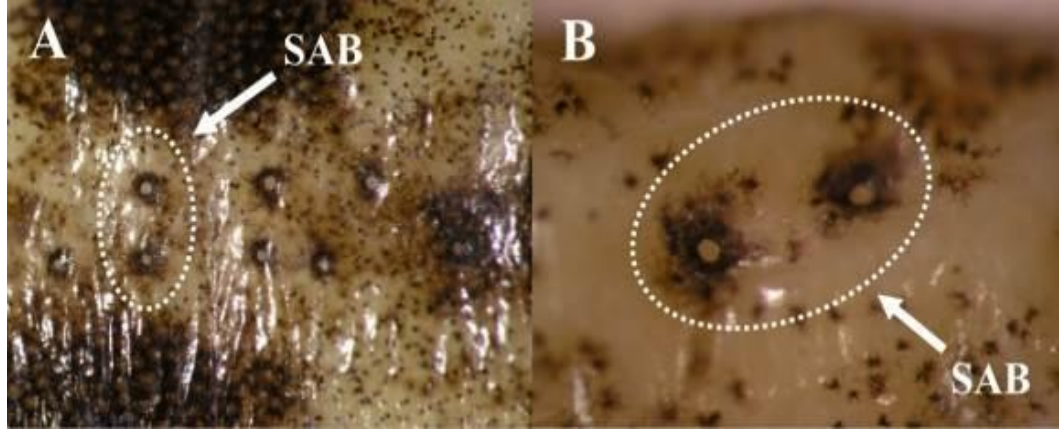
Üstlendiği solunum, terleme, sıvı dengesinin kontrolü, antipredatör, antimikrobiyal ve antifungal etkilerin düzenlenmesi işlevlerinin yanında vücut ısısının kontrolü ve üremede de büyük önem taşıyan bir organdır (Clarke, 1997).

Amfibi derisi iki temel bez içermektedir. Bunlar mukoz bezler ve seroz ya da granular bezlerdir. Mukoz bezler mukus adı verilen salgı ile deriyi sürekli olarak ıslak ve kaygan tutarak, amfibi deri solunumunun gerçekleşmesinden sorumludur. Bu işlevi, oksijenin mukus içerisinde çözünmesi ile gerçekleştirir. Seroz ya da granular bezlerin ise süt benzeri yapışkan bir salgısı bulunmaktadır ve içeriği tüm amfibi türlerinde farklıdır. Bazıları öldürücü seviyede toksik bir içeriğe sahipken, bazıları ise yalnızca biyoaktif moleküller içermektedir. Bezler basınç, stres veya uyarı gibi durumlar sonucunda aktif hale gelmektedir (Budak ve Göçmen, 2014). Bu salgılar bazı türlerde iyi gelişmiş olan paratoid bezlerin içerisinde olabileceği gibi vücut yüzeyinde düzenli veya dağınık hatta kuyruktaki salgı adenoid bezlerin içerisinde dahi bulunabilmektedir (Şekil 2.2.2) (Karış et al., 2015).



Şekil 2.2.1. Kurbağa derisinin yapısı ve tabakalanmaları (Budak ve Göçmen, 2014).

Amfibi deri salgılarının biyolojik olarak aktif olan içeriği türden türe farklı olmakla birlikte, özellikle peptidler/proteinler, steroidler, biyojenik aminler ve alkaloidler gibi moleküller açısından oldukça zengindir (Clarke, 1997; Sciani et al., 2013).



Şekil 2.2.2. Likya semenderlerinde salgı açıklıklarının (SAB) genel görünüşü. A- sırtta, çift sıra; B- kuyruk üzerinde, tek sıra (Karış et al., 2015).

2.3. Antimikrobiyal Peptidler

Antimikrobiyal peptidler (AMP) konağı patojenik mikroplardan korumak amacıyla çok hücreli organizmalar tarafından üretilen endojenik polipeptidlerdir. AMP'ler aynı zamanda kalıtsal immün sistemi oluşturmadaki önemli rollerinden dolayı konak savunma peptidleri olarak tanımlanabilirler. AMP'ler genel olarak 10-50 aminoasit içerikli, pozitif yüklü ve amfipatik (hem hidrofilik hem de hidrofobik yüzeylere sahip) özelliktedirler. Genelde, AMP'ler bir tarafı pozitif yüklü (lysine ve arginin kalıntılarından dolayı) ve diğer tarafı kayda değer oranda hidrofobik kalıntılar içermektedir (Schwarz, 2012; Seo et al., 2012).

Uzun yıllar önce kurbağalardan izole edilen antimikrobiyal peptidler, yüzlerce yıl ne olduğu bilinmeden tedavi amaçlı kullanılmıştır. Çin'de geleneksel tıp uygulamalarında akrep, kırkayak ve örümceklerden elde edilen çeşitli özütler yüzyıllardır kullanılmaktadır. Bu canlıların zehirleriyle ilgili bilimsel çalışmalar son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Antimikrobiyal peptidlerin en önemlileri; bombinin, mellitin, sekropin, magainin, nisin, peksiganan (MSI-78) ve insanlardan elde edilen defensin, kathelisinidin (HCAP-18/LL-37) ve histatinler'dir (Xu and Lai, 2015; Cardoso et al., 2014; Gomes et al., 2007).

Bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanması araştırmacıları etkili yeni tedavi ajanları aramaya itmiştir. Bunun üzerine son yıllarda antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidler ve bunları üreten canlılar üzerine araştırmalar yoğunlaştırılmıştır. İlk antimikrobiyal peptid, bir güve türü olan *Hyalophora*

cecropia'dan izole edilmiş ve sekropinler olarak tanımlamıştır (Steiner et al., 1981). Daha sonra farklı çalışmalar sonucunda antimikrobiyal aktiviteye sahip bu tür peptidler bakterilerden, farklı böcek takımlarından, kırkayaklardan, örümceklerden, akreplerden, çeşitli kabuklu hayvanlardan, amfibilerden, memelilerden insanlara kadar çok çeşitli doğal kaynaklardan elde edilmiştir (Vizioli and Salzet, 2002).

Sekropinlerin keşfinden sonra 100'den fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip peptid elde edilmiştir. Bu peptidlerin yapısal farklılıkları göz önünde tutularak dört esas gruba ayrılmıştır: 1) Sekropinler, gram (+) ve gram (-) bakteriler üzerinde etkili linear heliks şeklinde peptidlerdir. 2) Defensinler, gram (+)'ler üzerine etkili peptidlerdir. Bu peptidler 6 sistein ve moleküller arasında 3 disülfid köprüsü bulunduran β -tabaka yapısındadır. 3) Prolin ve arjinince zengin küçük peptidler, özellikle gram (-) bakterilere etkilidir. Apidaesinler, abaesinler bu grupta yer almaktadır. 4) Diğer antimikrobiyal peptidler, çoğunluğu glisince zengin, disülfid köprülerine sahip peptidleri içermektedir. Bu peptidlerin çoğu gram (-) bakterilere etkilidir. Attasinler, sarkotoksin, dipterisinler, koleopterisinler bu gruba örnektir (Yiğit, 2003; Bulet et al., 1997; Lehrer et al., 1991)

Çeşitli hayvan gruplarından elde edilen antimikrobiyal aktiviteye sahip peptidler pozitif yüklü ve küçük yapıları olması ve de amfipatik yapıları oluşturma kabiliyeti gibi ortak özellikleri vardır. Bu peptidler ya bakteriyel enfeksiyonu takiben uyarılarak bağışıklık sisteminin ilk savunması olarak (defensinler), ya da bir kurbağa türü olan *Xenopus leavis*'in deri yüzeyinde olduğu gibi sürekli olarak (magaininler) sentezlenirler (Lehrer and Ganz, 1999; Salzet, 2002; Bulet et al., 1993).

AMP'ler çeşitli mikroorganizmalara karşı geniş antimikrobiyal aktivite spektrumu göstermektedirler. Birçok AMP çoklu ilaç dirençli bakterilere karşı etkilidir ve direnç oluşturmak için düşük eğilime sahiptirler. Antibiyotiğe olan bakteriyel direnç, hedef hücreden ilacın çıkışı, hedef proteinin ilaç bağlanma bölgesinin modifikasyonu, ilaç hedefli etkileşimlerin inhibisyonunu içeren çeşitli yollarla kazanılabilir. Mikroorganizmalar kendi kompleks sistemlerini kullanarak çevresel değişikliklere karşı genetik kalıbını değiştirebilir. Örneğin, bakteriler AMP varlığında gen ifadesini modifiye edebilir. AMP'ler direncin oluşmasında

düşük eğilime sahiptirler. Birçok AMP, direkt olarak patojenin membranına etki etmektedir. AMP'lerin katyonik özellikleri, membran yüzeyinde AMP'lerin birikimiyle sonuçlanan, mikrobiyal membranın negatif yüklü yüzeyi ile seçici etkileşimini içermektedir. Hidrofobik kısım membranın hidrofobik komponenti ile etkileşiminden sorumludur (Seo et al., 2012).

Antimikrobiyal peptidlerin, birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere, funguslara, HIV, Herpes Simplex, Influenza gibi bazı zarflı virüslere ve ökaryot hücreli parazitler gibi canlılara karşı aktiviteleri mevcuttur. Bununla birlikte monositler, polimorfonükleer lökositler ve T hücreleri için kemotaktik etkilere, antiendotoksik, antitümör, immüno-modülatör, hemolitik, mitojenik, kontraseptif vb. aktivitelere de sahiptirler (Kamysz et al., 2003).

AMP'ler çeşitli molekül yapılarına sahiptir olup bu yapılardaki aminoasit kompozisyonlarına göre alt gruplara ayrılırlar (Brodgen, 2005).

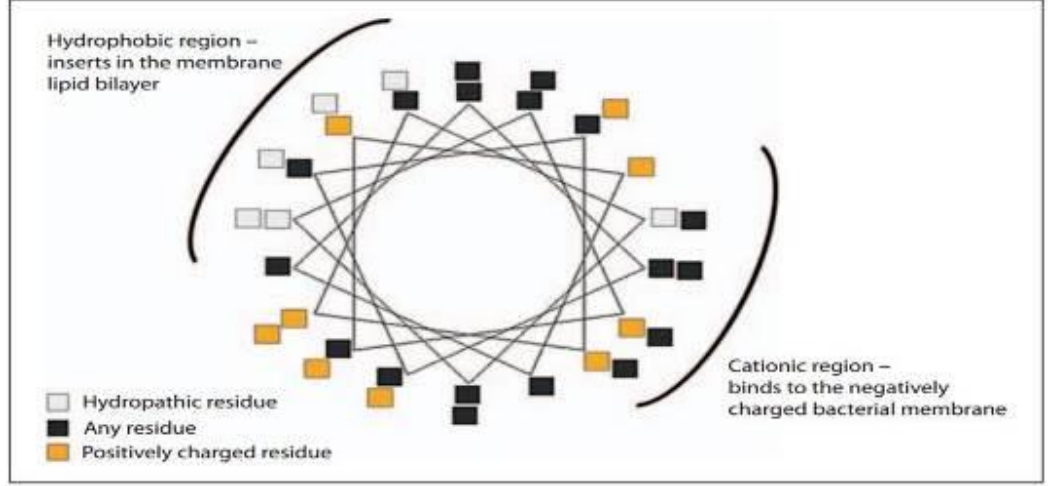
2.3.1. Anyonik antimikrobiyal peptidler

İnsan, sığır ve koyun akciğerlerinde, bronkoalveoler lavaj sıvılarında, solunum yolu epitel hücrelerinde bulunurlar (Brodgen, 2005; Williams et al., 2002). 1992 yılında koyun akciğerinde bulunan yüzey proteinlerinin *Mannhemia haemolytica*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* etkenlerini öldürdüğü bildirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite 3 küçük anyonik peptidten (H-GDDDDDD-OH, H-DDDDDD-OH ve H-GADDDDD-OH) kaynaklanmaktadır. (Brodgen et al., 2003; Williams et al., 2002). Bu peptidler maksimum aktivite için çinkoya ihtiyaç duyarlar ve onunla kompleks oluştururlar. Bu nedenle, çinkonun katyonik bir tuz köprüsü oluşturduğu ve bu oluşan tuz köprüsünün, peptidlere mikrobiyal alan üzerinde net negatif yükü gidermeye izin verdiği belirtilmektedir. Peptid böylelikle dış membrana herhangi bir morfolojik değişiklik yapmaksızın penetre olur. Bir kere sitoplazmaya girdikten sonra, anyonik peptidler ribozomlara saldırır ve ribonükleaz aktivitesini inhibe eder. Sonuç olarak, sitoplazmik protein çökeler ve uzaklaşır (Brodgen et al., 2003).

2.3.2. Katyonik antimikrobiyal peptidler

Günümüzde antibiyotiklere karşı gelişen yüksek direnç oranları, araştırmacıları yeni antimikrobiyal etkili kaynakların arayışına yöneltmiştir. Bunların arasında en fazla öne çıkan grup, canlıların çevrelerini kuşatan mikroorganizmalara karşı savunmalarında doğal bağışıklığın önemli unsurlarından olan antimikrobiyal etkili katyonik peptidlerdir (Hancock, 2001). Antimikrobiyal etkili katyonik peptidler, canlıların çevrede bulunan mikroorganizmalarla meydana gelebilecek infeksiyonlarına karşı en etkili silahlarındandır ve doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Böcekler, mikroorganizmalar, amfibiler, sürüngenler, kuşlar, bitkiler, memeli hayvanlar ve insanlar gibi her tür canlıdan izole edilebilmektedir ve günümüzde 600'den fazla sayıda doğal antimikrobiyal etkili katyonik peptid bilinmektedir.

Katyonik peptidler genel olarak pozitif yüklü, 50 aminoasitten daha az kalıntılar olarak tarif edilirler. Primer yapısı %50 oranında hidrofobik özellikte aminoasit içeren ve sahip oldukları bazik yapıdaki lizin ve arjinin aminoasitlerinin etkisiyle pozitif yüklü bir yapıdır. Bu pozitif yük genellikle +2 değerindedir. İçerdikleri disülfid bağlarının yardımıyla, kendi üzerlerine katlanarak üç boyutlu amfipatik yapılar oluşur. Bu yapılar hem polar pozitif yüklü aminoasitlerden oluşan bir hidrofilik kısım, hem de non-polar nötral aminoasit yan zincirlerini içeren bir hidrofobik kısımdan oluşmaktadır (Ganz and Lehrer, 1999). AMP'ler ikili ve üçlü disülfid bağlarıyla stabilize edilmiş β -sheet peptidler, amfipatik α -heliksler, yalnız tek disülfid köprüsünden oluşturulan halka oluşturan peptidler ve genişletilmiş yapıları içeren ikincil yapılarına bağlı olarak sınıflandırılırlar. Bunlardan en yaygını β -sheet ve α -helikal moleküllerdir (Baltzer and Brown, 2011; Bahar and Ren, 2013). İkincil yapıları farklı olmasına rağmen, hepsi genel bir üç yapıyı düzenleme gösterirler, çünkü katyonik AMP'ler yüklü ve hidrofobik bölümlerden ayrılmış hidrofilik bölümleri olan amfifilik moleküllere katlanırlar. Bu amfifilik organizasyon (Şekil 2.3.2.1) pozitif yüklü peptidler ile negatif yüklü bakteri membranı arasında güçlü bir etkileşime olanak sağlar. Ayrıca hidrofilik gruplar AMP'lerin bakterilerin membran lipitlerine olan penetrasyonunu kolaylaştırmaktadır (Baltzer and Brown, 2011).



Şekil 2.3.2.1. Antimikrobiyal peptidin α -helikal yapısı (Baltzer and Brown, 2011).

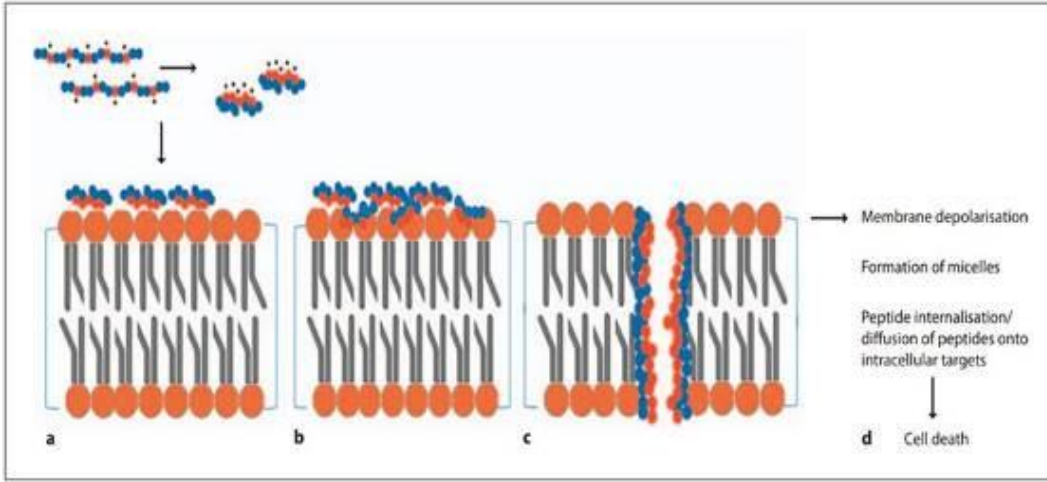
Katyonik antimikrobiyal peptidler etkilerini, mikroorganizmaların membranı ile etkileşerek göstermektedirler. Bu şekilde hücrenin dengesini bozarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Antimikrobik etkili katyonik peptidlerin pozitif yüklü ve hidrofobik olması bu maddelerin bakteri membranı ile etkileşime girmeleri için çok önemlidir. Gram (-) bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarit (LPS) tabakası ve Gram (+) bakterilerde bulunan ve asidik bir polisakkarit olan lipoteikoik asit, antimikrobiyal peptidlerin bağlanabilmesi için gerekli olan negatif yükü temin eder. Ayrıca bakterilerin fosfolipit yapısındaki iç membranının da negatif yüklü oluşu antimikrobiyal etkiyi kolaylaştırmaktadır (Hancock, 1997)

Memeli hücrelerin dış membranı, bakteriyel membrandan farklı olarak sfingomiyelin ve fosfatidilkolin gibi nötral fosfolipitlerden yapılmıştır. Bakteri dış membranı ise negatif yüklü fosfatidilgliserol ve kardiyolipinden oluşmaktadır. Ayrıca memeli hücrelerinde kolesterol bulunurken, bakterilerin dış membranında bulunmamaktadır. Bu farklılıklar, antimikrobik etkili peptidlerin insan hücreleri üzerine önemli bir toksik etkileri olmaksızın bakteriler üzerindeki seçici öldürücü etkilerini açıklamaktadır (Matsuzaki, 1999).

Katyonik antimikrobiyal peptidlerin etki tarzlarının özellikle onların yapısal özelliklerine bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu yapısal özellikler dizileri, boyutları, katyonik doğaları, hedef hücre ile etkileşimlerini kontrol eden hidrofobik ve amfipatik özellikleridir. Bu durum, çok hücreli organizma membran tasarımının farklılıklarından, bakteriyel membranın organizasyonu ve onların negatif yüklü

fosfolipit gruplarından kaynaklanmaktadır. Bu membran yapısı bakterileri, antimikrobiyal peptidlere savunmasız yapmaktadır (Baltzer and Brown, 2011; Bahar and Ren, 2013).

Diğer taraftan ökaryotik membranlar nötral fosfolipitler içerirler ve katyonik peptidlerin yıkımına daha az duyarlıdır. Antimikrobiyal etkiyi ya da AMP'ler ile bakteri membranı arasındaki ilişkiyi açıklamak için kullanılan model Shai-Matsuzaki Huang (SMH) modelidir (Şekil 2.3.2.2). Yapısal olmayan peptidlerin, bakteriyel membranı ile etkileşime giren üç boyutlu yapıyı benimsediği ve bakteriyel membranın anyonik lipit gruplarıyla direkt olarak etkileşime giren pozitif yüklü amfifilik molekülere katlandığı görülmüştür. Bu durumda lipitler peptidlerle yer değiştirir ve bakteriyel membrandan içeri girer. Bunu takiben, peptidler agregat oluşturup ve hedef hücrenin içinde peptid translokasyonuna olanak tanıyan bir kanal oluşturmaktadır (Baltzer and Brown, 2011).

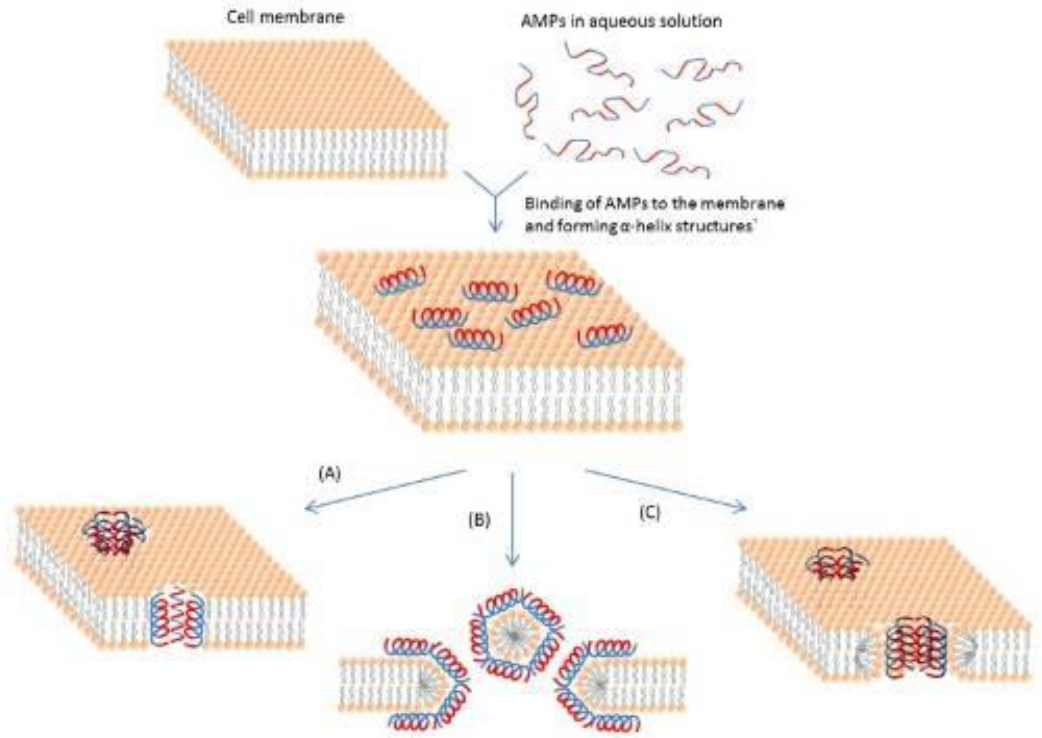


Şekil 2.3.2.2. Etki mekanizması için SMH (Shai-Matsuzaki Huang) modeli. (a) Peptid kümelenmesi, (b) Peptidlerin hücre membranı ile etkileşimi, (c) Lipitlerin yer değişmesi için indüklenmiş peptidler ve peptidin membran lipit tabakasını katılımı, (d) Hücre ölümü (Baltzer and Brown, 2011).

Bakterileri inhibe etmek için gerçekleşen asıl mikrobiyal aktivite, birçok yolla meydana gelen bakteriyel hücre membranının yıkımına dayanmaktadır. Depolarizasyon ve por oluşumu, hücresel içeriğin dışarı sızmasına, hücre duvarının ayrışmasına ve membran fonksiyonunun bozulmasına yol açan membran tabakasındaki lipit kompozisyonunun değişmesine neden olmaktadır. Ayrıca, katyonik antimikrobiyal peptidler intraselüler olarak görev yapabilir ve

bakteri duvarını ayrıştırabilen, hidrolize neden olan letal (ölümcül) prosesleri aktive edebilir, hücre ölümü ile sonuçlanan kritik hücre içi hedeflere zarar verebilirler (Baltzer and Brown, 2011; Bahar and Ren, 2013).

Katyonik antimikrobiyal peptidlerin, bakterinin dış membranından geçmesi, bunların öldürücü etkileri için gerekli ancak yeterli değildir. Bakteriler için asıl öldürücü olan katyonik peptidlerin negatif yüklü sitoplazma membranı ile elektrostatik olarak etkileşmesidir. Bu olay sırasında katyonik peptidlerin hidrofilik grupları ile membran fosfolipitlerinin hidrofobik zincirleri karşılıklı gelir. Peptidler membrana paralel bir şekilde konum alarak membranın bütünlüğünü bozan kanalların oluşmasına neden olurlar (Matsuzaki, 1999). Kanal oluşumu ve peptid penetrasyon süreci hala tam olarak bilinmemektedir. Bu olayı açıklamak için çok sayıda model membran çalışmaları yapılmıştır. Başlıcaları; carpet (halı) modeli, fiçi tahtası modeli ve toroidal por modelidir (Bahar and Ren, 2013).



Şekil 2.3.2.3. Antimikrobiyal peptid modelleri. (A) Fıçı tahtası modeli (B) Carpet modeli (C) Toroidal por modeli (Bahar and Ren, 2013).

2.4. Kurbağa Deri Salgılarının Biyoteknolojik Kullanımı ve Terapötik Potansiyeli

Kurbağa ve Semenderlerin deri salgıları antik çağlardan bu yana yerli toplumların kullandığı geleneksel ilaçlar arasındadır. Asya ve Uzak Doğu'da (özellikle Çin'de) yaraların tedavisinde, kalp ağrısı, diş ağrısı sinüzit ve hemoraji gibi sistemik hastalıklarda kullanılmış ve hala kullanılmaktadır. Yerel halkın bazen doğru olmasa bile deneyimlerine dayanarak farklı amaçlarla kullandıkları bu salgılar, günümüzde bu alanda yapılan ve yapılacak olan modern biyolojik araştırmaların temelini oluşturmaktadır (Graham et al., 2005; VanCompernelle et al., 2005).

Amfibilerin deri salgıları, antimikrobiyal peptidler için bir kaynak niteliğindedir. Son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalar sonucunda bu salgıların birçok farklı biyoaktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur. Yukarıda da söz edildiği üzere; antikanserojenik, antibakteriyal, antifungal, antiparazitik/antiprotozal, antidiyabetik, antiviral, yara iyileştirici, immünomodülatif, kardiyotonik ve antiaritmik, miyotropik, anjiyotensinojenik etkiler ile mast hücre degradasyonu, nitrik oksit sentetaz inhibisyonu, proteaz inhibisyonu gibi işlevler kurbağa/semender deri salgılarının biyolojik etkinliklerinden yalnızca bazılarıdır. Sözü geçen etkiler bu salgıların ne denli geniş bir biyoaktif kaynak olduğunun göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Amfibi deri salgılarından yaygın olarak antimikrobiyal peptidler ve sitotoksik ekiye sahip peptidlerin izole edildiği literatürlerde ortaya konmuştur (Siano et al., 2014; Brand et al., 2013; Gomes et al., 2010; Pukala et al., 2006).

Bu alanda yapılan bazı çalışmalar sonucunda bazı türlerin deri salgılarındaki belli başlı peptid aileleri ve bunlara dahil peptidler tanımlanmıştır. Tanımlanan bu peptidler arasında, biyolojik aktiviteleri uzantısında geniş bir ticari kullanım potansiyeli olan peptidlerin yanı sıra, kanıtlanmış aktiviteleriyle hali hazırda piyasada kullanılmakta olanlar da bulunmaktadır. Yüksek antimikrobiyal ve sitotoksik etki gösteren, bunun yanında terapötik potansiyeli olan tanımlanmış bazı steroid, alkaloid ve protein/peptidlerden; amolopinler, esculentinler, bufalinler, cinobufaginler, marinosinler, magaininler, bombesinler, dermaseptinler, bombininler, adenoregulinler, maximinler, brevininler,

ranalexinler, temporinler, ranateurinler, gaegurinler, rugosinler, tigerininler, nigrosinler, kassinaturin, leptoglycinler, japonisinler, ranasiklinler, grahaminler, frenatinler, caerinler, maculatinler, citropinler, fallaxinler, phylloseptinler, dermorfinler, epibatidinler, caeruleinler, palustrinler, parkerinler, jingdonginler, medusinler, limnonectinler, hylaraninler gibi peptidler amfibi deri salgılarında bulunan ve tanımlanan moleküllerin yalnızca az bir kısmını teşkil etmektedir (Xu and Lai, 2015; Cardoso et al., 2014; Gomes et al., 2007; Pukala et al., 2006).

Magainin, kurbağalardan elde edilen biyoaktif moleküller arasında en iyi bilinenidir. 1987 yılında *Xenopus laevis*'in derisinden izole edilmiş ve geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Zasloff, 1987; Hoskin and Ramamoorthy, 2008). Magaininlerin önemi, etki mekanizmalarının klasik antibiyotiklerden farklı olması uzantısında mikroorganizmaların bu moleküle direnç gösterememelerinden kaynaklanır. Magaininler bakteri zarında porlar açarak bakterilerin ölmesine neden olmaktadır. Peksiganan (MSI-78), magainin sınıfı peptidin sentetik analogudur. Magainin türevi olan MSI-78 ile faz III klinik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 926 polimikrobik diyabetik ayak ülseri hastası üzerinde topikal olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak, tedavinin oral ofloksasin ile eşdeğer olduğu belirlenmiş ve MSI-78'in ofloksasin'e göre çok daha az yan etki gösterdiği saptanmıştır. Magaininler ticari adı ile *Locilex* (topikal pomat) olarak piyasaya sürülmüştür (Zasloff, 1987; Hoskin and Ramamoorthy, 2008; Tempone et al., 2007).

Ayrıca, Güney Amerika'da yaşayan ağaç kurbağalarından olan *Phyllomedusa sauvagii* türünün deri salgılarından *Dermaseptin* adı verilen antimikrobiyal peptidler tanımlanmıştır (Mor et al., 1991). *Dermaseptin* peptidleri ise cilt koruyucu pomat olarak ticari *DermaSeptin* (pomat) adı ile piyasada bulunmaktadır. Magainin ve *Dermaseptin* peptidlerinin her ikisi de ortak özelliği, her ikisinin de suda çözünebilir olması ve hemolitik etkilerinin bulunmamasıdır.

Epipedobates antonhyi (= *Epipedobates tricolor*) deri salgısından izole edilen ve toksik bir alkaloid olan *Epibatidine* ağrı kesici (analjezik) olarak Faz-II çalışmalarına kadar ilerlemiş fakat bazı gastrointestinal yan etkileri bulunduğu için Faz-II çalışmalarından dönmüştür. Etkisi morfinin 200 katı kadardır (Spande et al., 1992).

Çin’de *Venenum Bufonis* olarak bilinen Chan’su, *Bufo gargarizans* ve *Bufo melanostictus* türlerinin liyofilize deri-parotoid salgısıdır ve yaygın olarak kanser, ağrı, yara iyileştirme, ödem giderme tedavilerinde ve afrodisyak etki amaçlı kullanılmaktadır.

2.5. Kurbağa Deri Salgılarının Antimikrobiyal, Sitotoksik ve Hemolitik Etkileri

Farklı kurbağa/semender türlerinin deri salgıları veya bu salgılardan elde edilen protein/peptid, alkaloid, steroid vb. moleküller ile gerçekleştirilen birçok biyoaktivite temelli araştırma mevcuttur. Önce ülkemizde ve ardından uluslararası alanda yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Türkiye’de bu alanda ilk çalışma Çevikbaş (1978) tarafından yapılmıştır. Araştırmacı çalışmasında o dönemdeki taksonomik adı *Rana ridibunda* (şu an *Pelophylax ridibundus*) olan kurbağaların deri salgılarını çeşitli mikroorganizmalar üzerinde test etmiş ve salgı materyalinin antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olduğunu bildirmiştir.

Dülger et al. (2004) yaptıkları çalışmada o dönemdeki taksonomik adı *Bufo viridis* (şu an *Bufotes variabilis*) olan kurbağaların deri salgılarının *E. coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *K. pneumoniae* UC57, *S. typhi* ATCC 19430, *S. aureus* ATCC 6538P, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Rhodotorula rubra* ve *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini incelemişler ve salgının adı geçen mikroorgaizmaların tamamını az veya çok inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Dülger et al. (2007) benzer bir çalışmayı o dönemdeki taksonomik adıyla *Hyla arborea* (şu an *Hyla orientalis*)’nın deri salgısı ile gerçekleştirmişlerdir. Salgı materyalini *E. coli* ATCC 11230, *S. aureus* 6538-P, *K. pneumoniae* UC57, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *B. cereus* ATCC 7064, *M. smegmatis* CCM 2067, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *Micrococcus luteus* CCM 169, *Candida albicans* ATCC 10231, *R. rubra* DSM 70403 ve *Kluyveromyces fragilis* ATCC 8608 mikroorganizmaları üzerine

uygulamışlar ve yüksek antibakteriyel etki görülmesine karşın antifungal etki gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Afsar et al. (2011) *Rana macrocnemis* deri salgısının antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. *E. coli* ATCC 39628, *S. aureus* ATCC 6538P, *P. vulgaris* ATCC 8427, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* CM 99, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Sarcina lutea* ATCC 9341NA, *S. typhimurium* CCM 5445 ve *C. albicans* ATCC 10231 mikroorganizmaları üzerinde çalışılan salgıların, mayalara karşı bakterilere göre daha etkin olduğunu gözlemlemişlerdir.

Ülkemizde son olarak tarafımızdan gerçekleştirilen çalışma ile *Bufo bufo*, *Bufo verrucosissimus* ve *Bufo variabilis* türlerinin deri/parotoid bez salgılarının yüksek antimikrobiyal (MIC: 3.9-250 µg/ml) ve sitotoksik (<0.1-6.02 µg/ml) etkiler gösterdiği, hemolitik aktivitelerinin ise 50 µg/ml konsantrasyonda dahi bulunmadığı belirlenmiştir (Nalbantsoy et al., 2016).

Uluslararası alanda gerçekleştirilen bazı çalışmalar kronolojik olarak aşağıda özetlenmiştir.

Zasloff (1987) *Xenopus laevis* türünün derisinden izole ettiği ve Magaininler adını verdiği peptidlerin *E. coli* (D31), *K. pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, *S. epidermidis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *P. mirabilis*, *Streptococcus fecalis* üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini ortaya koymuştur. Uygulama yapılan mikroorganizmaların tamamında az veya çok inhibisyon saptanmıştır.

Nelson et al. (1991) bombesin peptidinin farklı meme kanser hücre hatları üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. ZR-75-1, T47D, MDA-MB-436 ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarına uygulanan bombesinin insan meme kanser hücre hatlarının proliferasyonunu stimüle ettiği sonucuna varılmıştır.

Mor and Nicolas (1994) *Phyllomedusa sauvagii* türünün deri salgısından elde edilen dermaseptin peptidlerinin *Microsporum canis* (IP 11 94) *Tricophyton rubrum* (IP 1400-82) *Arthroderma simii* (IP 1063-74) *Aspergillus fumigatus* (IP 1025-70) *Aeromonas caviae* (IP 67-16 T) *E. coli* (IP 76-24) *Nocardia brasiliensis* (IP 16-80) *Cryptococcus neoformans* (IP 962-67) *C. albicans* (IP 884-65)

mikroorganizmalarının tamamı üzerinde inhibisyona neden olduğunu bildirmişlerdir.

Simmaco et al. (1994) *Rana esculenta*'nın deri salgısından izole edilen peptidlerin çeşitli mikroorganizmalar üzerine seçici olarak aktivite gösterdiklerini ve aynı türün salgısı içerisinde izole edilen iki farklı peptidten birinin hemolitik olup ötekinin ise hemolitik etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

Simmaco et al. (1996) tarafından *Rana temporaria*'nın deri salgısından izole edilen temporin peptidlerinin antibakteriyal aktiviteleri *Bacillus megaterium* BM11, *S. aureus* Cowan1, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *P. aeruginosa* ATCC 15692, *E. coli* D21, *E. coli* D21e7, *E. coli* D21f1, *E. coli* D21f2 ve *E. coli* D22 üzerinde, antifungal aktiviteleri ise *C. albicans* ATCC 10261 üzerinde gösterilmiştir. Temporinlerin yüksek hemolitik aktivitesi olduğu da ayrıca belirtilmiştir.

Schwartz et al. (1998) *Siphonops paulensis*'in deri salgısının hemolitik aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada deri salgısının tavşan, fare, yılan, insan, inek, koyun, kurbağa kanlarına olan etkileri incelenmiş ve salgının adı geçen tüm canlı gruplarının eritrositleri üzerinde hemolitik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Steinborner et al. (1998) *Litoria chloris*'in deri salgısından izole edilen caerin1 peptidinin *Litoria* cinsinin diğer türlerinin deri salgılarından elde edilen caerin1 peptidleri ile aktivite açısından karşılaştırılmasını amaçlamışlardır. Antibiyotik aktivite için seçilen organizmalar *B. cereus*, *E. coli*, *Leuconostoc lactis*, *L. innocua*, *M. luteus*, *P. multocida*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. uberis* olup caerin1 peptidleri bu organizmaların tamamında inhibe edici etkinlik göstermiştir.

Basir et al. (2000) *Rana palustris* türünün deri salgısından izole ettikleri brevinin, esculentin, ranatuerin, palustrin ve temporin isimli peptidleri Gram (+) *S. aureus*, Gram (-) *E. coli* ve maya *C. albicans* üzerinde denemişlerdir. Temporin dışında tamamının *E. coli* üzerinde etkili olduğu, temporin, brevinin ve esculentin'in *S. aureus* üzerinde, brevinin'in ayrıca *C. albicans* üzerinde etkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Fredericks and Dankert (2000) karasal semender *Plethodon cinereus*'un deri salgılarını Gram (-) *E. coli* ve Gram (+) *S. aureus* üzerine uygulamışlar. Salgı *S. aureus* üzerine etkin olurken *E. coli* de inhibisyon gözlenmemiştir. Gine domuzu kırmızı kan hücrelerinde ise düşük hemolitik etki meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Mangoni et al. (2000) *Rana temporaria* deri salgısından izole edilen temporin peptidlerinin *Enterobacter agglomerans* Bo-1, *Aeromonas hydrophila* Bo-3, Bo-4, *Acinetobacter junii* Bo-2, *K. pneumoniae* Rt-1, *P. vulgaris* Rt-3 ve *A. junii* Rt-4 mikroorganizmaları üzerine olan antimikrobiyal etkilerini incelenmiş ve salgıların adı geçen tüm mikroorganizmaları inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Rozek et al. (2000) *Litoria aurea* ve *L. raniformis* türlerinin deri salgılarından elde edilen aurein peptidlerinin antibiyotik ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Antibiyotik etki için seçilen ve tamamında inhibisyon görülen mikroorganizmalar: *B. cereus*, *E. coli*, *Leuconostoc lactis*, *L. innocua*, *M. luteus*, *Pasteurella multocida*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. uberis* olarak rapor edilmiştir. Sitotoksik etki için seçilen 60 farklı hücre hattından aktivite belirlenen hücre hatları ise; lösemi, akciğer, kolon, melanoma ovaryum, renal, prostat ve meme kanser hücre hatları olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak aurein peptidlerinin seçici sitotoksik ve yüksek seviyede antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konmuştur.

Lai et al. (2002) *Bombina maxima*'nın deri salgısından elde edilen maximin peptidlerinin antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerini araştırılmışlardır. Antimikrobiyal aktivite Gram (+) *S. aureus* (ATCC2592), *Bacillus megatherium*, Gram (-) *E. coli* (ATCC25922), *Bacillus pyocyaneus* (CMCCB10104), *B. dysenteriae*, *K. pneumoniae* funguslar *C. albicans* (ATCC2002), *Aspergillus flavus* (IFFI4015), ve *Penicillium uticale* (IFFI2001) üzerinde araştırılmış, *A. flavus* ve *P. uticale* dışındaki mikroorganizmaları inhibe ettikleri ortaya konmuştur. Çalışılan peptidlerin insan T hücre kanser hatları C8166, Molt-4 ve mesane kanser hücre hatları BIU-87, T24 üzerinde de sitotoksikite gösterdiği belirlenmiştir.

Tsuruda et al. (2002) tarafından *Cynops pyrrhogaster*'in deri salgısından elde edilen tetrodotoxin molekülünün erkek fareye intraperitoneal olarak

enjeksiyonu sonrasında meydana gelen toksisite incelenmiş, enjeksiyondan yarım saat sonra farenin öldüğü not edilmiştir.

Conlon et al. (2003) *Rana boylii* türünün deri salgısından izole ettikleri brevinin peptidinin *C. albicans* üzerinde önemli oranda antifungal etkisi olduğunu fakat kan hücrelerindeki hemolitik etkisinden dolayı sistemik kullanımının sınırlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Doyle et al. (2003) *Litoria citropa* türünün deri salgısından elde edilen citropin peptidini sentetik olarak elde edip çeşitli antimikrobiyal ve antikanser aktivite testlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu peptid ile lösemi, akciğer, kolon, melanoma, ovaryum, renal, prostat ve meme kanserli hücre hatlarında sitotoksik etki sağlanmıştır. Ayrıca mikroorganizmalardan *B. cereus*, *E. coli*, *Leuconostoc lactis*, *Listeria innocua*, *M. luteus*, *Pasteurella multocida*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *Streptococcus uberis* türlerini inhibe ettiği belirlenmiştir.

Nascimento et al. (2004) *Leptodactylus ocellatus*'un deri salgısından tanımlanan ocellatin peptidlerinin antimikrobiyal ve hemolitik etkilerini araştırmışlardır. *E. coli* üzerinde inhibitör aktivitesi gösteren ocellatinin kan hücrelerinde de hemolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Won et al. (2004) tarafından *Rana esculenta*'nın deri salgısından elde edilen brevinin ve esculentin peptidlerinin yüksek standart Gram (+), Gram (-) ve funguslara karşı inhibitor aktivite gösterdiği, insan eritrositleri üzerinde hemolitik aktivitelerinin düşük olduğu ortaya konmuştur.

Filho et al. (2005) *Bufo rubescens*'in deri salgısından izole ettikleri telocinobufagin ve marinobufagin moleküllerinin Gram (-) *E. coli* ve Gram (+) *S. aureus* üzerinde yüksek inhibisyona neden olduklarını saptamışlardır.

Chen et al. (2006) *Rana schmackeri*, *Rana versabilis* ve *Rana plancyi fukienensis* deri salgılarından izole ettikleri esculentin peptidlerinin Gram (+) *S. aureus* ve Gram (-) *E. coli* üzerindeki etkilerini incelemişler ve bakteri kolonilerinde önemli oranda inhibisyon gözlemişlerdir.

Conceição et al. (2006) *Phyllomedusa hypochondrialis* türünün deri salgısından izole ettikleri dermaseptin ve phylloseptin peptidlerini *S. aureus*, *E.*

coli, *M. luteus* ve *P. aeruginosa* mikroorganizmaları ve kan hücreleri üzerindeki etkilerini incelemişler ve salgının 6 μ M konsantrasyonda tüm organizmaların gelişimini inhibe ettiğini, kan hücreleri üzerinde de herhangi bir hemolitik etki yaratmadığını belirtmişlerdir.

Graham et al. (2006) *Rana sevos*a türünün deri salgısından izole ettikleri peptidleri Gram (+) *S. aureus* ve Gram (-) *E. coli* türlerine uygulamışlar ve her iki mikroorganizma türünde de inhibisyona neden olduğunu gözlemişlerdir.

Lu et al. (2006) *Amolops loloensis*'in deri salgısından izole edilen peptidlerin antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerini incelemişler ve *S. aureus*, *E. coli* ve *B. subtilis* ile fungus *C. albicans* üzerinde inhibisyona neden olduğunu rapor etmişlerdir. Temporinlerin hemolitik aktivitesi yok iken Brevininler %96'ya varan hemolitik aktivite göstermiştir. Ayrıca bu peptidlerin HepG2 solid tümör hücre hattı üzerine sitotoksik etkilerinin olduğu belirtilmiştir.

Zhou et al. (2006) tarafından *Hylarana guentheri* türünün deri salgısından izole edilen guentherin peptidinin standart antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Salgının seçilen mikroorganizma türleri içerisinde yalnızca *S. aureus* ve *B. subtilis* türlerine karşı seçici ve dar spektrumlu antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Conlon et al. (2007) *Hylomantis lemur* türünün deri salgısından elde ettikleri dermaseptin ve phylloseptin peptidlerin antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Dermaseptinin Gram (-) *E. coli* üzerinde aktif fakat Gram (+) *S. aureus* üzerinde inaktif olduğunu, amfibi patojeni bir fungus olan *Batrachochytrium dendrobatidis*'i de inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Phylloseptinin *S. aureus* üzerinde etkili olduğu fakat *E. coli* üzerinde etkisiz kaldığını, *Batrachochytrium dendrobatidis*'i de daha yüksek oranda inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca dermaseptin ve phylloseptinin HepG2 (İnsan hepatoma kanser hücreleri) hücre hattı üzerinde sitotoksik etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir.

Kim et al. (2007) *Rana dybowskii*'nin deri salgısından elde edilen antimikrobiyal peptidleri *M. luteus* (ATCC4698), *K. pneumoniae* (ATCC10031), *Shigella dysenteriae* (ATCC9752), *P. aeruginosa* (ATCC9027), *Proteus mirabilis*

(ATCC25933), *S. epidermidis* (ATCC12228), *B. subtilis* (ATCC6633), *E. coli* (KCTC2433), *S. aureus* (KCTC3881) ve *C. albicans* (ATCC36232) mikroorganizmaları üzerine uygulanmışlar ve tamamında az veya çok inhibisyon gözlemlemişlerdir. Bunun yanında salgının hemolitik etkisinin en yüksek konsantrasyonda dahi %50 ye varmadığını belirtmişlerdir.

Kückelhaus et al. (2007) tarafından *Phyllomedusa hypochondrialis* türünün deri salgısından izole edilen phylloseptin-1'in *in vivo* toksisitesi araştırılmıştır. Endovenöz uygulamadan sonra farenin iç organlarında herhangi bir toksisiteye rastlanmamıştır. Gram (+) ve Gram (-) bakterilere yüksek derecede toksik olan bu peptidin *in vivo* denemelerde farede herhangi bir toksik etki göstermemesi önemli bir sonuç olarak belirlenmiştir.

Li et al. (2007) *Odorrana grahami*'nin deri salgısından izole edilen peptidleri antimikrobiyal ve hemolitik açıdan incelemişlerdir. *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* üzerinde etkili olan peptidler herhangi bir hemolitik aktivite göstermediklerinden olumlu sonuçlar vermişlerdir.

Ghavami et al. (2008) *Rana ridibunda*'nın deri salgısından izole ettikleri Brevinin-2R defensinini Jurkat (insan T-hücre lösemisi), BJAB (murin B-hücre lenfoması), HT29/219 ve SW742 (kolon karsinomları), L929 (murin fibrosarkoma), MCF-7 (meme adenokarsinoma), A549 (akciğer karsinoma) hücre hatları üzerindeki etkilerini taramışlardır. Sonuç olarak Brevinin-2R en çok MCF-7, en az da BJAB üzerinde sitotoksik etkili olarak rapor edilirken diğer hücre hatlarında sitotoksik etki yaratmamıştır. Bu da Brevinin-2R'nin seçici sitotoksitesi olduğunun göstergesi olarak bildirilmiştir.

Wang et al. (2008) *Agalychnis callidryas*'ın deri salgısından izole ettikleri peptidlerin antimikrobiyal etkilerini incelemişler ve elde edilen peptidlerin Gram (+) *M. luteus*, Gram (-) *E. coli* ve fungus *C. albicans* üzerinde inhibitor aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Giri et al. (2009) *Bufo melanostictus*'un deri salgısından elde ettikleri antineoplastik faktör BM-ANF1'in curcumin ile birlikte sinerjistik etki ile kolon kanser hücre hattı HCT-116 üzerindeki sitotoksik etkilerini analiz etmişlerdir. Araştırmacılar bu iki molekülün bir arada kolon kanser hücre hattı HCT-116

üzerinde hücre çoğalmasını durdurduğu ve %50'nin üzerinde hücreyi apoptoza sürüklediği sonucuna varmışlardır.

Sousa et al. (2009) *Leptodactylus pentadactylus* türünün salgısından izole ettikleri ve Leptoglycinler olarak adlandırdıkları peptidlerin gram-negatif bakterileri inhibe ettiğini, fakat gram-pozitif bakteriler ve funguslara etkisi olmadığını ayrıca hemolitik etkisinde bulunmadığını saptamışlardır.

Yun et al. (2009) geleneksel adı ile Chan-Su *Venenum Bufonis* (*Bufo gargarizans*)'in deri salgılarının insan akciğer karsinoma A549 hücre hattı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Salgı ile muamele edilen hücrelerin %60 civarı inhibisyona uğradığı ve hücre sayısının üçte birine düştüğü belirlenmiştir.

Zhang et al. (2010) *Phyllomedusa sauvagei* deri salgısından izole edilen Phylloseptin-1 peptidinin standard mikrobiyal ajanlar üzerindeki antimikrobiyal ve defibrine at kanındaki hemolitik aktivitelerini araştırmış, bakteriler ve mayaya karşı antimikrobiyal aktivite gözlenmesinin yanında düşük oranda hemolitik etkisinin olduğu belirtilmiştir.

Liberio et al. (2011) *Leptodactylus labyrinthicus*'un deri salgısından izole edilen pentadactylin peptidinin murin melanoma hücre hattı (B16F10) üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak pentadactylin murin melanoma hücrelerinin gelişimini ve proliferasyonunu engellemiş ve hücre sayısını ciddi oranda azaltmıştır.

Reshmy et al. (2011) *Hylarana temporalis*'in deri salgısından izole edilen brevinin peptidlerinin Gram (-) *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *V. cholerae* ile Gram (+) *B. cereus* ve *S. aureus* mikroorganizmalarına farklı seviyelerde antimikrobiyal etki gösterdiğini ve peptidlerden birinin yüksek konsantrasyonlarda bile hemolitik aktivite göstermediğini belirlemişlerdir.

He et al. (2012) *Odorrana tiannanensis*'in deri salgısından izole ettikleri peptidlerin antimikrobiyal, hemolitik ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivite denemeleri sonucunda salgıdan elde edilen peptidlerin Gram (+) *S. aureus*, fungus *C. albicans* ve *C. tropicalis* üzerinde inhibisyona neden olduğunu belirlemişlerdir. Rapora göre peptidlerin hemolitik aktivitesi %10

civarındadır. SGC7901, Hela ve MCF-7 hücre hatları üzerinde denenen peptidler herhangi bir sitotoksik veya antiproliferatif etki göstermemişlerdir.

Liu et al. (2012) *Odorrana jingdongensis*'in deri salgısından izole edilen peptilerin standart mikroorganizmalar Gram (+) *S. aureus*, Gram (-) *E. coli* ve fungus *C. albicans* üzerindeki etkilerini incelemişler ve mikroorganizmalarda önemli oranda inhibisyon gözlemişlerdir. Tavşan eritrositlerinde ise hemolitik aktivite belirlenmiştir.

van Zoggel et al. (2012) *Phyllomedusa bicolor* türünün deri salgısından elde edilen dermaseptin peptidlerinin insan prostat adenokarsinom (PC-3) ve fare fibroblast NIH-3T3 hücre hatları üzerindeki antitümör aktivitelerini araştırmışlar ve sözü geçen peptidlerin insan prostat adenokarsinom PC-3 hücre hatlarının proliferasyonunu %90'a kadar inhibe ettiğini, fare fibroblast hücre hattı üzerine ise herhangi bir olumsuz etkisinin bulunmadığını rapor etmişlerdir.

Brand et al. (2013) *Phyllomedusa nordestina* türünün deri salgısından elde ettikleri dermaseptin ve phylloseptin peptidlerini Gram (+) *S. aureus*, Gram (-) *E. coli* ve fare peritoneal hücreleri üzerinde denemişlerdir. Bakteriler üzerinde çok ciddi bir antibakteriyal etki belirleyemeyen araştırmacılar fare peritoneal hücrelerinden makrofajlar üzerinde ise sitotoksik etkinlik bildirmişlerdir.

Ferreira et al. (2013) *Rhinella marina* ve *Rhaebo guttatus* türlerinin salgılarının ve saflaştırılmış fraksiyonlarının lösemi, kolon, ovaryum ve gliyoblastom kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerini araştırmışlar ve kanserli hücre hatlarının tümünde inhibisyonu belirlemişlerdir. Yüksek konsantrasyonlarda bile hemolitik etkinin bulunmadığını belirtmişlerdir.

Sciani et al. (2013) *Rhinella jimi*, *R. crucifer*, *R. marina*, *R. schneideri*, *R. guttatus*, *R. major*, *R. margaritifera* ve *Phyllomedusa hypochondrialis* türlerinin deri salgılarından elde edilen aktif peptidlerin meme kanser hücre hatları MDA-MB-231 ve MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemişlerdir. İnhibisyonun en çok görüldüğü salgı *Phyllomedusa hypochondrialis* türüne ait olup türlerin tamamının MCF-7 hücre hattı üzerinde etkili olduğu gözlenmiş, *R. guttatus*, *R. crucifer*, *R. major* ve *P. hypochondrialis* türlerinin deri salgılarının MDA-MB-231

hücre hattı üzerinde etkili olduğu diğerlerinin ise çok etkin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Wang et al. (2013) *Rana chensinensis*'in deri salgısından izole edilen temporin peptidinin *in vitro* antikanser aktivitesini incelemişlerdir. Temporin peptidinin meme kanser hücre hatları MDA-MB-231 ve MCF-7 üzerindeki toksisitelerinin %60-70 civarında olduğu sonucuna varılmıştır.

Wei et al. (2013) *Kaloula pulchra hainana*'nın deri salgısının insan, sığır, tavşan ve tavuk eritrositleri üzerindeki hemolitik etkisini araştırmışlar ve en çok insan eritrositleri üzerinde hemolitik aktivite belirlemişlerdir. Salgının çok yüksek olan hemolitik aktivitesinin çok az miktar bakır ile nötralize edilebileceği gösterilmiştir.

Xi et al. (2013) tarafından *Agalychnis callidryas*, *Phyllomedusa hypochondrialis*, *Pachymedusa dacnicolor* türlerinin deri salgılarından tanımlanan medusin peptidlerinin standart antimikrobiyal ve hemolitik aktiviteleri araştırılmıştır. Tanımlanan peptidler Gram (-) bakterilere karşı etkisiz kalırken, Gram (+) bakterilere ve mayalara karşı etkinlik göstermiştir. Buna karşın yüksek hemolitik aktivite göstermelerinin terapötik potansiyellerini düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Zare-Zardini et al. (2013) tarafından *Bufo kavirensis*'in deri salgısından elde edilen katyonik peptidin (maximin-Bk) *E. coli* PTCC2433, *K. pneumoniae* PTCC4231, *P. aeruginosa* PTCC2834, *Agrobacterium tumefaciens* PTCC1245, *B. subtilis* PTCC4533, *L. mesenteroides* PTCC1463, *S. aureus* PTCC1442, *B. cereus* PTCC1435, *Aspergillus niger*, *A. fumigates*, *Penicillium lilacinum* ve *C. albicans* üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri ve insan eritrositleri üzerindeki hemolitik aktivitesi incelenmiştir. Peptidin adı geçen tüm mikroorganizmalara etki ettiği fakat artan konsantrasyonla birlikte hemolitik etkisinin de arttığı rapor edilmiştir.

Abraham et al. (2014) *Clinotarsus curtipes* türünün deri salgısından saflaştırdıkları peptidlerin potansiyel antimikrobiyal aktivitelerinin bulunduğunu ve non-hemolitik olduklarını belirlemişlerdir.

Lin et al. (2014) *Hylarana latouchii* türünün deri salgısından izole ettikleri ve hylaraninler olarak adlandırdıkları peptidlerinin düşük konsantrasyonlarda dahi

bakterilere karşı etkili olduğunu, antifungal etkisinin olmadığını ve 8 ug/ml'ye kadar hemolitik etkisinin bulunmadığını belirlemişlerdir.

Siano et al. (2014) *Leptodactylus latrans* ve *Hypsiboas pulchellus*'un deri salgılarının antimikrobiyal ve hemolitik aktivitelerini araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivite *E. coli* (DBFIQ Ec9), *B. cereus* (DBFIQ B28), *S. aureus* (DBFIQ S 21) , *Pseudomonas sp.* (DBFIQ P 55) ve *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv üzerinde denenmiştir. Her iki türün salgıları adı geçen tüm mikroorganizmaları inhibe etmiştir. Burada önemli olan sonuçların başında tüberküloz etkeni *M. tuberculosis*'in de salgıya bağlı olarak gelişiminin durdurulması gelmektedir. Bunun yanında düşük hemolitik aktivite de belirlenmiştir.

Conlon et al. (2017) *Rana italica* deri salgısından izole edilen brevinin ve temporin peptidlerinin akciğer kanser hücre hattı (A549), meme kanser hücre hattı (MDA-MB-231) ve kolorektal kanser hücre hattı (HT-29) üzerindeki sitotoksik etkilerini, fare eritrositleri üzerindeki hemolitik aktivitelerini, *S. epidermidis*, *E. coli* ve *Candida parapsilosis* üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Sonuç olarak peptidlerin yüksek sitotoksik, hemolitik ve antimikrobiyal etkileri bulunduğu rapor edilmiştir.

Huang et al. (2017) *Pithecopus (Phyllomedusa) hypochondrialis* deri salgısından saflaştırdıkları dermaseptin peptidinin antimikrobiyal ve antikanser etkilerini araştırmışlardır. Antimikrobiyal etkileri *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde, antikanser etkiler MCF-7, MDA-MB-435S, U251MG, PC-3 ve H157 kanser hücre hatları üzerinde, hemolitik etkiler ise at kırmızı kan hücreleri üzerinde belirlenmiştir. Peptidin yüksek antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri bulunurken hemolitik etkisinin düşük olduğu belirlenmiştir.

Liu et al. (2017) *Phyllomedusa tarsius* ve *Phyllomedusa hypochondrialis* deri salgılarından saflaştırdıkları phylloseptin peptidlerinin biyoaktivitelerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, *S. aureus*, *E. faecalis* üzerine antimikrobiyal etki gösterirken, akciğer kanser hücre hattına (NCI-H157) sitostatik etki göstermiştir. Peptidler, sağlıklı insan mikrovasküler endotel hücre hattına düşük sitotoksiste, at eritrositleri üzerine ise düşük hemolitik aktivite göstermiştir.

Zhou et al. (2017) *Bombina orientalis* deri salgısından izole ettikleri bombinin peptidlerinin antimikrobiyal, antikanser ve hemolitik etkilerini araştırmışlardır. Antimikrobiyal etkileri *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde, antikanser etkileri hepatoma hücre hatları (Hep G2, SK-HEP-1, Huh7), prostat kanser hücre hattı (PC-3), akciğer kanser hücre hattı (A549) ve melanoma hücre hattı (A375) üzerinde, hemolitik etkileri ise insan kırmızı kan hücreleri üzerinde belirlemişlerdir. Sonuç olarak bombinin peptidlerinin yüksek biyoaktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Görüldüğü üzere amfibi deri salgılarının farklı etkilerine dair çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Sunulan çalışmada bu geniş bilgi birikimine özel anlamda katkıda bulunmak hedeflenmiştir.

Çalışmanın temel amacı, Kırmızı Kurbağa (*Bombina bombina*), Ağaç Kurbağası (*Hyla orientalis*), Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*), Levanten Ova Kurbağası (*Pelophylax bedriagae*), Anadolu Kurbağası (*P. caralitanus*), Fazıla'nın Likya Semenderi (*Lyciasalamandra fazilae*), Marmaris Kara Semenderi (*L. flavimembris*), Pürtüklü Semender (*Triturus ivanbureschi*), Anadolu Benekli Semenderi (*Neurergus strauchii strauchii*) ve Baran'ın Anadolu Benekli Semenderi (*N. s. barani*) türlerine ait salgılarının biyoaktivitelerinin belirlenmesidir. Bu kapsamda, bireysel farklılıkları standardize etmek amacıyla aynı türün farklı bireylerinden çok küçük elektriksel uyarı verilerek toplanan deri salgısı örnekleri örnekleme havuzunda bir araya getirilmiş denemelerde kullanılmak üzere liyofilize edilmiştir. Farklı türlerden alınan salgı örnekleri için total protein miktarı, SDS-PAGE protein profili, antimikrobiyal aktivite [*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 0157:H7 (RSKK234), *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* DSM 13590, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10239 ve *Candida tropicalis* RSKK 2412] [minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) yöntemi], sağlıklı (HEK-293) ve kanserli hücre hatları (PC-3, CaCo-2, MDA-MB-231, HeLa, A549, U87MG, MPanc-96) üzerindeki sitotoksik (MTT yöntemi) etkileri ve tavşan kırmızı kan hücreleri (eritrositler) üzerindeki hemolitik etkileri belirlenmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmalar bu alanda Türkiye'de ilk niteliği taşımaktadır.

Ayrıca, farklı gruplardan kurbağa taksonları seçilerek, birbirlerine filogenetik açıdan uzak ve yakın türlerin biyoaktivitelerindeki ve protein profillerindeki benzerlik ve farklılıkların da ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Bu amaçların yanı sıra, biyoteknolojik ve terapötik olarak potansiyel bulunan deri salgılarına sahip hedef türlerin belirlenmesi de amaçlanmıştır.



3. MATERYAL METOD

3.1. Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları 2012-2015 yılları ve Şubat-Ekim ayları arasında gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmaları hedef türlere göre uygun dönemler ve hava koşulları gözetilerek düzenlenmiştir. Karada yaşayan türler el ile suda yaşayan türler ise atrap (su kepçesi) ile yakalanmıştır. Türlerin tespit edildiği lokaliteler kayıt altına alınmıştır. Farklı bölgelerde dağılışı gösteren beşi kuyruksuz kurbağa (Anura), diğer beşi de kuyruklu kurbağa (Urodela) olmak üzere toplam 10 farklı kurbağa/semender türü hedef olarak belirlenmiştir. Bu taksonlar; Kırmızılı Kurbağa (*Bombina bombina*), Ağaç Kurbağası (*Hyla orientalis*), Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*), Levanten Ova Kurbağası (*Pelophylax bedriagae*), endemik Anadolu Kurbağası (*P. caralitanus*), endemik Fazıla'nın Likya Semenderi (*Lyciasalamandra fazilae*), endemik Marmaris Kara Semenderi (*L. flavimembris*), Pürtüklü Semender (*Triturus ivanbureschi*), endemik Anadolu Benekli Semenderi (*Neurergus strauchii strauchii*) ve endemik Baran'ın Anadolu Benekli Semenderi (*N. s. barani*)'dir. Belirlenen hedef türlerin tamamı ile çalışma imkanı bulunabilmiştir. Gerçekleştirilen saha çalışmaları, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün 06.03.2014 tarih ve 72784983-488.04-51946 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Deri/Parotoid Bez Salgısı Sağımı

Arazi süresince, farklı türlerde kurbağa/semenderlerden salgı sağımı, Students Stimulator (C.F. Palmer Ltd. London, England) ile zarar vermeyecek derecede çok küçük (3V-5V) elektriksel uyarı verilmek suretiyle vücut yüzeyinde salgı birikimi sağlanarak, ardından vücut yüzeyinde biriken salgının ultra saf su kullanılarak tüpler içerisine yıkanması şeklinde gerçekleştirilmiştir (Tyler et al., 1992). Belirgin parotoid bezlere sahip olan Bufonidae familyasına ait *Bufo bufo* ve Salamandridae familyasına ait *Lyciasalamandra fazilae* ve *L. flavimembris* türlerinden ise, uyarı ile alınan deri salgılarına ek olarak parotoid bezlerin sıkılması ve basınç uygulanması suretiyle salgı eldesi gerçekleştirilmiş ve tüpler içerisine ultra saf su ile yıkanmıştır. İstenmeyen ve çalışmaları etkileyebilecek kalıntılardan arındırmak amacıyla salgı örnekleri 6000 x rpm'de ve 4°C'de 10 dk.

santrifüje edilmiş, süpernatant kısımlar steril bir tüpe alınmış ve ivedi olarak sıvı azot içerisinde veya -80°C 'de dondurulmuştur. Tüm çalışmalar boyunca hiçbir bireye hiçbir fiziksel zarar verilmemesine büyük özen gösterilmiştir. Etik kurallar çerçevesinde yapılan olan salgı sağımının ardından türlere ait bireyler doğal ortamlarına geri bırakılmışlardır. Çalışma Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29.01.2014 tarih ve 2014-002 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2.1. Kırmızılı Kurbağa (*Bombina bombina*)'da temsili deri salgısı sağımı. 1- Elektriksel uyarı verilmesi; 2- Steril falkon tüp içerisine ultra saf su ile yıkanması; 3- Köpüren deri salgısı materyalinin görünüşü.

3.3. Liyofilizasyon ve Sterilizasyon

Liyofilizasyon işlemi Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Edwards Modulyo 4K Freze Dryer (MechaTech Systems Ltd, UK) cihazı ile proje ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Falkon tüpler içerisinde -80°C 'de saklanan salgı örnekleri çıkartılmış, liyofilizasyon cihazına koymadan önce kapakları açılmış ve üzerine parafilm gerilerek iğne yardımı delikler açılmış ve cihaza dik biçimde yerleştirilmiştir. Sıvının tamamı uzaklaştırılana ve geriye sadece kuru materyal kalana kadar cihaz takip edilmiştir. Liyofilizasyon işleminin tamamlanmasının

ardından örneklerin kuru ağırlıkları hassas terazide tartılmış ve kuru salgı örnekleri biyoaktivite çalışmaları başlayana kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Biyoaktivite çalışmalarına başlamadan önce ultra saf suda çözölen liyofilize ham deri salgısı örnekleri steril çalışma prensipleri temelinde laminar flow kabin içerisinde, 0.22 µm enjektör tipi filtreden geçirilerek sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Bu şekilde deri biotasında bulunan bakteri ve fungusların kültür ortamlarını kontamine etmesi engellenmiştir.

3.4 Total Protein Miktar Tayini

Ham deri salgılarının total protein miktar tayinleri hassas sonuç vermesi göz önünde bulundurularak BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA) ile gerçekleştirilmiştir.

Likya semenderleri (*Lyciasalamandra*)’ne ait liyofilize deri salgıları 4 mg/ml, diğer 8 türe ait liyofilize deri salgıları ise 2 mg/ml olacak şekilde ultra saf suda çözülmüştür. Kör (blank) çözelti olarak salgı örneklerimizi çözdüğümüz ultra saf su kullanılmıştır.

BCA kiti reaktif çözeltisi: BCA protein analiz kitinde bulunan “A reaktif” (NaCl, bikinkoninik asit, Na₂CO₃ (sodyum karbonat), NaHCO₃ (sodyum bikarbonat), Na₂C₄H₄O₆ (sodyum tartrat) ve NaOH) ve “B reaktifinin” (CuSO₄ - kükrik sülfat), 50:1 (A:B) oranında karıştırılmasıyla elde edilmiştir.

Total protein tayininde standart protein olarak BSA (bovine serum albumin) kullanılmıştır. Standartların seri dilüsyonları, BCA kitinde bulunan 2 mg/mL’lik stok çözeltiden, 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml ve 25 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Tüm standartlar, örnekler ve ultra saf su 3’er tekrarlı olarak kuyucuklara 25 µl pipetlenmiştir. BCA kit reaktif çözeltisinden tüm kuyucuklara 200 µl pipetlenmiştir. Pleyt 30 dk. 37°C’de inkübasyona bırakılmış, ardından oda sıcaklığında 5 dakika soğuması bekletildikten sonra kitin standart çalışma prosedürü olan 562 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Standart proteinlerin verdiği absorpsanlar ile standart grafiği çizilmiş ve eğim denklemi elde edilmiştir. Elde

edilen denklem üzerinde her örneğin spektrofotometrik olarak verdiği absorbans değeri girilerek total protein miktarı hesaplanmıştır.

3.5. Protein Profillerinin Belirlenmesi (SDS-PAGE)

Elektroforetik işlemler Laemmli (1970)'e göre sürekli olmayan (discontinuous) tampon sistemi kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir SDS-PAGE jeli için yürütme jeli ve yığma jeli hazırlanmıştır. Yürütme işlemi Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell elektroforez cihazında yapılmıştır. Thermo PageRuler Plus Protein Standardı (10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 ve 250 kD) marker olarak kullanılmıştır.

Örnek (yükleme) tamponu (SDS, 62,5 mM tris-HCl pH6,8, %20 gliserol, %2 SDS, %5 β-merkaptotanol)

Bidistile su	(3 ml)
0,5 M tris-HCl pH 6,8	(1 ml)
Gliserol (Merck)	(1,6 ml)
%10 SDS	(1,6 ml)
β-merkaptotanol (Sigma)	(0,4 ml)
%0,5 (ağırlık/hacim) bromfenol mavisi	(0,4 ml) karıştırılır.

1X Elektrod (yürütme) tamponu (1X= 25mM tris, 192mM glisin, % 0,1 SDS, pH 8,3)

Tris	(3.03 g)
Glisin (Sigma)	(14.4 g)
SDS	(1 g)

1 L distile su ile tamamlanır.

%10 (ağırlık/hacim) APS (amonyum persülfat)

0,1 g Amonyum Persülfat (APS) (Sigma)

1 ml bidistile suda çözündürülür.

Yürütme (Ayırma) Jeli (Resolving Jel)

3 ml Yürütme jel çözeltisi A (Resolver A) (3ml)

3 ml Yürütme jel çözeltisi B (Resolver B) (3ml)

%10'luk APS (Amonyum persülfat) (30 µl)

TEMED (N-NN'N'-tetrametiletillen- diamin) (3 µl)

karıştırılarak hazırlanmıştır.

Yığma (Düzenleyici Jel) Jeli (Stacking Jel)

Yığma jel çözeltisi (Stacker A) (1 ml)

Yığma jel çözeltisi (Stacker B) (1 ml)

%10'luk APS (Amonyum persülfat) (10 µl)

TEMED (N-NN'N'-tetrametiletillen- diamin) (2 µl)

karıştırılarak hazırlanmıştır.

Protein profillerinin belirlenmesinde dikey elektroforez cihazı (Tetra Cell, Bio-Rad, USA) ve TGX Stain Free (Bio-Rad, USA) akrilamid jel kiti kullanılmıştır. Öncelikle yürütme ve yığma jelleri tüm içeriğiyle hazır hale getirilmiştir. APS ve TEMED polimerleşmeyi başlatacağı için en son ilave edilmiştir. Yürütme ve yığma jel solüsyonları cam plakalar arasına dökülmüş ve

polimerizasyon için 30 dk bekletilmiştir. Jel polimerize olduktan sonra örnek yüklenmesi için hazır hale gelmiştir. Taraklar çıkarılmış ve jel kasetleri tankın içine yerleştirilmiştir. Yükleme tamponu 4X'lik olduğundan 10 µl yükleme tamponu ve her örnekten 30 µl karıştırılarak 1X olarak hazırlanmıştır. Marker (10-250 kDa) ve örnekler kuyucuklara eklendikten sonra güç kaynağı (Bio-Rad Powerpac Universal) çalıştırılmış, örnekler izleme boyası yığma jelini geçene kadar 100 V'ta, yürütme jelinden geçme süresince 150 V'da moleküler ağırlıklarına göre ayrımın yapılacağı jelde yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonunda camlar dikkatlice açıldıktan sonra jeller Bio-Rad jel dokümantasyon sistemi ile görüntülenmiştir. Protein profili çalışmalarında örnekler jelde 3 defa yürütülmüştür. Protein fraksiyonlarının yaklaşık moleküler ağırlıkları ChemiDoc (Bio-Rad, USA) jel görüntüleme sisteminin software programı (Image Lab, Bio-Rad, USA) ile hesaplanmıştır.

3.6. Antimikrobiyal Aktivite

Ham deri salgılarının antimikrobiyal aktivite tayinlerine başlamadan önce, liyofilize halde olan test bakterileri Mueller Hinton Broth (Oxoid) ve test mayaları Sabouraud Dextrose Broth'da (Oxoid) canlandırıldıktan sonra Mueller-Hinton Agar (Merck) ve Sabouraud Dextrose Agar besiyerine ekilerek saflıkları kontrol edilmiş ve stoklanmıştır. Stoklanmış olan kültürler antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.

Test mikroorganizmaları:

- *E. coli* - O157:H7 RSKK 234: Streptomycin-, sulfisoxazole-, ve tetracycline-dirençli
- *E. coli*-ATCC 25922
- *S. aureus*-ATCC 25923: Meticillin dirençli
- *S. epidermidis*-ATCC 12228
- *E. faecium* - DSM 13590: Vancomycin dirençli

- *E. faecalis*-ATCC 29212: Vancomycin dirençli
- *K. pneumoniae* ATCC 10031
- *B. cereus*-ATCC 7064
- *Sa. typhimurium*-CCM 5445
- *C. albicans* ATCC 10239
- *C. tropicalis* RSKK 2412

Mueller-Hinton Broth Besiyeri: 21 g besiyeri (Oxoid Mueller-Hinton Broth-CM0405, meat infusion 2 g, kazein hidrolizat 17.5 g, çözünür nişasta 1.5 g) 1L distile suda tamamen çözülünceye kadar karıştırılmış, 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir (pH 7.5). Bu besiyeri antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında test bakterileri için kullanılmıştır.

Sabouraud Dextrose Broth Besiyeri: 65 g besiyeri (Oxoid, Sabouraud dextrose broth mikolojik pepton 10 g, glikoz 40g) 1L distile suda tamamen çözülünceye kadar karıştırılmış, 25 °C’de, 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir (pH 7.5). Bu besiyeri antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında test mayaları *C. albicans* ve *C. tropicalis* için kullanılmıştır.

Broth mikrodilüsyon yöntemi: Deri salgılarının minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC), CLSI tarafından tanımlanan mikrodilüsyon yöntemine göre yapılmıştır. İzolatların 24 saatlik kültürlerinden % 0.9’luk NaCl (Sodyum Klorür) çözeltisi içinde 0.5 Mc Farland’a karşılık gelecek şekilde süspansiyonlar hazırlanmıştır. Salgı örnekleri 0.95-500 µg/ml olacak şekilde Mueller-Hinton ve SDB sıvı besiyerinde, steril plastik mikrodilüsyon plakları içinde hazırlanmıştır. Daha sonra mikrodilüsyon plağının her kuyucuğuna test organizmaları inoküle edilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra MIC değerleri tayin edilmiştir (CLSI, 2009). Ayrıca standart antibiyotik olan Ampicillin (Sigma) bakteriler için,

standart antifungal madde olan Flucytosine de (Sigma) *C. albicans* ve *C. tropicalis* için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontroller Ampicillin ve Flucytosine 0,58-300 µg/ml konsantrasyonda kullanılmıştır.

Ayrıca minimal bakterisidal konsantrasyon (MBC) and minimal fungisidal konsantrasyon (MFC) değerleri de hesaplanmıştır. MBC, incelenen bakterinin %99.9'unu öldüren en düşük konsantrasyon (µg/ml), MFC ise incelenen fungusun %99.9'unu öldüren en düşük konsantrasyondur (µg/ml). Bunun için MIC sonucu alındıktan sonra gözle görünür üremenin olmadığı kuyucuklardan test bakterileri için Muller Hinton Agar (MHA) besiyerine test mayaları için Sabouraud Dextrose Agara (SDA) ekim yapılarak amfibi salgılarının MBC ve MFC değerleri belirlenmiştir.

3.7. Sitotoksisite Testleri

Deri salgıların oluşturacağı sitotoksik etki belirlenmesinde PC-3 (insan prostat adenokarsinoma), CaCo-2 (insan kolon kolorektal adenokarsinoma), MDA-MB-231 (insan meme bezi adenokarsinoma), HeLa (insan serviks adenokarsinoma), A549 (insan akciğer karsinoma), U87MG (glioblastom hücre hattı), MPanc-96 (pankreatik kanser hücresi) kanser hücre hatları ve sağlıklı hücre hattı olarak HEK-293 (insan embriyonik böbrek) kullanılmıştır.

Hücrelerin kültür ortamında devamlılığı RPMI 1640 veya DMEM Ham's F12 (%10 FBS, %1 L-glutamin, %1 gentamisin, ve 1 mM HEPES) besi ortamı içerisinde 37 °C'ye ayarlanmış CO₂'li inkübatörde inkübe edilerek sağlanmıştır. Hücrelerin besi ortamları iki günde bir değiştirilmiş ve kültür kabının yüzeyini kapladıklarında pasajlanmıştır. Logaritmik fazda aktif olarak çoğalan hücreler testlerde kullanılmıştır.

MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Hücre

Canlılık ve Proliferasyon Testi: Test, tetrazolyum tuzu MTT'nin canlı hücrelerde, hücresel dehidrogenazlar tarafından çözünmüş formazana dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır. Bu amaçla, hücre hatları 1×10⁵ hücre/ml başlangıç konsantrasyonunda 96-gözlü hücre kültürü pleytlerinde 24 saat 37 °C, %5 CO₂ içeren nemli etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra, kültüve edilmiş

hücreler üzerine hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda (*H. orientalis*, *B. bufo* ve *N. s. barani* 0.25, 2.5, 25 µg/ml; *P. caralitanus* 0.6, 6, 60 µg/ml; diğer türler 0.5, 5, 50 µg/ml) salgı örnekleri eklenerek 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 48. saatinde MTT (Calbiochem, Almanya) solüsyonu eklenerek 4 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben ortam uzaklaştırıldıktan sonra DMSO eklenerek çözünür hale getirilen formazan kristallerinin oluşturduğu renge karşılık gelen absorbans değerleri 570 nm’de (referans filtre, 630 nm) UV görünür spektrofotometre ile ölçülmüştür (Mosmann, 1983).

Hücre Canlılığının Belirlenmesi ve Veri Analizi: Sitotoksosite, herhangi bir ajana maruz bırakılmamış kontrol $\pm$ SD’e bağlı olarak yüzde artış şeklinde belirlenmiştir. Kontrol değeri %0 sitotoksik olarak alınmıştır. Sitotoksosite verileri sigmoidal eğriye oturturulmuş ve herhangi bir ekstrakt uygulaması yapılmamış kontrol grubuna kıyasla %50 inhibisyona neden olan ekstrakt konsantrasyon değeri olan IC₅₀ değerinin hesaplanmasında 4 parametrelili lojistik model kullanılmıştır. IC₅₀, deneysel koşullar altında hücre büyümesini %50 azaltan konsantrasyon değeridir. Bu değer en az üç tane birbirinden bağımsız tekrarlanabilir ve istatistiksel olarak anlamlı hesaplamaların ortalamasıdır. IC₅₀ değeri % $\pm$ 95 güven aralığında belirlenmiştir. Bu analiz GraphPad Prism (San Diego, CA) ile yapılmıştır.

Morfolojik İnceleme: Farklı konsantrasyonlardaki deri salgılarına maruz bırakılmış hücrelerin morfolojik incelemeleri inverted mikroskop (Olympus, Japonya) altında yapılmıştır.

3.8. Hemolitik Etki Testleri

Hemolitik aktivite testleri için kullanılan kırmızı kan hücreleri (eritrositler) Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nde bulunan sağlıklı Yeni Zelanda tavşanından elde edilmiştir. Kan, BD Vacutainer TM (NH 143 I. U., Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK) ile alınmış ve bu kanın 7 ml’si üç kere steril fizyolojik su (0.89%, w/v) ile yıkanarak, %0.5 olacak şekilde fizyolojik su ile seyreltilerek testte kullanmak üzere hazırlanmıştır. Hücre süspansiyonunun 0.05 ml’si 96’lık mikroplyetlerde 0.05 ml fizyolojik su ve sırasıyla 0.5, 5, 50 µg/ml konsantrasyonlarda deri salgısı ile muamele edilmiştir. Pleytler 37 °C’de 30

dakika inkübe edilip ardından 800 rpm'de 10 dk. santrfüj edilmiştir. Hemoglobinsiz süpernatantlar spektrofotometrik olarak 412 nm'de ölçülmüştür. Fizyolojik ve saf su, sırasıyla minimal ve maksimal hemolitik kontroller olarak alınmış ve her örnek 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır (Yang et al., 2005).



4. BULGULAR

4.1. Arazi Çalışmaları

Çalışma kapsamında bulunan ve deri salgıları ile çalışılan farklı familya/alt familyalara ait 5 kuyruksuz kurbağa ve 5 kuyruklu kurbağa/semender türü ve arazi çalışmalarında bulundukları lokaliteler Çizelge 4.1.1’de verilmiştir. Semender türlerinin tamamı Salamandridae familyasına dahil olduğundan alt-familya bazında sınıflandırılmıştır. Başında yıldız olan taksonlar ülkemize endemiktir.

Çizelge 4.1.1. Deri salgıları ile çalışılan taksonlar.

Familya/Alt Familya	Tür	Türkçe	Lokalte
Bombinatoridae	<i>Bombina bombina</i>	Kırmızı Kurbağa	Uzunköprü, Edirne (1)
Hylidae	<i>Hyla orientalis</i>	Ağaç Kurbağası	Fındıklı, Rize (2)
Bufonidae	<i>Bufo bufo</i>	Siğilli Kurbağa	Konyaaltı, Antalya (3)
Ranidae	<i>Pelophylax bedriagae</i>	Levanten Batak Kurbağası	Bornova, İzmir (4)
Ranidae	* <i>Pelophylax caralitanus</i>	Anadolu Kurbağası	Antalya-Muğla sınırı (5)
Salamandrinae	* <i>Lyciasalmadra fazilae</i>	Fazıla’nın Likya Semenderi	Muğla (6)
Salamandrinae	* <i>Lyciasalamandra flavimembris</i>	Marmaris Kara Semenderi	Muğla (7)
Pleurodelinae	<i>Triturus ivanbureschi</i>	Pürtüklü Semender	Uzunköprü, Edirne (8)
Pleurodelinae	* <i>Neurergus strauchii strauchii</i>	Anadolu Benekli Semenderi	Bingöl (9)
Pleurodelinae	* <i>Neurergus strauchii barani</i>	Baran’ın Anadolu Benekli Semenderi	Malatya (10)

Türlere ait temsili fotoğraflar Şekil 4.1.1, bulundukları lokaliteler ise Şekil 4.1.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1.1. Deri salgıları ile çalışılan kurbağa/semender türlerinin temsili fotoğrafları: 1- *B. bombina*, 2- *H. orientalis*, 3- *B. bufo*, 4- *P. bedriagae*, 5- *P. caralitana*, 6- *L. fasilae*, 7- *L. flavimembris*, 8- *T. ivanbureschi*, 9- *N. s. strachii*, 10- *N. s. barani*.



Şekil 4.1.2. Kurbağa semender türlerinin bulundukları lokasyonlar: 1- *B. bombina* (Uzunköprü-Edirne), 2- *H. orientalis* (Fındıklı-Rize), 3- *B. bufo* (Konyaaltı-Antalya), 4- *P. bedriagae* (Bornova-İzmir), 5- *P. caralitanus* (Muğla-Antalya sınırı), 6- *L. fazilae* (Muğla), 7- *L. flavimembris* (Muğla), 8- *T. ivanbureschi* (Uzunköprü-Edirne), 9- *N. s. strauchii* (Bingöl), 10- *N. s. barani* (Malatya).

4.2. Liyofilizasyon

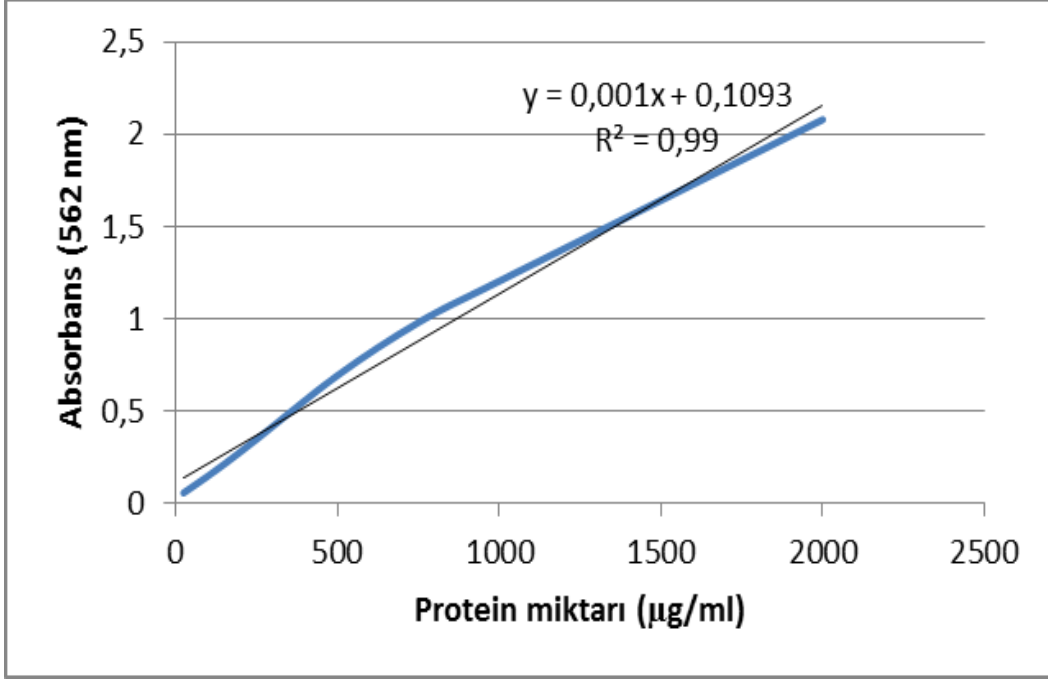
Liyofilizasyon sonucunda bütün türlerde liyofilize ham deri salgısı elde edilebilmiştir. Türler ait bulunabilen ve sağımları yapılabilen birey sayısı ile elde edilen/edilecek salgı örneği miktarı doğru orantılıdır. Bununla birlikte bireylerin yaşları ve boyutları da elde edilen/edilecek salgı miktarını etkilemektedir. Deri salgılarının liyofilizasyon işleminden sonraki ham kuru ağırlıkları Çizelge 4.2.1’de verilmiştir. En yüksek miktarda elde edilen liyofilize deri salgısı *Neurergus s. strauchii*’ye, en düşük miktarda liyofilize örnek ise *Pelophylax bedriagae* türüne aittir.

Çizelge 4.2.1. Liyofilize salgı örneklerinin kuru ağırlıkları (mg: miligram)

Tür	Ağırlık (mg)	Tür	Ağırlık (mg)
<i>Bombina bombina</i>	44	<i>Lyciasalamandra fazilae</i>	20
<i>Hyla orientalis</i>	12	<i>Lyciasalamandra flavimembris</i>	50
<i>Bufo bufo</i>	25	<i>Triturus ivanbureschi</i>	15
<i>Pelophylax bedriagae</i>	5	<i>Neurergus strauchii strauchii</i>	198
<i>Pelophylax caralitanus</i>	27	<i>Neurergus strauchii barani</i>	132

4.3 Total Protein Miktarları

BSA (sığır serum albümini) protein standartlarının verdikleri absorbanslara göre hazırlanan standart eğri grafiği ise Şekil 4.3.1’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre en yüksek protein miktarı *Bufo bufo* (3100 µg/ml) deri salgısında, en düşük protein miktarı ise *L. fazilae* (500 µg/ml) deri salgısında tespit edilmiştir. Türlerin total protein miktarları Çizelge 4.3.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.3.1. BSA standart protein absorbansları ile hazırlanan eğri, denklemi ve eğimi.

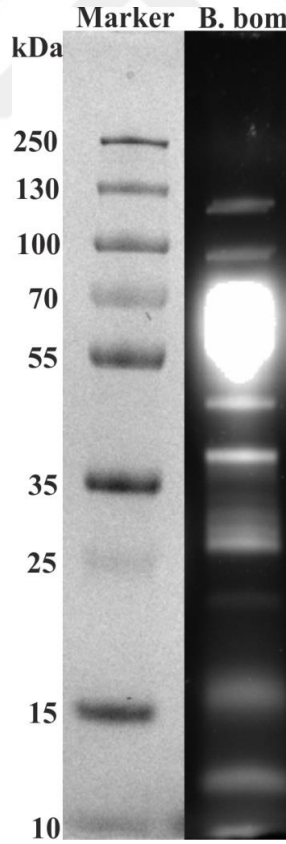
Çizelge 4.3.1. Deri salgılarının total protein miktarları (µg: mikrogram)

Tür	Protein miktarı (µg/ml)	Tür	Protein miktarı (µg/ml)
<i>Bombina bombina</i>	2200	<i>Lyciasalamandra fazilae</i>	500
<i>Hyla orientalis</i>	1950	<i>Lyciasalamandra flavimembris</i>	620
<i>Bufo bufo</i>	3100	<i>Triturus ivanbureschi</i>	1360
<i>Pelophylax bedriagae</i>	1640	<i>Neurergus strauchii strauchii</i>	1590
<i>Pelophylax caralitanus</i>	2200	<i>Neurergus strauchii barani</i>	1630

4.4 Protein Profilleri (SDS-PAGE)

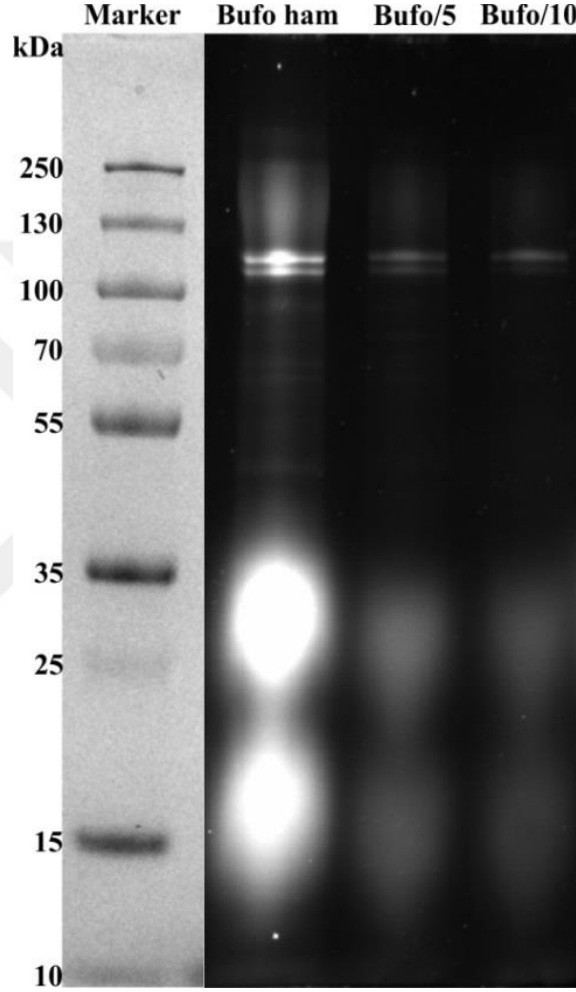
Taksonlara ait deri salgılarının protein profillerini belirlemek amacıyla sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. Total protein miktarı yüksek olan türlerde daha iyi görüntü elde edilebilmesi amacıyla dilüsyon yoluna gidilmiştir. Sonuç olarak çalışılan tüm deri salgılarına ait protein profilleri belirlenmiştir. SDS-PAGE protein profillerine bakıldığında en yüksek protein fraksiyonu sayısı *T. ivanbureschi*'de (20 fraksiyon), en düşük protein fraksiyonu sayısı ise *L. fazilae* (6 fraksiyon)'de belirlenmiştir.

SDS-PAGE sonucunda; Kırmızı Kurbağa, *Bombina bombina* deri salgısının protein profiline bakıldığında moleküler ağırlıkları 112 kDa, 109 kDa, 93 kDa, 91 kDa, 69 kDa, 50 kDa, 41 kDa, 35 kDa, 29 kDa, 23 kDa, 16 kDa, 11 kDa ve 9 kDa olan toplam 13 protein bandı saptanmıştır (Şekil 4.4.1).



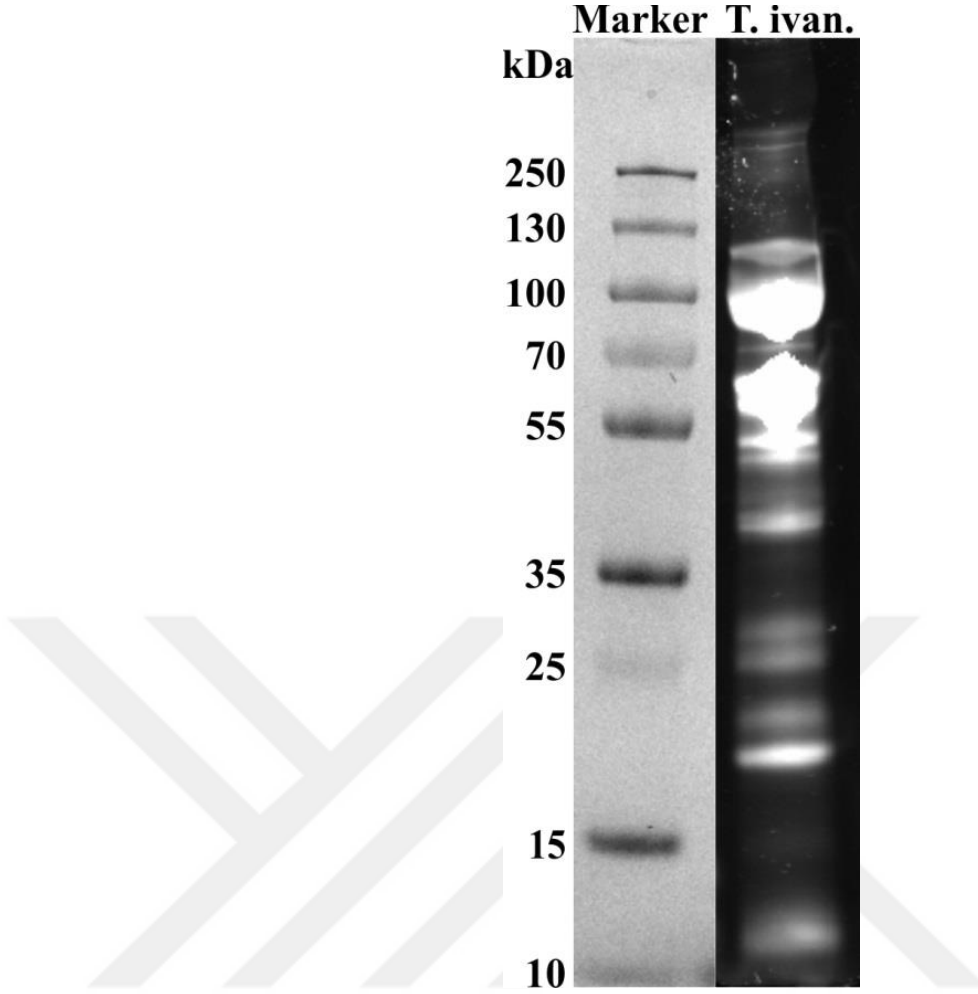
Şekil 4.4.1. *B. bombina* deri salgısının moleküler ağırlıklarına göre protein profili

Siğilli Kurbağa, *Bufo bufo* türünün deri ve parotoid bez salgılarının protein profilini belirlemek amacıyla; ham salgı, 5 kat dilüsyon ve 10 kat dilüsyon olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda elektroforez uygulaması tekrarlanmış ve 11 protein fraksiyonu belirlenmiştir. Belirlenen protein fraksiyonlarının hesaplanan moleküler ağırlıkları sırasıyla; 105 kDa, 101 kDa, 90 kDa, 81 kDa, 74 kDa, 68 kDa, 60 kDa, 52 kDa, 30 kDa, 16 kDa ve 11 kDa'dur (Şekil 4.4.2).



Şekil 4.4.2. *B. bufo* deri salgısının moleküler ağırlıklarına göre protein profili.

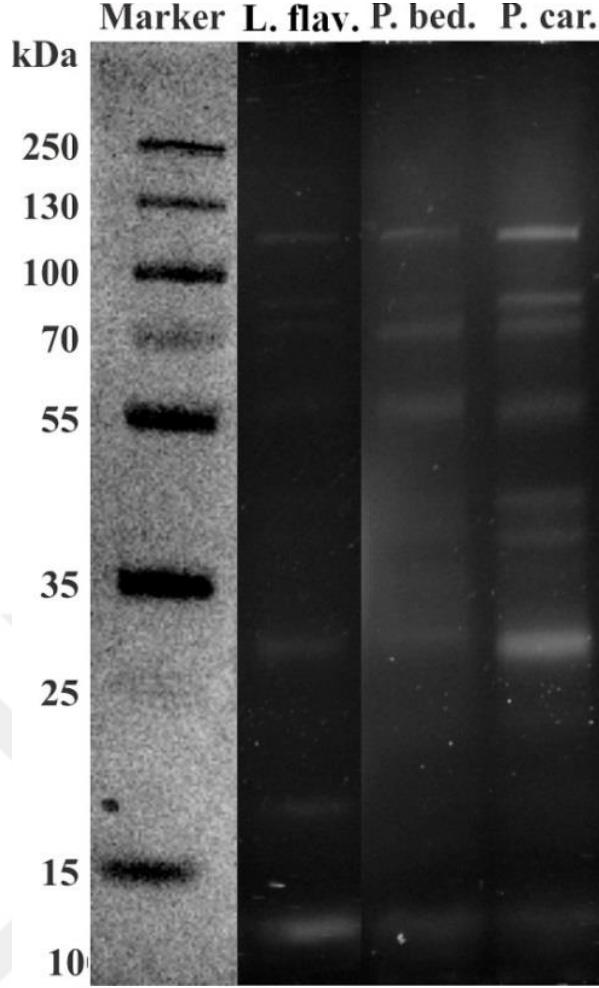
Pürtüklü Semender, *Triturus ivanbureschi* deri salgısında moleküler ağırlıkları sırasıyla 272 kDa, 263 kDa, 200 kDa, 109 kDa, 89 kDa, 78 kDa, 68 kDa, 64 kDa, 54 kDa, 50 kDa, 47 kDa, 43 kDa, 38 kDa, 30 kDa, 27 kDa, 22 kDa, 20 kDa, 16 kDa, 11 kDa ve 9 kDa olan 20 protein fraksiyonu tespit edilmiştir. (Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.3. *T. ivanbureschi* deri salgısının moleküler ağırlıklarına göre protein profili.

Marmaris Kara Semenderi, *L. flavimembris* deri salgısında 9 protein fraksiyonu tespit edilmiştir. Fraksiyonların hesaplanan moleküler ağırlıkları sırasıyla; 108 kDa, 87 kDa, 79 kDa, 62 kDa, 44 kDa, 39 kDa, 28 kDa, 16 kDa ve 11 kDa'dır (Şekil 4.4.4).

Levanten Ova Kurbağası, *Pelophylax bedriagae* ve Anadolu Kurbağası, *Pelophylax caralitanus* türlerinin deri salgılarında, hesaplanan moleküler ağırlıkları sırasıyla 108 kDa, 87 kDa, 79 kDa, 62 kDa, 44 kDa, 39 kDa, 28 kDa, 22 kDa 16 kDa ve 11 kDa olan toplam 10 protein fraksiyonu tespit edilmiştir (Şekil 4.4.4). Aynı cinse ait her iki türün de protein profillerinin birbirlerine denk olduğu saptanmıştır.

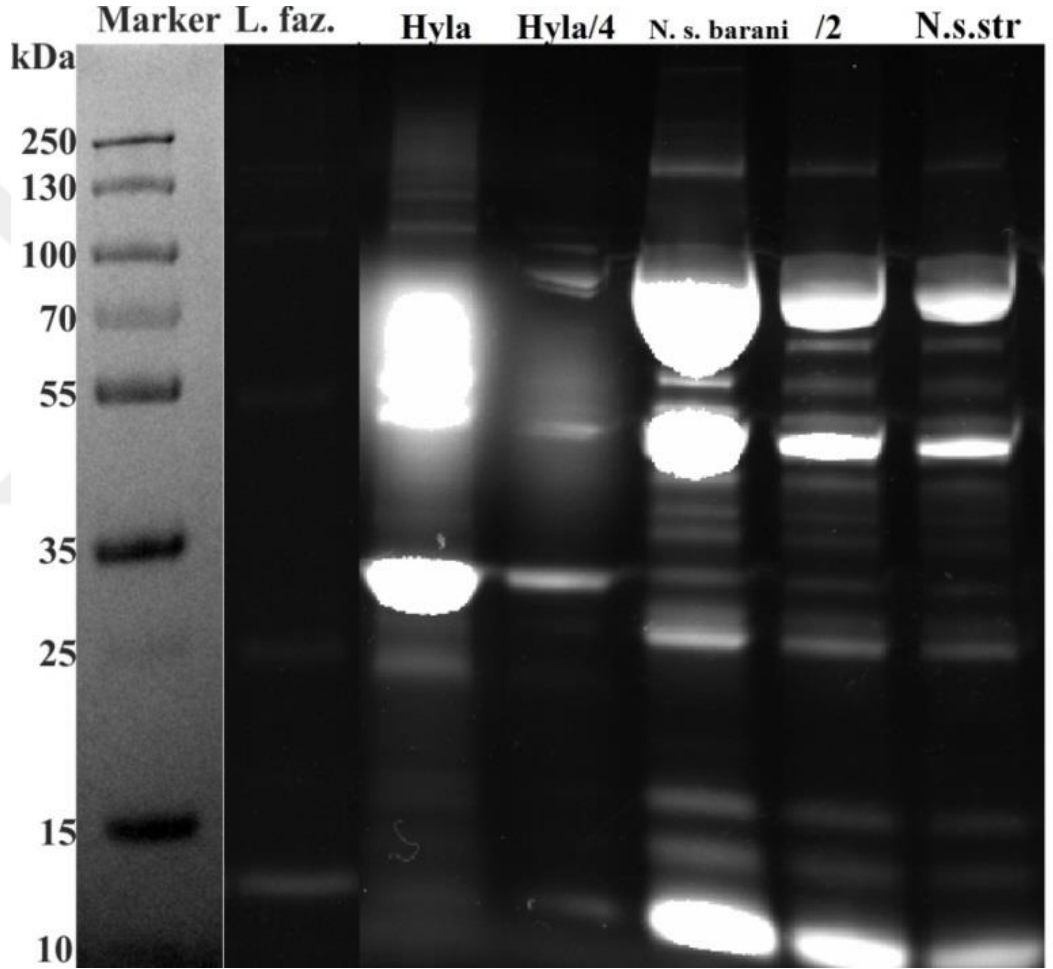


Şekil 4.4.4. *L. flavimembris*, *P. bedriagae* ve *P. caralitanus* deri salgılarının moleküler ağırlıklarına göre protein profilleri.

Fazıla'nın Likya Semenderi, *L. fazilae* deri salgısının protein profiline bakıldığında toplam 6 protein fraksiyonu tespit edilmiş olup, hesaplanan moleküler ağırlıkları sırasıyla; 132 kDa, 101 kDa, 54 kDa, 25 kDa, 16 kDa ve 11 kDa'dur (Şekil 4.4.5).

Hyla orientalis türünün deri salgısının protein profilini belirlemek amacıyla ham salgı ve 4 kat dilüsyon olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda elektroforez uygulaması yapılmış ve 18 protein fraksiyonu saptanmıştır. Belirlenen protein fraksiyonlarının moleküler ağırlıkları sırasıyla; 248 kDa, 209 kDa, 127 kDa, 116 kDa, 105 kDa, 98 kDa, 73 kDa, 63 kDa, 53 kDa, 40 kDa, 34 kDa, 29 kDa, 24 kDa, 19 kDa, 16 kDa, 14 kDa, 11 kDa ve 9 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4.5).

Ham salgı ve 2 kat dilüsyon olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda çalışılan Baran'ın Anadolu Benekli Semenderi, *Neurergus strauchii barani* ve *N. s. strauchii* deri salgılarının protein profillerine bakıldığında, moleküler ağırlıkları sırasıyla 164 kDa, 110 kDa, 92 kDa, 80 kDa, 69 kDa, 61 kDa, 54 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 37 kDa, 32 kDa, 28 kDa, 26 kDa, 19 kDa, 16 kDa, 14 kDa ve 11 kDa olmak üzere toplam 18 protein fraksiyonu belirlenmiştir (Şekil 4.4.5). Görüldüğü üzere aynı türe ait iki farklı alttürün de deri salgılarına ait protein profillerinin aynı olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.4.5. *L. fazilae*, *H. orientalis*, *N. s. barani* ve *N. s. strauchii* deri salgılarının moleküler ağırlıklarına göre protein profilleri.

Elde edilen veriler sonucunda çalışılan deri salgısı örneklerinin tamamında 16 kDa ve 11 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin ortak olarak bulunduğu saptanmıştır. Aynı familya ve cinse ait iki tür (*P. bedriagae* ve *P. caralitanus*) ile aynı türün iki farklı alttürüne (*N. s. strauchii* ve *N. s. barani*) ait deri salgılarının

protein profillerine bakıldığında elde edilen sonuçlar çok yüksek oranda benzerlik göstermektedir, bu da tür/alttür/lerin filogenetik açıdan birbirlerine yakınlıklarını destekleyici niteliktedir. *Bufo bufo* deri ve parotoid bez salgısının protein profiline bakıldığında 30 kDa ve 16 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin çok yoğun miktarda bulunduğu belirlenmiştir. *Hyla orientalis* deri salgısının protein içeriğine bakıldığında ise 73 kDa, 63 kDa, 53 kDa ve 34 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin yoğun miktarda bulunduğu saptanmıştır. *Neurergus strauchii barani* ve *N. s. strauchii* deri salgılarının protein profillerinde 92 kDa, 50 kDa ve 11 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin yoğun miktarda bulunduğu belirlenmiştir. *Triturus ivanbureschi* deri salgısının protein profilinde 89 kDa, 68 kDa, 64 kDa, 54 kDa ve 20 kDa moleküler ağırlığındaki proteinlerin yoğun miktarda olduğu görülmüştür. *Bombina bombina* deri salgısının protein profiline bakıldığında ise moleküler ağırlığı 69 kDa olan protein fraksiyonunun yoğun olduğu ortaya çıkarılmıştır.

4.5. Antimikrobiyal Aktivite

Türlerin ham deri salgılarının antimikrobiyal (antibakteriyal, antifungal) aktiviteleri MIC metodu ile belirlenmiştir. Mikroorganizmaları inhibe eden minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC değerleri) Çizelge 4.5.1’de, minimum bakterisidal (MBC) ve fungisidal (MFC) değerleri Çizelge 4.5.2’de gösterilmiştir. Deri salgılarının MIC değerleri 1.95-250 µg/ml arasındadır.

Yapılan test sonucunda Kırmızılı Kurbağa, *Bombina bombina bombina* deri salgısı en yüksek antimikrobiyal etkiyi 7.8 µg/ml MIC değeri ile *E. faecalis*, *E. faecium* ve *C. albicans*’a gösterirken, en düşük etkiyi ise 125 µg/ml MIC değeri ile *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus*’a göstermiştir. Burda önemli bir husus olarak salgının *E. faecalis*, *C. albicans* *C. tropicalis* üzerine gösterdiği antimikrobiyal etki pozitif kontrollerle aynıdır.

Ağaç Kurbağası, *Hyla orientalis* deri salgısı en yüksek antimikrobiyal etkiyi 15.6 µg/ml MIC değeri ile *E. faecalis* ve *E. faecium*’a gösterirken, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* ve *S. typhimurium*’a herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Sigilli Kurbağa, *Bufo bufo* deri/parotoid bez salgısı en yüksek antimikrobiyal etkiyi 3.9 µg/ml MIC değeri ile *S.epidermidis*, *E. faecalis* ve *E. faecium* üzerinde gösterirken, *E. coli* O157:H7 üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Burada önemli olan, salgının *E. faecalis* üzerinde pozitif kontrolden daha yüksek, buna karşın *E. faecium*'da ise aynı oranda etki göstermesidir.

Levanten Bataklık Kurbağası, *Pelophylax bedriagae* deri salgısı en yüksek etkiyi *C. albicans*'a göstermiştir ki, bu etki pozitif kontrolün 4 katı yüksektir (MIC: 1.95 µg/ml). Bunun yanında 3.9 ve 7.8 µg/ml MIC değeri ile *E. faecalis* ve *C. tropicalis* üzerinde pozitif kontrolden daha yüksek, *E. faecium*'a ise aynı oranda etki göstermiştir (MIC: 3.9 µg/ml).

Anadolu Kurbağası, *Pelophylax caralitanus* en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 7.8 µg/ml MIC değeri ile *E. faecium* üzerinde göstermiştir.

Fazıla'nın Likya Semenderi, *Lyciasalamandra fazilae* deri salgısı en yüksek antimikrobiyal etkiyi 15.6 µg/ml MIC değeri ile *C. albicans*'a gösterirken en düşük aktiviteyi ise *B. cereus*'a göstermiştir (250 µg/ml).

Marmaris Kara Semenderi, *Lyciasalamandra flavimembris* deri salgısı en yüksek antimikrobiyal etkileri 15.6 µg/ml MIC değeri ile *E. faecalis* ve *E. faecium* üzerinde gösterirken, en düşük aktiviteyi ise *E. coli* ATCC 25922 üzerinde göstermiştir (125 µg/ml)

Pürtüklü Semender, *Triturus ivanbureschi* deri salgısı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 15.6 µg/ml MIC değeri ile *E. faecalis* ve *C. albicans*'a gösterirken, en düşük etki *S. aureus* (MIC: 250 µg/ml) üzerinde saptanmıştır. Salgının *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ve *C. tropicalis* üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkisi olmamıştır.

Anadolu Benekli Semenderi, *Neurergus strauchii strauchii* deri salgısı en yüksek etkileri 3.9 µg/ml MIC değeri ile *S.epidermidis*, *E. faecalis* ve *E. faecium* üzerinde göstermiştir. Etki, *E. faecalis* üzerinde pozitif kontrolden yüksekken *E. faecium* üzerinde ise pozitif kontrolle aynıdır. *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* ve *C. albicans* üzerinde etki görülmemiştir.

Baran'ın Anadolu Benekli Semenderi, *Neurergus strauchii barani* deri salgısı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 3.9 µg/ml MIC değeri ile *S.epidermidis* ve *E. faecium* üzerinde göstermiş, *E. coli* O157:H7, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* ve *C. tropicalis* üzerinde herhangi bir etki saptanmamıştır. Salgının *E. faecalis* ve *E. faecium* üzerindeki antimikrobiyal etkisi pozitif kontrol ile aynı bulunmuştur.

Çizelge 4.5.1. Ham deri salgıları ve standart mikrobiyal ajanların MIC değerleri

Mikroorganizmalar	Ham kurbağa/semender deri salgıları için MIC değerleri (µg/ml)											
	Bb	Ho	Bufo	Pb	Pc	Lfaz	Lf	Ti	Nss	Nsb	Amp	Flu
<i>E.coli</i> O157:H7 RSKK234	31.25	125	-	7.8	62.5	62.5	125	125	250	-	3.9	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	125	DYM	31.25	31.25	125	125	-	DYM	DYM	1.9	
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	125	125	62.5	15.6	31.25	62.5	62.5	250	62.5	250	3.9	
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	62.5	-	3.9	3.9	15.6	125	31.25	125	3.9	3.9	1.9	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	7.8	15.6	3.9	3.9	15.6	62.5	15.6	15.6	3.9	7.8	7.8	
<i>E. faecium</i> DSM 13590	7.8	15.6	3.9	3.9	7.8	31.25	15.6	31.25	3.9	3.9	3.9	
<i>K.pneumoniae</i> ATCC10031	62.5	-	125	31.25	62.5	125	125	-	-	-	15.6	
<i>S.typhimurium</i> CCM5445	62.5	-	250	31.25	62.5	62.5	62.5	125	-	-	3.9	
<i>B. cereus</i> ATCC 7064	62.5	250	62.5	62.5	62.5	250	62.5	125	31.25	125	15.6	
<i>C. albicans</i> ATCC 10239	7.8	31.25	250	1.95	31.25	15.6	31.25	15,6	-	250		7.8
<i>C. tropicalis</i> RSKK 2412	15.6	62.5	125	7.8	31.25	62.5	62.5	-	125	-		15.6

-: Etki yok, DYM: deneme yapılamamış mikroorganizma

Bb: *Bombina bombina*

Ho: *Hyla orientalis*

Bufo: *Bufo bufo*

Pb: *Pelophylax bedriagae*

Pc: *Pelophylax caralitanus*

Lfaz: *Lyciasalamandra fazilae*

Lf: *Lyciasalamandra flavimembris*

Ti: *Triturus ivanbureschi*

Nss: *Neurergus s. strauchii*

Nsb: *Neurergus s. barani*

Amp: Ampicillin

Flu: Flucytosine

Deri salgılarının minimum bakterisidal (MBC) ve minimum fungisidal (MFC) konsantrasyonları 3.9-250 µg/ml aralığında değişkenlik göstermiştir. En yüksek bakterisidal konsantrasyonun 7.8 µg/ml ile *Bufo bufo* deri salgısının *E. faecium* üzerine ve 7.8 µg/ml ile *Pelophylax bedriagae* deri salgısının *S. epidermidis* ve *E. faecium* üzerine olduğu belirlenmiştir. En yüksek fungisidal konsantrasyon ise 3.9 µg/ml ile *Pelophylax bedriagae* deri salgısının *C. albicans* üzerine etkisi olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.5.2. Ham deri salgılarının MBC ve MFC değerleri

Mikroorganizmalar	Deri Salgılarının MBC ve MFC (µg/ml) değerleri									
	Bb	Ho	Bufo	Pb	Pc	Lfaz	Lf	Ti	Nss	Nsb
<i>E. coli</i> O157:H7 RSKK 234	125	250	-	31.25	125	250	250	250	250	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	250	DYM	125	125	250	250	-	DYM	DYM
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	125	250	250	31.25	62.5	125	250	250	125	250
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	125	-	15.6	7.8	31.25	250	31.25	250	15.6	15.6
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	31.25	31.25	15.6	31.25	62.5	62.5	31.25	62.5	15.6	31.25
<i>E. faecium</i> DSM 13590	31.25	62.5	7.8	7.8	62.5	62.5	31.25	62.5	15.6	15.6
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	125	250	250	31.25	125	250	250	-	-	-
<i>S. typhimurium</i> CCM 5445	125	250	250	31.25	125	250	250	250	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 7064	125	250	250	125	62.5	250	250	250	125	250
<i>C. albicans</i> ATCC 10239	31.25	62.5	250	3.9	125	125	125	62.5	250	250
<i>C. tropicalis</i> RSKK 2412	15.6	125	250	15.6	125	250	250	125	250	-

-: Etki yok, DYM: deneme yapılamamış mikroorganizma

Bb: *Bombina bombina*

Ho: *Hyla orientalis*

Bufo: *Bufo bufo*

Pb: *Pelophylax bedriagae*

Pc: *Pelophylax caralitanus*

Lfaz: *Lyciasalamandra fazilae*

Lf: *Lyciasalamandra flavimembris*

Ti: *Triturus ivanbureschi*

Nss: *Neurergus s. strauchii*

Nsb: *Neurergus s. barani*

4.6. Sitotoksosite

Deri salgılarının hücre proliferasyonuna etkileri ve örneklerle muamele eden hücre hatlarının yüzde canlılıkları MTT testi ile belirlenmiştir. Gerçekleştirilen sitotoksosite testleri sonucunda deri salgılarının hücre hatları üzerine konsantrasyona bağlı olarak etki gösterdiği belirlenmiştir. Testlerde pozitif kontrol olarak parthenolide, negatif kontrol olarak örneklerin çözöldüğü ultra saf su kullanılmıştır. Hücrelerin %50'sini inhibe eden konsantrasyonlar (IC₅₀) Çizelge 4.6.1'de sunulmuştur.

Kırmızı Kurbağa, *Bombina bombina* ham deri salgısının en yüksek 4.47 µg/ml IC₅₀ değeri ile glioblastoma (U87MG) ve 4.80 µg/ml IC₅₀ değeri ile serviks (HeLa) kanser hücre hatları üzerinde etkili olduğı, en düşük sitotoksik etkiyi ise 47.20 µg/ml IC₅₀ değeri ile meme bezi kanser hücre hattı (MDA-MB-231) ve 45.94 µg/ml IC₅₀ değeri ile sağlıklı insan embriyonik böbrek hücrelerine (HEK-293) gösterdiği belirlenmiştir.

Ağaç Kurbağası, *Hyla orientalis* deri salgısı en yüksek sitotoksositeyi 1.03 µg/ml IC₅₀ değeri ile serviks kanser hücre hattı (HeLa) ve 1.38 µg/ml IC₅₀ değeri ile glioblastoma (U87MG) hücre hattı üzerinde göstermiştir. En düşük sitotoksik etkisi ise orta düzey kabul edilebilecek 32.97 µg/ml IC₅₀ değeri ile prostat kanser hücre hattı (PC-3) üzerine göstermiştir.

Siğilli Kurbağa, *Bufo bufo* deri/parotoid bez salgısı tüm hücre hatları üzerinde 0.35-6.02 µg/ml arasında değışen IC₅₀ değeri ile çok yüksek sitotoksosite göstermiştir.

Levanten Ova Kurbağası, *Pelophylax bedriagae* deri salgısı en yüksek sitotoksositeyi 4.71 µg/ml IC₅₀ değeri ile serviks (HeLa) ve 5.46 µg/ml IC₅₀ değeri ile akciğer kanser hücre hattına (A549) gösterirken, en düşük sitotoksositeyi ise orta dereceli olacak şekilde 26.43 µg/ml IC₅₀ değeri ile kolorektal (CaCo-2) ve 28.90 µg/ml IC₅₀ değeri ile meme bezi kanser hücre hattına (MDA-MB-231) göstermiştir.

Anadolu Kurbağası, *Pelophylax caralitanus* deri salgısı en yüksek sitotoksik etkiyi 2.54 µg/ml IC₅₀ değeri ile serviks kanser hücre hattına (HeLa), en düşük

etkiyi ise 46.20 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri ile sağlıklı insan embriyonik böbrek hücrelerine (HEK-293) göstermiştir.

Fazıla'nın Likya Semenderi, *Lyciasalamandra fazilae* deri salgısının sitotoksik etkilerine bakıldığında IC_{50} değerlerinin 44.30->50 $\mu\text{g/ml}$ arasında olduğu ve hücre hatları üzerine düşük sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Marmaris Kara Semenderi, *Lyciasalamandra flavimembris* deri salgısı sağlıklı embriyonik böbrek, (HEK-293) ile kolorektal (CaCo-2), serviks (HeLa) ve akciğer (A549) kanser hücre hatlarına sırasıyla 32.33, 35.87, 32.29 ve 32.71 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değerleri ile orta dereceli sitotoksik etki gösterirken, diğer kanser hücre hatlarına düşük etki göstermiştir.

Pürtüklü Semender, *Triturus ivanbureschi* deri salgısı en yüksek sitotoksik etkiyi 1.40 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri ile meme bezi kanser hücre hattına (MDA-MB-231), en düşük sitotoksik etkiyi ise serviks kanser hücre hattına (IC_{50} : 40.28 $\mu\text{g/ml}$) göstermiştir. Pankreas kanser hücre hattına (MPanc-96) 27.87 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri ile orta dereceli etki göstermiştir.

Anadolu Benekli Semenderi, *Neurergus strauchii strauchii* deri salgısı en yüksek sitotoksik etkiyi 2.97 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri ile kolorektal kanser hücre hattına (CaCo-2), en düşük sitotoksik etkiyi ise 38.95 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri ile orta dereceli olarak pankreas kanser hücre hattı (MPanc-96) üzerine göstermiştir.

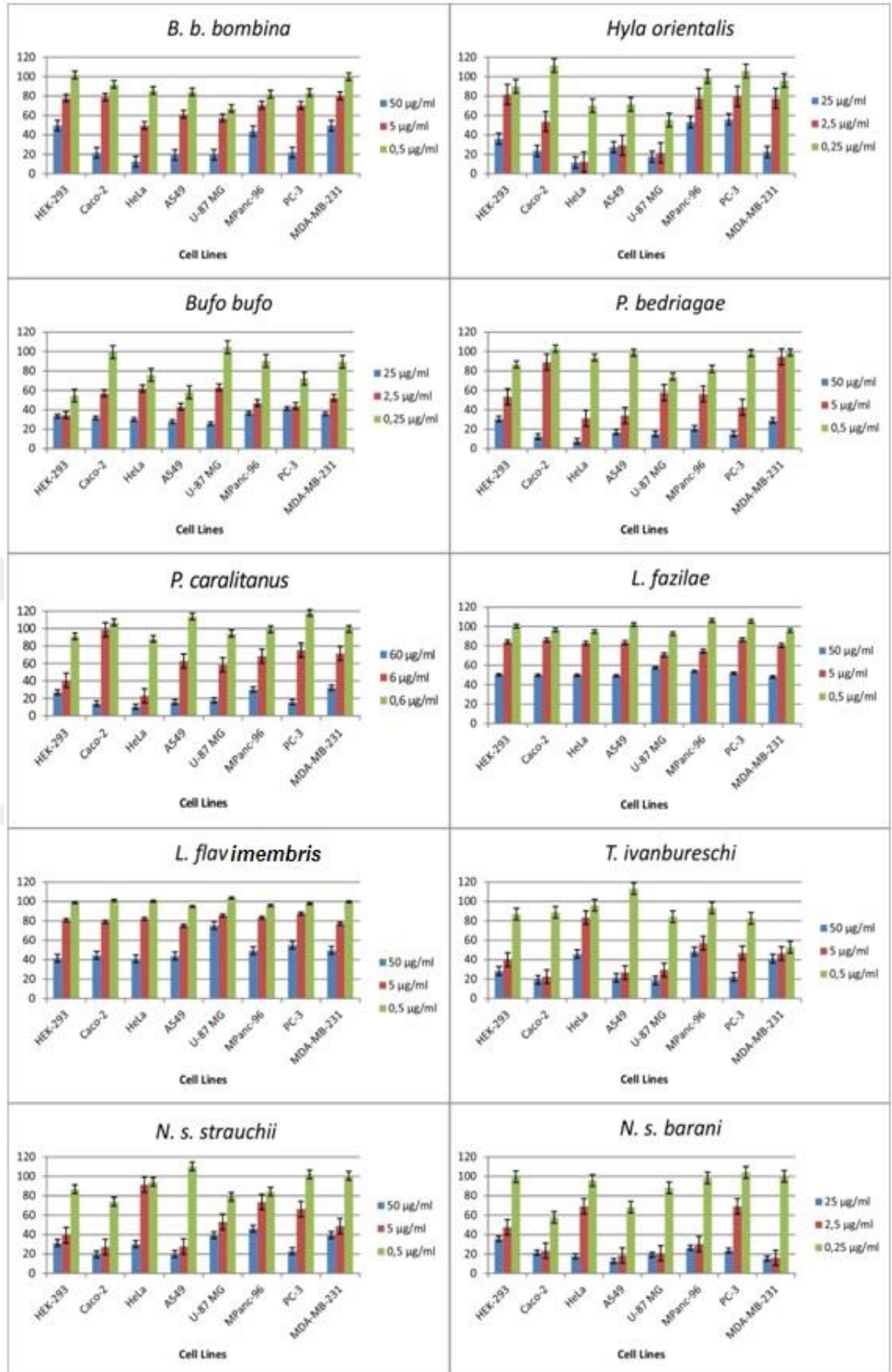
Baran'ın Anadolu Benekli Semenderi, *Neurergus strauchii barani* deri salgısı tüm hücre hatları üzerinde 1.43-6.84 $\mu\text{g/ml}$ arasındna değişen IC_{50} değerleri ile çok yüksek sitotoksiste göstermiştir.

Deri salgılarına maruz bırakılan hücre hatlarının 48 saat sonundaki konsantrasyona bağlı yüzde canlılık grafikleri Şekil 4.6.1'de verilmiştir. Sitotoksiste test sonuçlarına genel olarak bakıldığında dikkati çeken sonuçlar şu şekildedir. Ağaç Kurbağası, *Hyla orientalis* deri salgısının glioblastom kanser hücre hattı (U87MG) üzerine pozitif kontrol olan parthenolide'tan daha yüksek, serviks kanser hücre hattı (HeLa) üzerine pozitif kontrol ile neredeyse aynı sitotoksik etki göstermiştir. Pürtüklü Semender, *Triturus ivanbureschi* ve Baran'ın Anadolu Benekli Semenderi, *Neurergus strauchii barani* deri salgıları meme bezi kanser hücre hattı (MDA-MB-231) ve kolorektal adenokarsinom hücre hattı

(CaCo-2) üzerinde pozitif kontrol parthenolide'tan daha etkili bulunmuştur. Siğilli Kurbağa, *Bufo bufo* deri/parotoid bez salgısı sağlıklı embriyonik böbrek hücre hattı (HEK-293) üzerine pozitif kontrol olan parthenolide'tan daha yüksek, akciğer kanser hücre hattı (A549) üzerine pozitif kontrol ile neredeyse aynı derecede sitotoksik etki göstermiştir.

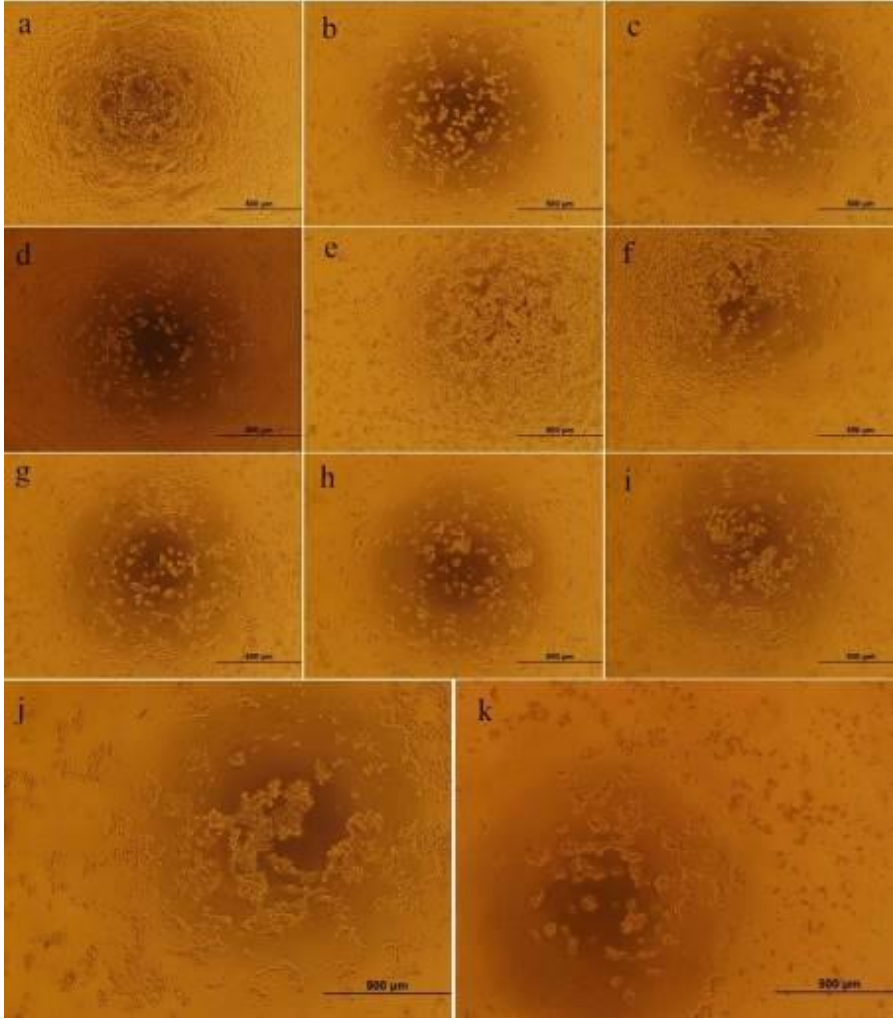
Çizelge 4.6.1. Kurbağa/semender deri salgılarına maruz bırakılan hücre hatlarının IC₅₀ değerleri (Parthenolide: Pozitif kontrol).

Hücre Hatları IC ₅₀ (µg/ml)	HEK-293 (embriyonik böbrek) sağlıklı	CaCo-2 (kolorektal)	HeLa (serviks)	A549 (akciğer)	U87MG (glioblastom)	MPanc-96 (pankreas)	PC-3 (prostat)	MDA- MB-231 (meme bezi)
Örnekler								
Parthenolide	0.55	1.65	0.98	0.26	3.33	0.91	1.24	2.78
<i>Bombina bombina</i>	45.94	15.68	4.80	8.02	4.47	16.69	11.51	47.20
<i>Hyla orientalis</i>	12.92	9.76	1.03	4.58	1.38	28.51	32.97	7.86
<i>Bufo bufo</i>	0.35	5.99	4.92	0.85	6.02	4.74	3.53	5.56
<i>Pelophylax bedriagae</i>	8.96	26.43	4.71	5.46	8.18	10.77	7.11	28.90
<i>Pelophylax caralitanus</i>	46.20	30.07	2.54	10.77	9.45	18.93	15.34	22.15
<i>Lyciasalamandra fazilae</i>	49.90	49.54	49.97	46.85	>50	55.83	>50	44.30
<i>Lyciasalamandra flavimembris</i>	32.33	35.87	32.29	32.71	>50	48.07	>50	46.10
<i>Triturus ivanbureschi</i>	5.02	5.60	40.28	11.27	6.58	27.87	5.01	1.40
<i>Neurergus s. strauchii</i>	5.38	2.97	27.06	6.94	11.69	38.95	12.06	12.94
<i>N. strauchii barani</i>	5.17	1.60	5.50	2.40	4.25	6.84	6.68	1.43

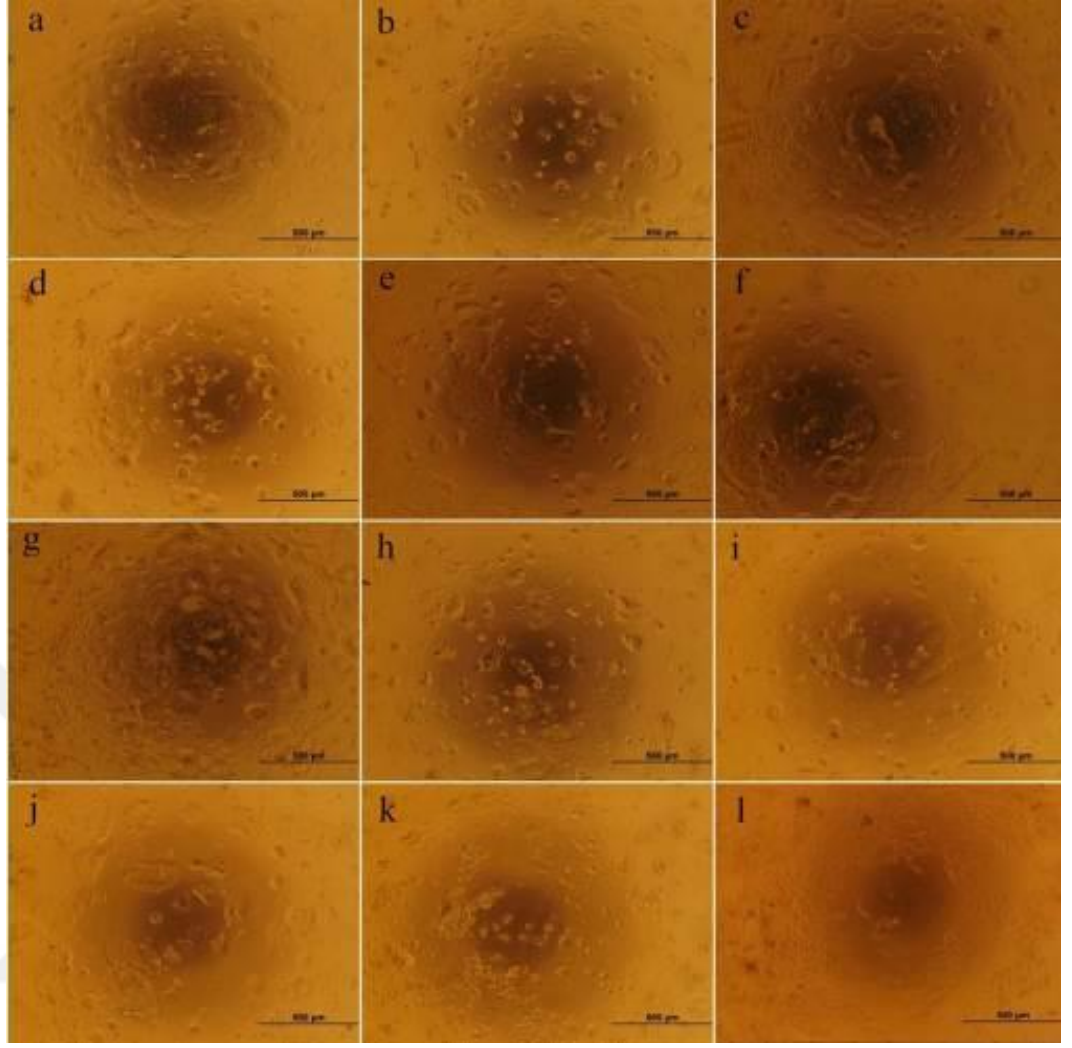


Şekil 4.6.1. Farklı konsantrasyonlarda kurbağa/semender deri salgıları uygulanan farklı hücre hatlarında 48 saat sonunda gözlenen canlılık oranları (%).

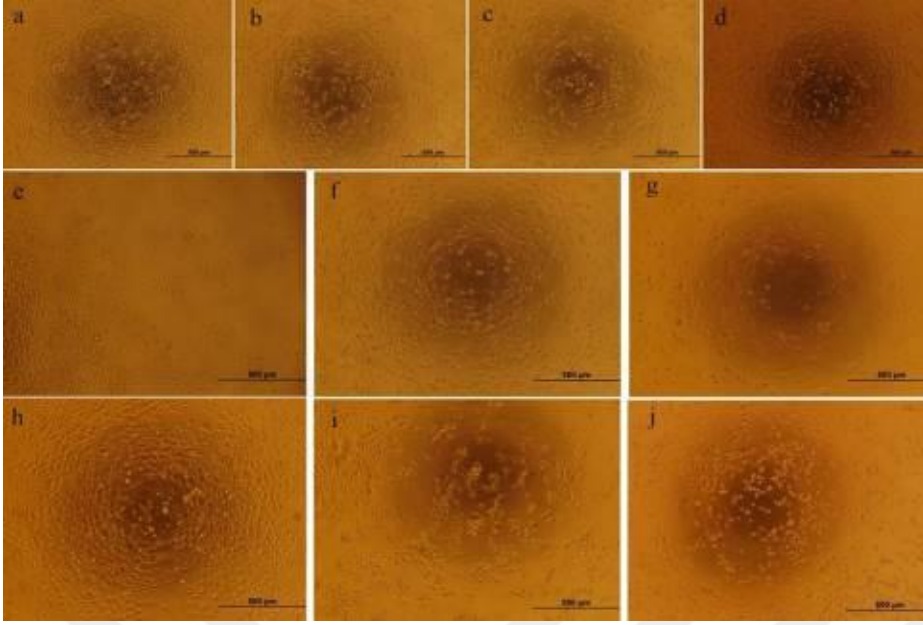
Morfolojik inceleme: Deri salgılarına maruz kalan hücre morfolojilerindeki değişim 48 saat sonunda inverted mikroskop ile incelenerek belirlenmiştir. Testin etkinliğini belirlemek amacıyla pozitif kontrol grubu olarak parthenolide, negatif kontrol grubu olarak deri salgılarının çözüldüğü steril ultra saf su uygulanmıştır. Hücre hatlarının 48. saatteki inverted mikroskop görüntüleri HEK-293 hücre hattı Şekil 4.6.2’de, CaCo-2 hücre hattı Şekil 4.6.3’te, HeLa hücre hattı Şekil 4.6.4’te, A549 hücre hattı Şekil 4.6.5’te, U87MG hücre hattı Şekil 4.6.6’da, MPanc-96 hücre hattı Şekil 4.6.7’de, PC-3 hücre hattı Şekil 4.6.8’de ve MDA-MB-231 hücre hattı Şekil 4.6.9’da verilmiştir. Elde edilen görüntüler sitotoksosite test sonuçlarını doğrulamaktadır.



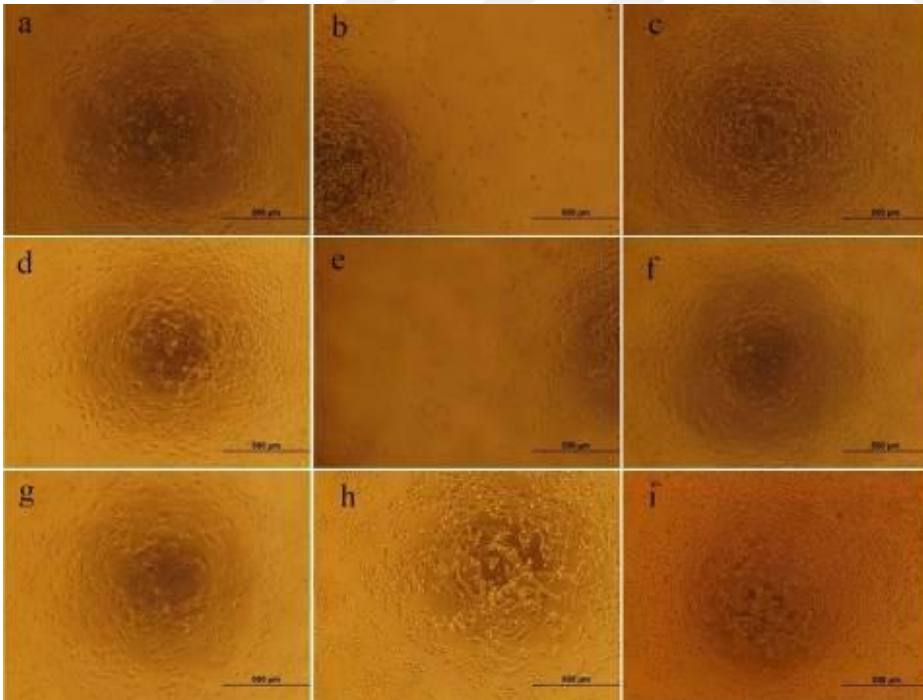
Şekil 4.6.2. HEK-293 hücre hattı, a- Kontrol, b- *L. flavimembris* (50 µg/ml), c- *L. fazilae* (50 µg/ml), d- *P. bedriagae* (50 µg/ml), e- *P. caralitanus* (60 µg/ml), f- *B. bombina* (50 µg/ml), g- *T. ivanbureschi* (50 µg/ml), h- *Bufo bufo* (0.25 µg/ml), i- *Hyla orientalis* (25 µg/ml), j- *N. strauchii* (50 µg/ml), k- Parthenolide (2.5 µg/ml).



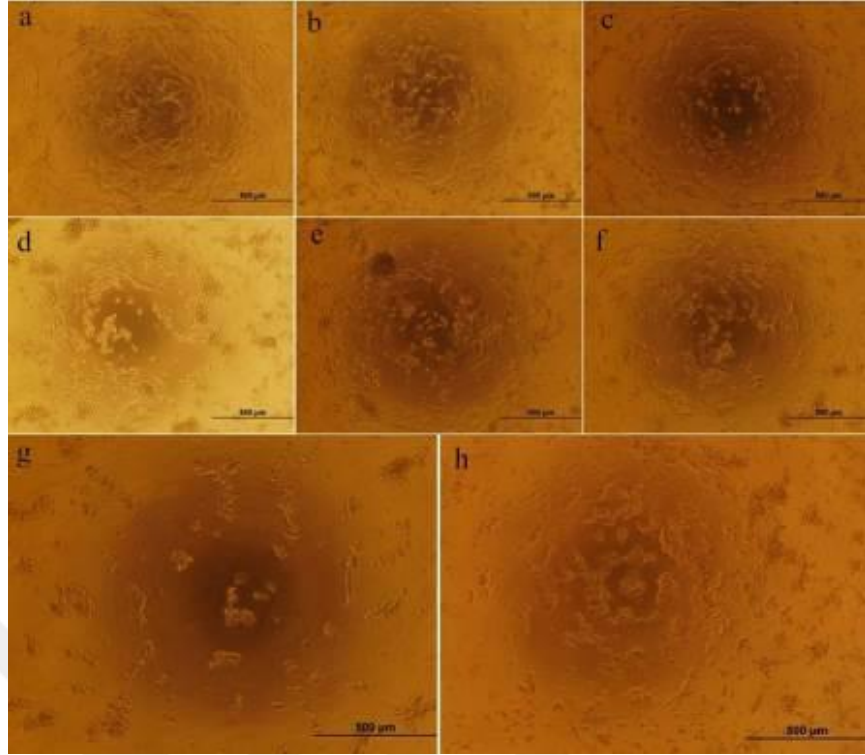
Şekil 4.6.3. CaCo-2 hücre hattı, a- Kontrol, b- *L. flavimembris* (50 µg/ml), c- *L. fazilae* (50 µg/ml), d- *B. bombina* (50 µg/ml), e- *P. caralitanus* (60 µg/ml), f- *T. ivanbureschi* (50 µg/ml), g- *N. s. strauchii* (50 µg/ml), h- *Bufo bufo* (2.5 µg/ml), i- *Pelophlax bedriagae* (50 µg/ml), j- *Hyla orientalis* (25 µg/ml), k- *N. s. barani* (2.5 µg/ml), l- Parthenolide (2.5 µg/ml).



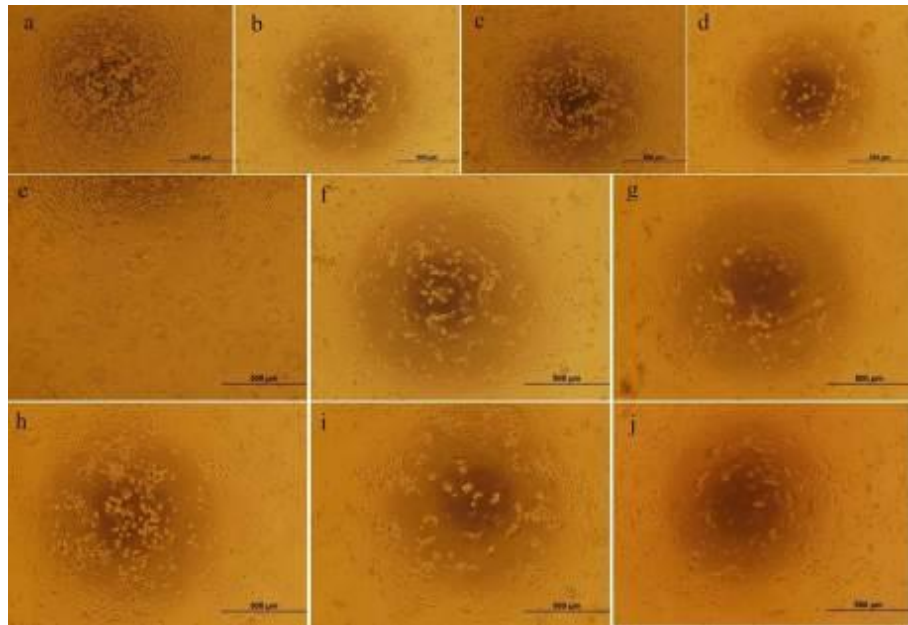
Şekil 4.6.4. HeLa hücre hattı, a- Kontrol, b- *L. flavimembris* (50 µg/ml), c- *L. fazilae* (50 µg/ml), d- *B. bombina* (50 µg/ml), e- *P. caralitanus* (60 µg/ml), f- *Bufo bufo* (25 µg/ml), g- *Pelophlax bedriagae* (50 µg/ml), h- *Hyla orientalis* (25 µg/ml), i- *T. ivanbureschi* (5 µg/ml), j- Parthenolide (2.5 µg/ml).



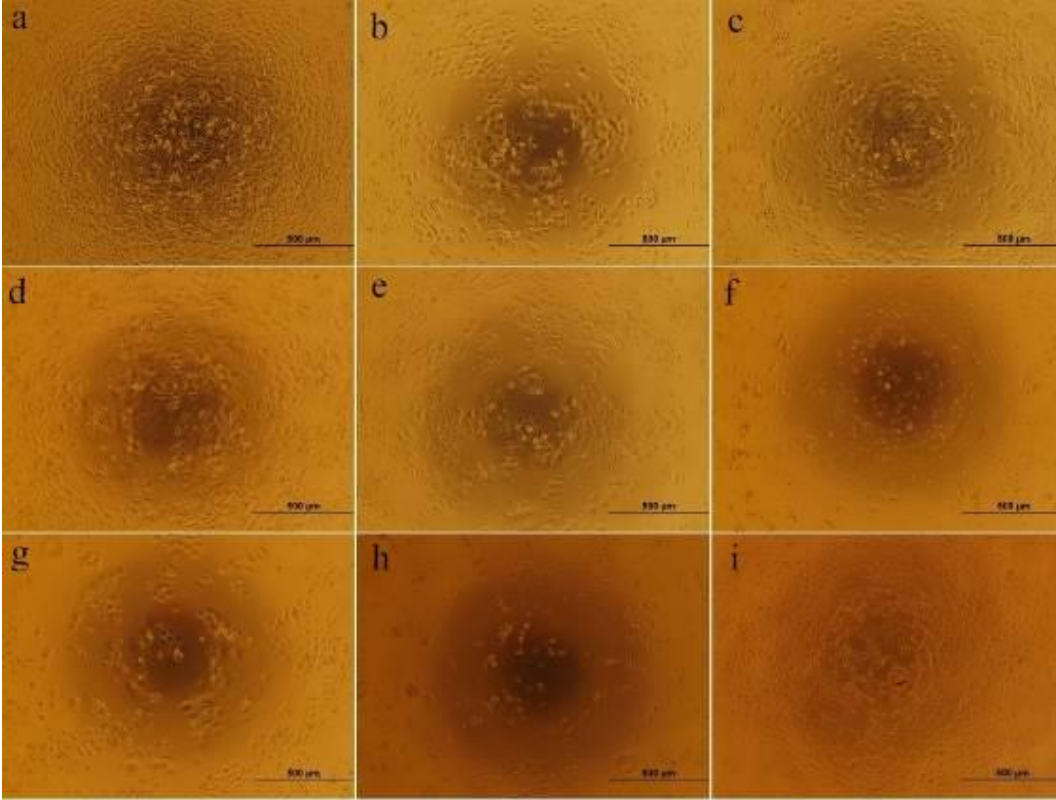
Şekil 4.6.5. A549 hücre hattı, a- Kontrol, b- *L. flavimembris* (50 µg/ml), c- *L. fazilae* (50 µg/ml), d- *B. bombina* (50 µg/ml), e- *H. orientalis* (25 µg/ml), f- *Bufo bufo* (25 µg/ml), g- *Pelophlax bedriagae* (50 µg/ml), h- *T. ivanbureschi* (5 µg/ml), i- Parthenolide (2.5 µg/ml).



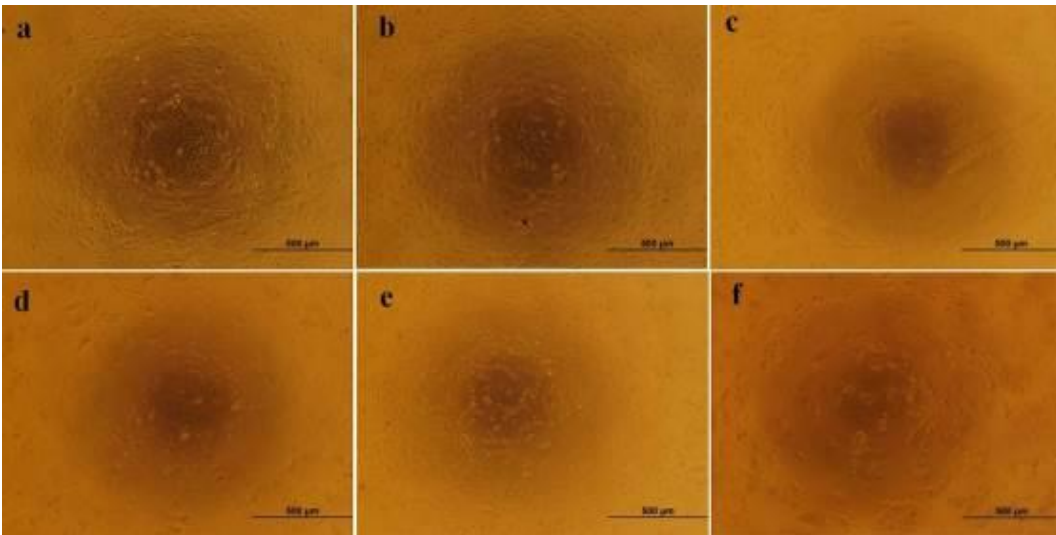
Şekil 4.6.6. U87MG hücre hattı, a- Kontrol, b- *L. fazilae* (50 µg/ml), c- *B. bombina*, d- *Bufo bufo* (2.5 µg/ml), e- *Pelophlax bedriagae* (50 µg/ml), f- *Hyla orientalis* (25 µg/ml), g- *N. strauchii* (50 µg/ml), h- Parthenolide (2.5 µg/ml).



Şekil 4.6.7. MPanc-96 hücre hattı, a- Kontrol, b- *L. flavimembris* (50 µg/ml), c- *L. fazilae* (50 µg/ml), d- *B. bombina* (50 µg/ml), e- *P. caralitanus* (60 µg/ml), f- *Bufo bufo* (2.5 µg/ml), g- *Pelophlax bedriagae* (50 µg/ml), h- *Hyla orientalis* (25 µg/ml), i- *N. strauchii* (5 µg/ml), j- Parthenolide (2.5 µg/ml).



Şekil 4.6.8. PC-3 hücre hattı, a- Kontrol, b- *L. flavimembris* (50 µg/ml), c- *L. fazilae* (50 µg/ml), d- *B. bombina* (50 µg/ml), e- *Bufo bufo* (2.5 µg/ml), f- *Pelophlax bedriagae* (50 µg/ml), g- *Hyla orientalis* (25 µg/ml), h- *T. ivanbureschi* (5 µg/ml), i- Parthenolide (2.5 µg/ml).



Şekil 4.6.9. MDA-MB-231 hücre hattı, a- Kontrol, b- *Bufo bufo* (25 µg/ml), c- *Pelophlax bedriagae* (50 µg/ml), d- *Hyla orientalis* (25 µg/ml), e- *N. strauchii* (5 µg/ml), f- Parthenolide (2.5 µg/ml)

4.7. Hemolitik Etki

Taksonlara ait deri salgıları ile tavşan kırmızı kan hücreleri (eritrositler) üzerinde yapılan hemolitik aktivite testinin sonuçları Çizelge 4.7.1’de sunulmuştur.

Test sonuçlarına göre, çalışılan türler arasından en yüksek hemolitik etkiyi Pürtüklü Semender, *Triturus ivanbureschi* deri salgısı göstermiştir. Türün 50 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyonlarda gösterdiği hemolitik etkinin (sırasıyla %115.1 ve %103.7), hemolitik etkisi %100 kabul edilen distile sudan yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Marmaris Kara Semenderi, *Lyciasalamandra flavimembris*, Fazıla’nın Likya Semenderi, *Lyciasalamandra fazilae* ve Siğilli Kurbağa, *Bufo bufo* türlerinin deri salgıları en yüksek konsantrasyonda dahi (50 µg/ml) herhangi bir hemolitik etki göstermemiştir.

Kırmızılı Kurbağa, *Bombina bombina bombina* deri salgısının hemolitik etkisi 50 µg/ml konsantrasyonda %19.5 ve 5 µg/ml konsantrasyonda %0.3 iken 0.5 µg/ml konsantrasyonda hemolitik aktivite göstermemiştir.

Ağaç Kurbağası, *Hyla orientalis*’in hemolitik etkisinin en yüksek konsantrasyonda %2 olduğu belirlenmiştir.

Levanten Bataklik Kurbağası, *Pelophylax bedriagae* türüne ait deri salgısının hemolitik etkisi %1-3.1 arasında değişmektedir.

Anadolu Kurbağası, *Pelophylax caralitanus* deri salgısının hemolitik etkisi 50 µg/ml konsantrasyonda %1.6 ve 5 µg/ml konsantrasyonda %0.3 iken 0.5 µg/ml konsantrasyonda hemolitik aktivite göstermemiştir.

Anadolu Benekli Semenderi, *Neurergus strauchii strauchii* deri salgısı 50 µg/ml konsantrasyonda %54.3 ve 5 µg/ml konsantrasyonda %0.8 hemolitik etki gösterirken 0.5 µg/ml konsantrasyonda herhangi bir hemolitik aktivitesinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Son olarak Baran’ın Anadolu Benekli Semenderi, *Neurergus strauchii barani* deri salgısının hemolitik aktivitesi 50 µg/ml konsantrasyonda %41.3 ve 5

$\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda %0.3 olarak belirlenmiş olup 0.5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda herhangi bir hemolitik aktivite saptanmamıştır.

Çizelge 4.7.1. Kurbağa/semender deri salgılarına maruz bırakılan tavşan kırmızı kan hücrelerinde tespit edilen hemolitik etkiler (Distile su: Pozitif kontrol, Fizyolojik su: Negatif kontrol, -: Etki yok, SD: Standart sapma).

Grup	Absorbans değeri ort.		SD	Hemolitik yüzde (%)		SD
Distile su	0.733	±	0.023	100.000	±	3.138
Fizyolojik su (FS)	0.128	±	0.012	0.000	±	1.637
Örnekler	Absorbans değeri ort. - FS ort.					
<i>P. bedriagae</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	0.023	±	0.018	3.138	±	2.456
<i>P. bedriagae</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	0.012	±	0.009	1.637	±	1.228
<i>P. bedriagae</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	0.007	±	0.001	0.955	±	0.136
<i>B. bombina</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	0.143	±	0.029	19.509	±	3.956
<i>B. bombina</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	0.002	±	0.001	0.273	±	0.136
<i>B. bombina</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>T. ivanbureschi</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	0.844	±	0.094	115.143	±	12.824
<i>T. ivanbureschi</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	0.76	±	0.086	103.683	±	11.733
<i>T. ivanbureschi</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	0.087	±	0.044	11.869	±	6.003
<i>H. orientalis</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	0.016	±	0.007	2.183	±	0.955
<i>H. orientalis</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>H. orientalis</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>P. caralitanus</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	0.012	±	0.002	1.637	±	0.273
<i>P. caralitanus</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	0.002	±	0.001	0.273	±	0.136
<i>P. caralitanus</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>N. s. strauchii</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	0.398	±	0.033	54.297	±	4.502
<i>N. s. strauchii</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	0.006	±	0.002	0.819	±	0.273
<i>N. s. strauchii</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>N. s. barani</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	0.303	±	0.019	41.337	±	2.592
<i>N. s. barani</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	0.002	±	0.001	0.273	±	0.136
<i>N. s. barani</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>L. flavimembris</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>L. flavimembris</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>L. flavimembris</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>L. fazilae</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>L. fazilae</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>L. fazilae</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>Bufo bufo</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>Bufo bufo</i> (5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	
<i>Bufo bufo</i> (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	<0	±		-	±	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğa, birçok hastalığın tedavisinde potansiyel olarak kullanılan biyoaktif bileşenlerin bulunduğu eşsiz bir kaynaktır. Doğal ürünlerle yapılan farklı açılımlardaki çalışmalarla keşfedilen yeni biyoaktif bileşenlerin sayısı da her geçen gün artmaktadır. Biyoaktiviteye sahip doğal bileşenlerin bilinen kaynakları arasında mikroorganizmalar, bitki, böcek, amfibi, sürüngen, kuş, memeli hayvan ve insan gibi hemen her tür canlı organizma bulunmaktadır (Hayashi et al., 2013).

Tüm ökaryot canlılar kalıtsal olarak aktarılan doğal savunma sistemlerine sahiptir. Bu doğal savunma mekanizmaları ile çevrede bulunan mikroorganizmalara karşı koruma sağlanır. Çok hücreli canlılar, mikroorganizmalar ile mücadele için korunmuş çok çeşitli antimikrobiyal peptidler (AMP) üretirler. AMP'ler evrimsel savunma silahları olarak kabul edilmektedirler (Nakatsuji and Gallo, 2012).

Hem hayvan, hem de bitkilerde bulunan AMP'ler yabancı patojenlere önceden maruz kalmaksızın, doğal olarak oluşan ve enfeksiyonlara direnç sağlayan, spesifik olmayan bağışıklık sisteminde; genetik olarak belirlenmiş olan çok önemli roller üstlenirler. AMP'ler, farklı aminoasit dizgeleri taşıyan çok hücreli organizmalarda bu organizmaların amfipatik konformasyon oluşturma yetenekleri uzantısında etkili savunma araçlarıdır. Bakteri membranlarını parçalama özelliği taşıyan AMP'ler ayrıca zarflı virüsler, funguslar, parazitler üzerinde de etkili olan, yani çok geniş spektrumlu potansiyel terapotik ajanlardır. Doğal mikrobiyal özellikleri, seçicilikleri, etki hızları ve bakteriyel direncin gelişimine olan düşük eğilimleri AMP'leri klinik araştırmalar için doğal aday yapmaktadır. Antimikrobiyal bileşenler olarak rol oynayan birçok doğal ürün halen incelenmeyi beklemektedir (Hayashi vd., 2013).

Sunulan tez çalışmasında, terapötik potansiyelleri olan yeni potansiyel biyoaktif maddelerin belirlenmesine fırsat tanınması açısından kurbağa deri salgılarının incelenmesi ve taranması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, 2012-2015 yılları arasında Türkiye genelinde gerçekleştirilen arazi çalışmaları sonucunda hedeflenen 10 farklı taksona ait deri salgısı örneği elde edilebilmiştir. Tezin saha

çalışmaları sırasında, tez kapsamında deri salgıları ile çalışılan Marmaris Kara Semenderinin Muğla'da birçok yeni lokalitesi tespit edilmiş ve rapor edilmiştir (Göçmen and Karış, 2017).

Tez projesi kapsamında çalışılan taksonların deri salgılarının biyoaktiviteleri ve protein profilleri ile ilgili literatürde çalışma yok denecek kadar azdır. Bu nedenle, tez çalışmasında sunulan verilerin sadece literatürdeki yakın cins ve familyalarla karşılaştırılması yapılabilmektedir.

Çalışılan kurbağa/semender deri salgıları arasında en yüksek total miktarı *Bufo bufo* (3100 µg/ml) deri salgısında, en düşük protein miktarı ise *L. fazilae* (500 µg/ml) deri salgısında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar biyoaktivite sonuçlarını da desteklemektedir.

Diğer önemli bir husus da suda yaşayan (akuatik) kurbağa/semender türlerine ait deri salgılarının biyoaktivitelerinin karasal yaşayan (terrestrial) semenderlere (Genus: *Lyciasalamandra*) göre daha yüksek olmasıdır. Akuatik kurbağa/semender türlerinin protein profillerinde belirlenen yüksek bant sayısı da bu durumu destekler niteliktedir. Çalışılan kurbağa/semender deri salgılarının protein profilleri incelendiğinde tüm örneklerde 16 kDa ve 11 kDa molekül ağırlığındaki protein bantlarının bulunduğu belirlenmiştir. Bu kapsamda birbirine yakın türlerde birbirine benzer protein/peptidlerin bulunabileceğini öngörmek evrimsel bakış açısıyla daha anlamlıdır. Çalışılan örnekler arasından bant sayısı en yüksek olan türlerin akuatik (sukul) kurbağa/semender türleri olduğu belirlenmiştir. Bu durum deri salgılarının biyoaktivite sonuçları ile uyum içindedir.

Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına bakıldığında streptomycin-, sulfisoxazole-, ve tetracycline-dirençli *E. coli* O157:H7 üzerine en etkili olan deri salgısının *Pelophylax bedriagae* (MIC: 7.8 µg/ml) olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda *P. bedriagae* deri salgısı *E. coli* O157:H7'ye karşı önemli antibakteriyel potansiyel göstermiştir. Patojenik olmayan *E. coli* üzerine *P. bedriagae* ve *P. caralitanus* deri salgıları eşit olmak suretiyle orta düzeyde etki etmiştir (MIC: 31.25 µg/ml).

Meticillin dirençli *S. aureus* üzerine en etkili olan deri salgısının yine *P. bedriagae*'ye ait olduğu saptanmıştır (MIC: 15.6 µg/ml). *S. epidermidis* üzerine 3.9 µg/ml MIC değeri ile *Bufo bufo*, *Pelophylax bedriagae*, *Neurergus s. strauchii* ve *Neurergus s. barani* deri salgıları yüksek antibakteriyel etki göstermiştir.

Vancomycin dirençli *E. faecalis* üzerine 3.9 µg/ml MIC değeri ile *Bufo bufo*, *Pelophylax bedriagae* ve *Neurergus s. strauchii* deri salgıları pozitif kontrol ampicillinden yüksek etki gösterirken, *Bombina bombina* ve *Neurergus s. barani* deri salgıları pozitif kontrol ampicillin ile aynı derecede etki etmiştir (MIC: 7.8 µg/ml). Sonuç olarak bu 4 deri salgısı örneği *E. faecalis*'e karşı önemli antibakteriyel potansiyel göstermiştir.

Yine vancomycin dirençli *E. faecium* üzerine en yüksek antimikrobiyal etki *Bufo bufo*, *Pelophylax bedriagae*, *Neurergus s. strauchii* ve *Neurergus s. barani* deri salgıları tarafından 3.9 µg/ml MIC değeri ile pozitif kontrol ampicillin ile aynı olarak saptanmıştır. Bu nedenle sözü geçen salgılar *E. faecium*'a karşı önemli antibakteriyel potansiyel göstermiştir.

K. pneumoniae ve *S. typhmuri* üzerine en yüksek antimikrobiyal etki *P. bedriagae* deri salgısı ile orta düzey olarak belirlenmiştir (MIC: 31.25 µg/ml). *B. cereus*'a karşı en etkin salgı *Neurergus s. strauchii* olduğu ve etkinin orta düzey olduğu görülmüştür (MIC: 31.25 µg/ml).

C. albicans'a karşı belirlenen en yüksek antifungal etki *P. bedriagae* deri salgısı ile gözlenmiştir. 1.95 µg/ml MIC değeri ile pozitif kontrol flucytosineden 4 kat fazla etki göstermiştir. Ayrıca, *B. bombina* deri salgısı da 7.8 µg/ml MIC değeri ile pozitif kontrol flucytosine ile aynı antifungal etkiyi göstermiştir.

C. tropicalis'e karşı belirlenen sonuçlar *C. albicans*'a benzer şekilde, en yüksek antifungal etki *P. bedriagae* deri salgısı ile gözlenmiştir. 7.8 µg/ml MIC değeri ile pozitif kontrol flucytosine'den 2 kat fazla etki göstermiştir. Ayrıca, *B. bombina* deri salgısı da 15.6 µg/ml MIC değeri ile pozitif kontrol flucytosine ile aynı antifungal etkiyi göstermiştir.

Sonuç olarak genel olarak bakıldığında en yüksek antimikrobiyal potansiyeli *P. bedriagae* deri salgısı göstermiştir. En potansiyel antibakteriyel etkiler *Bufo bufo*, *Pelophylax bedriagae*, *Neurergus s. strauchii* ve *Neurergus s. barani* deri salgılarında, antifungal etkiler *P. bedriagae* ve *B. bombina* deri salgısı ile belirlenmiştir.

Sitotoksikite sonuçlarına bakıldığında sağlıklı insan embriyonik böbrek (HEK-293) hücre hattı üzerine en düşük sitotoksik etkileri sırasıyla 49.90, 46.20 ve 45.94 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değerleri ile *Lyciasalamandra fazilae*, *Pelophylax caralitanus* ve *Bombina bombina* deri salgıları göstermiştir. En yüksek etkiyi ise 0.35 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri ile *Bufo bufo* deri-parotoid salgısı pozitif kontrol parthenolide'nin da üzerinde göstermiştir.

İnsan kolon kolorektal adenokarsinom hücre hattı (CaCo-2) üzerindeki en yüksek sitotoksik etkiyi pozitif kontrol parthenolide'tan yüksek olacak şekilde *N. strauchii barani* deri salgısı göstermiştir (IC_{50} : 1.60 $\mu\text{g/ml}$). Bu bağlamda *N. strauchii barani* deri salgısı kolon-kolorektal kanseri için yüksek terapötik potansiyel göstermiştir.

İnsan serviks kanser hücre hattı (HeLa) üzerine olan en yüksek sitotoksik etki *Hyla orientalis* deri salgısı ile neredeyse pozitif kontrol parthenolide ile aynı olacak düzeyde belirlenmiştir (IC_{50} : 1.03 $\mu\text{g/ml}$). Bu sonuçla *Hyla orientalis* deri salgısı serviks kanseri için yüksek terapötik potansiyel göstermiştir.

İnsan akciğer kanser hücre hattı (A549) üzerinde belirlenen en yüksek sitotoksik etki *Bufo bufo* deri-parotoid salgısı ile neredeyse pozitif kontrol parthenolide ile aynı olacak seviyede belirlenmiştir (IC_{50} : 0.85 $\mu\text{g/ml}$). Sonuç olarak *Bufo bufo* deri-parotoid salgısı akciğer kanseri için yüksek terapötik potansiyel göstermiştir.

Glioblastom kanser hücre hattı (U87MG) üzerine en yüksek sitotoksik etkiyi pozitif kontrol parthenolide'nin neredeyse 2 katı olacak şekilde *Hyla orientalis* deri salgısı göstermiştir (IC_{50} : 1.38 $\mu\text{g/ml}$). Bu düzeyde bir etki *Hyla orientalis* deri salgısının glioblastom kanseri için yüksek terapötik potansiyeli olduğunu göstermiştir.

Pankreas kanser hücre hattı (MPanc-96) üzerine en yüksek etkiler *Bufo bufo* ve *N. strauchii barani* deri salgıları ile saptanmıştır (sırasıyla IC₅₀: 4.74 ve 6.84 µg/ml). Prostat kanser hücre hattı (PC-3)'na en etkin deri salgılarının 3.53 ve 5.01 IC₅₀ değerleri ile *Bufo bufo* ve *Triturus ivanbureschi*'ye ait olduğu belirlenmiştir.

Son olarak meme bezi kanser hücre hattı (MDA-MB-231) üzerine sitotoksik etkisinin en yüksek olan deri salgılarının *Triturus ivanbureschi* ve *N. strauchii barani*'ye ait olduğu ortaya konmuştur (sırasıyla IC₅₀: 1.40 ve 1.43 µg/ml). Bu etkilerin pozitif kontrol parthenolide'tan daha yüksek olduğu göz önüne alındığında bu iki deri salgısının meme kanseri için yüksek terapötik potansiyel gösterdiği söylenebilir.

Sitotoksikite sonuçlarının geneline bakıldığında terapötik potansiyeli en yüksek olan deri salgılarının *Bufo bufo*, *Hyla orientalis*, *Triturus ivanbureschi* ve *N. strauchii barani*'ye ait olduğu belirlenmiştir.

Bu alanda yapılan çalışmalarla karşılaştırma ve tartışma yapılacak olunursa; Dülger et al. (2007) yapmış oldukları çalışmada, *Hyla arborea* (= *Hyla orientalis*) deri salgısının birçok mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon metodu ile belirlemeye çalışmışlardır. Yapılan test sonucuna salgının bakteriler üzerinde yüksek antibakteriyal etkiye sahip olduklarını fakat mayalar üzerinde herhangi bir antifungal etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda *Hyla orientalis* deri salgısı ile yaptığımız antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda diğer çalışmaya paralel olarak bakteriler üzerinde yüksek antibakteriyal etki gözlenmesinin yanında, *Candida albicans* (MIC= 31.25 µg/ml) ve *Candida tropicalis* (MIC= 62.5 µg/ml) kültürleri üzerinde de yüksek antifungal etkiler belirlenmiştir.

Filho et al. (2005) *Bufo rubescens* deri salgısından izole ettikleri kardiyak glikozitler olan telcinobufagin ve marinobufagin moleküllerinin Gram (-) *E. coli* ve Gram (+) *S. aureus* üzerindeki antibakteriyal aktivitesini belirlemişlerdir. Telcinobufagin ve marinobufagin'in MIC değeri *S. aureus* kültürü üzerinde her iki molekül için de 128 µg/ml iken *E. coli* kültürü üzerinde MIC değerleri sırasıyla 64 µg/ml ve 16 µg/ml olarak saptanmıştır. *Bufo bufo* deri/parotoid salgısı ile gerçekleştirdiğimiz antimikrobiyal aktivite denemeleri sonucunda elde edilen MIC

değerlerine bakıldığında *S. aureus* için saptanan MIC değeri 62.5 µg/ml olarak adı geçen literatürde kaydedilene çok yakındır.

Sciani et al. (2013) Bufonidae familyasından *Rhinella* cinsine ait 7 türün deri salgılarının insan meme bezi adenokarsinoma hücre hattı (MDA-MB-231) üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişler ve türlere ait salgıların IC₅₀ değerlerini 40-50 µg/ml arasında saptamışlardır. Çalışmamızda *Bufo bufo* deri/parotoid salgısının MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin çok daha yüksek olduğu (IC₅₀= 5.56 µg/ml) belirlenmiştir.

van Zoggel et al. (2012) Hylidae familyasından *Phyllomedusa bicolor* deri salgısından izole ettikleri dermaseptin peptidlerinin insan prostat adenokarsinoma (PC-3) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin 10 µg/ml konsantrasyonda %75 olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda *Hyla orientalis* deri salgısının aynı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin 25 µg/ml konsantrasyonda %55 olduğu ve IC₅₀ değerinin 32.97 µg/ml olduğu saptanmıştır.

Wang et al. (2013) Ranidae familyasından *Rana chensinensis* deri salgısından izole edilen temporin peptidinin 80 µM konsantrasyonda MDA-MB-231 hücre hattını %60 inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise aynı familyadan iki türün (*Pelophylax bedriagae* ve *P. caralitanus*) deri salgılarının MDA-MB-231 hücre hattına sitotoksik etkisinin daha düşük konsantrasyonlarda daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *P. bedriagae* 50 µg/ml konsantrasyonda hücrelerin %70'ini inhibe ederken, *P. caralitanus* aynı oranda inhibisyonu 60 µg/ml konsantrasyonda gerçekleştirmiştir. Her iki salgının hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 28.90 µg/ml ve 37.25 µg/ml olduğu ortaya konmuştur.

Yun et al. (2009) *Bufo gargarizans* türünün deri ve parotoid bez salgılarının (Chan'su) insan akciğer karsinoma (A549) üzerindeki inhibe edici etkisinin 5 µg/ml'de %60 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada *Bufo bufo* deri ve parotoid salgılarının A549 hücre hattı üzerinde aynı oranda inhibe edici etkiyi 2.5 µg/ml konsantrasyonda gösterdiği belirlenmiştir (IC₅₀= 0.85 µg/ml).

Asoodeh et al. (2004) *Pelophylax ridibundus* deri salgısından izole ettikleri ridibundin peptidinin antimikrobiyal ve hemolitik etkilerini araştırmışlardır. 5 µg

peptidin yüksek antimikrobiyal etki gösterdiğini, ayrıca 50 µg/ml peptidin koyun eritrositleri üzerinde yalnızca %1 hemolitik aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada çok yakın türler olan *P. bedriagae* ve *P. caralitanus* deri salgılarının tavşan eritrositleri üzerindeki hemolitik etkisinin 50 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla %3 ve %1 olduğu saptanmıştır. Ayrıca her iki türde yüksek antimikrobiyal etki göstermişlerdir.

Zare-Zardini et al. (2013) *Bufo kavirensis* türünün deri salgısından saflaştırdıkları maximin peptidinin antimikrobiyal ve hemolitik etkilerini belirlemişlerdir. Maximin peptidinin MIC değerlerini *B. cereus* (18.5 µg/ml), *S. aureus* (16.3 µg/ml), *K. pneumoniae* (8.9 µg/ml), *E. coli* (8.1 µg/ml), *C. albicans* (32.1 µg/ml) olarak belirlemişlerdir. İnsan kan eritrositleri üzerinde yaptıkları hemolitik aktivite denemeleri sonucunda da maximin'in 60 µg/ml konsantrasyonda %2.5 hemolitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada *Bufo bufo* deri/parotoid salgılarının aynı mikroorganizmalar üzerindeki MIC değerleri sırası ile *B. cereus* (62.5 µg/ml), *S. aureus* (62.5 µg/ml), *K. pneumoniae* (125 µg/ml), *E. coli* (125 µg/ml), *C. albicans* (125 µg/ml) olarak saptanmıştır. Gerçekleştirilen hemolitik aktivite testleri sonucunda *Bufo bufo* salgısının tavşan eritrositleri üzerinde 50 µg/ml konsantrasyonda dahi herhangi bir hemolitik etki göstermediği ortaya konmuştur.

Basir et al. (2000) *Rana palustris* deri salgısından izole ettikleri brevinin, esculentin, ranaturin, palustrin ve temporin peptidlerinin antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. *E. coli* üzerine 1-120 µM, *S. aureus* üzerine 4-70 µM, *C. albicans* üzerine 6-150 µM konsantrasyon aralığında etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada aynı familyadan türler olarak *P. bedriagae* deri salgısı *E. coli* üzerine 7.8-31.25 µg/ml aralığında, *S. aureus* üzerine 15.6 µg/ml, *C. albicans* üzerine 1.95 µg/ml konsantrasyonda inhibe etmiştir. *P. caralitanus* deri salgısı ise *E. coli* üzerine 31.25-62.5 µg/ml aralığında, *S. aureus* üzerine 31.25 µg/ml, *C. albicans* üzerine 31.25 µg/ml konsantrasyonda etki göstermiştir.

Giri et al. (2009) *Bufo melanostictus* deri salgısından izole edilen antineoplastik faktörün HCT-116 kolon kanser hücre hattı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 10 µg/ml antineoplastik faktör varlığında hücrelerin %40'ının

inhibe olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada ise CaCo-2 kolon kanser hücre hattında aynı oranda inhibisyon 2.5 µg/ml *Bufo bufo* deri salgısı varlığında belirlenmiştir.

Lai et al. (2002) *Bombina maxima* deri salgısından izole ettikleri maximin peptidlerinin antimikrobiyal etkisini *E. coli* üzerinde 0.9-19.5 µg/ml, *S. aureus* üzerinde 2.7-19.5 µg/ml, *Bacillus* sp. üzerinde 0.9-19.5 µg/ml, *K. pneumoniae* üzerine 3.1-15 µg/ml, *C. albicans* üzerinde 1.2-15 µg/ml arasında belirlemişlerdir. Bu çalışmada yakın tür *B. bombina* deri salgısının antimikrobiyal etkileri *E. coli* üzerinde 125 µg/ml, *S. aureus* üzerinde 125 µg/ml, *Bacillus* sp. üzerinde 62.5 µg/ml, *K. pneumoniae* üzerinde 62.5 µg/ml, *C. albicans* üzerinde 7.8 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Won et al. (2004) *Rana esculenta* deri salgısından saflaştırdıkları esculentin ve brevinin peptidlerinin antimikrobiyal aktivitelerini *E. coli* ve *K. pneumoniae* üzerinde 12.5->200 µg/ml, *S. typhimurium* üzerinde 25->200, *C. albicans* üzerinde 100->200 µg/ml arasında, 10 µg/ml peptidin insan eritrositleri üzerindeki hemolitik etkilerini %0.01-25.8 arasında belirlemişlerdir. Bu çalışmada yakın türlerden *P. bedriagae* deri salgısı *E. coli* üzerine 7.8 µg/ml, *K. pneumoniae* üzerinde 31.25 µg/ml, *S. typhimurium* üzerinde 31.25 µg/ml, *C. albicans* üzerinde 1.95 µg/ml antimikrobiyal etki göstermiş ve tavşan eritrositleri üzerinde %0.95-3.14 arasında hemolitik etki göstermiştir. *P. caralitanus* deri salgısı ise *E. coli* üzerine 31.25 µg/ml, *K. pneumoniae* üzerinde 62.5 µg/ml, *S. typhimurium* üzerinde 62.5 µg/ml, *C. albicans* üzerinde 31.25 µg/ml konsantrasyonlarda antimikrobiyal etki göstermiş ve tavşan eritrositleri üzerinde %0-1.64 arasında hemolitik etki göstermiştir.

Conlon et al. (2017) *Rana italica* deri salgısından izole edilen brevinin ve temporin peptidlerinin letal konsantrasyonlarını A549 hücre hattı üzerinde 18 µM, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 8 µM ve HT-29 hücre hattı üzerinde 18 µM olarak belirlemişlerdir. Peptidlerin fare eritrositleri üzerindeki letal konsantrasyonunun ise 7 µM olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, aynı familyadan olan iki türün (*P. bedriagae* ve *P. caralitanus*) deri salgılarının sitotoksik etkileri sırasıyla A549 (IC₅₀= 5.46 ve 10.77 µg/ml), MDA-MB-231

(IC₅₀= 28.90 ve 22.15 µg/ml) ve yakın hücre hattı olan CaCo-2 (IC₅₀= 26.43 ve 30.07 µg/ml) hücre hatları için belirlenmiştir. Hemolitik etki en yüksek konsantrasyonda (50 µg/ml) %1-3 arasına tespit edilmiştir.

Guo et al. (2012) *Andrias davidianus* deri salgısının protein profilini icelediklerinde 14-66 kDa arası ve daha üzeri protein fraksiyonların bulunduğunu belirlemişlerdir. Çalışılan en yakın türler olan *T. ivanbureschi*, *Neurergus strauchii barani* ve *N. s. strauchii* deri salgılarının protein profilleri 9-272 kDa arasında tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen karşılaştırmalar da ülkemizde yaşayan kurbağa/semender deri salgılarının terapötik potansiyellerini desteklemekte ve ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, ülkemizde yayılış gösteren 10 farklı kurbağa/semender taksonuna ait deri salgılarının ilk kez protein miktar ve profilleri belirlenmiştir. Ayrıca bu deri salgılarının mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivite, sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksosite ve tavşan kırmızı kan hücreleri üzerindeki hemolitik etkileri gibi biyolojik parametreleri ilk kez ortaya konmuştur. Neticede, kurbağa/semender deri salgılarının terapötik açıdan yadsınamayacak bir doğal biyolojik kaynak potansiyeline sahip olduğu ve bu alandaki çalışmaların ilerletilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

6. ÖNERİLER

Antibiyotiklere dirençli bakterilerle mücadele ve yeni potansiyel antibiyotiklerin üretilmesinde kurbağa/semender deri salgıları gibi yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip protein/peptidleri içeren doğal kaynakların alternatif olabileceği düşünülmektedir. Antimikrobiyal peptidler konusunda elde edilecek bilgiler, gelecekte AMP'lerin klinik uygulamalar veya tedavide daha fazla yer almasına olanak sağlayacaktır. Bu çalışmalar, yakın zamanda yararlı terapötik araçlar olarak gösterilen özel molekülleri seçmenin temelini oluşturmaktadırlar. Bu tez çalışması sonucunda kurbağa deri salgılarında yeni moleküllerin bulunmasına yönelik potansiyel türler belirlenmiştir. Ülkemizde bu türlerle ilgili mevcut çalışmaların çok sınırlı olmasından dolayı sunulan tezin potansiyel yeni peptidlerin bulunmasına rehberlik edecek çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu tezde sunulan verilerin, ülkemizdeki kurbağa ve semender deri salgılarının içeriklerinin belirlenmesinde sağlayacağı önemli katkılarla, biyoteknolojik ürün oluşturma yönünde sonraki çalışmalar için altyapı oluşturacağı beklenmektedir.

İleride bu alanda gerçekleştirilecek olan çalışmalarda terapötik potansiyeli yüksek olarak belirlenen türlere ait deri salgılarının içerdiği biyoaktif moleküllerin saflaştırılması ve karakterizasyonuna odaklanılmalıdır. Ayrıca, deri salgılarının içerdiği bu biyoaktif bileşenlerin antimikrobiyal ve sitotoksik ajanlar olarak etki mekanizmalarının da ortaya koyulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abraham, P., George, S. and Kumar, K.S.**, 2014, Novel antibacterial peptides from the skin secretion of the Indian bicoloured frog *Clinotarsus curtipes*, *Biochimie*, 97: 144-151 pp.
- Afsar, B., Afsar, M. and Kalyoncu, M.**, 2002, Antimicrobial activity in the skin secretion of Brown Frog, *Rana macrocnemis* (Boulenger, 1885) collected from Turkey, *Scientific Research and Essays*, 6(5): 1001-1004 pp.
- Asoodeh, A., Naderi-Manesh, H., Mirshahi, M. and Ranjbar, B.**, 2004, Purification and characterization of an antibacterial, antifungal and non hemolytic peptide from *Rana ridibunda*, *Journal of Sciences Islamic Republic of Iran*, 15(4): 303-309 pp.
- Bahar, A.A. and Ren, D.**, 2013, Antimicrobial peptides, *Pharmaceuticals*, 6: 1543-1575 pp.
- Baltzer, S.A. and Brown, M.H.**, 2011, Antimicrobial peptides - promising alternatives to conventional antibiotics, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20: 228-235 pp.
- Basir, Y.J., Knoop, F.C., Dulka, J. and Conlon, J.M.**, 2000, Multiple antimicrobial peptides and peptides related to bradykinin and neuromedin N isolated from skin secretions of the pickerel frog, *Rana palustris*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543: 95-105 pp.
- Brand, G.D., Santos, R.C., Arake, L.M., Silva, V.G., Veras, L.M.C., Costa, V., Costa, C.H.N., Kuckelhaus, S.S., Alexandre, J.G., Feio, M.J. and Leite, J.R.S.A.**, 2013, The skin secretion of the amphibian *Phyllomedusa nordestina*: A source of antimicrobial and antiprotozoal peptides, *Molecules*, 18: 7058-7070 pp.
- Brodgen, K.A.**, 2005, Antimicrobial peptides: pore forms or metabolic inhibitors in bacteria, *Natura Reviews/Microbiology*, 3: 239-250 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brodgen, K.A., Ackermann, M., McCray, P.B. and Tack, B.F.**, 2003, Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 465-478 pp.
- Budak, A. ve Göçmen, B.**, 2014, Herpetoloji (Herpetology). 3. Baskı (3rd edition). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No. 194, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 230s.
- Bulet, P., Cociancich, S., Dimarca, J.L., Lambert, J., Reichhart, J.M., Hoffman, D., Hetru, C. and Hoffman, J.A.**, 1997, Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family, *The Journal of Biological Chemistry*, 266(36): 25420-25425 pp.
- Bulet, P., Dimarcq, J.L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Dorsselaer, A.V. and Hoffmann, J.A.**, 1993, A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an o-glycosylated substitution, *The Journal of Biological Chemistry*, 268(20): 14893-14897 pp.
- Cardoso, M.H., Cobacho, N.M., Cherobim, M.D., Pinto, M.F.S., dosSantos, C., Maximiano, M.R., deBarros, E.G., Dias, S.C. and Franco, L.**, 2014, Insights into the antimicrobial activities of unusual antimicrobial peptide families from amphibian skin, *Journal of Clinical Toxicology*, 4(3): 205 pp.
- Chen, T., Zhou, M., Chen, W., Lorimer, J., Rao, P., Walker, B. and Shaw, C.**, 2006, Cloning from tissue surrogates: Antimicrobial peptide (esculentin) cDNAs from the defensive skin secretions of chinese ranid frogs, *Genomics*, 87: 638-644 pp.
- Clarke, B.T.**, 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications, *Biological Reviews*, 72: 365-379 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute)**, 2009, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement*. CLSI Document M100-S19. National Committee for Clinical Standards, Wayne, PA.
- Conceição, K., Konno, K., Richardson, M., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Daffre, S., Camargo, A.C.M. and Pimenta, D.C.**, 2006, Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*, *Peptides*, 27: 3092-3099 pp.
- Conlon, J.M., Musale, V., Attoub, S., Mangoni, M.L., Leprince, J., Coquet, L., Jouenne, T., Abdel-Wahab, Y.H.A., Flatt, P.R. and Rinaldi, A.C.**, 2017, Cytotoxic peptides with insulin-releasing activities from skin secretions of the Italian stream frog *Rana italica* (Ranidae), *Journal of Peptide Science*, 23: 769-776 pp.
- Conlon, J.M., Sonnevend, A., Patel, M., Davidson, C., Nielsen, P.F., Pal, T. and Rollins-Smith, L.A.**, 2003, Isolation of peptides of the brevinin-1 family with potent candidacidal activity from the skin secretions of the frog *Rana boylii*, *The Journal of Peptide Research*, 62: 207-213 pp.
- Conlon, J.M., Woodhams, D.C., Raza, H., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H. and Rollins-Smith, L.A.**, 2007, Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the Lemur Leaf Frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae), *Toxicon*, 50: 498-506 pp.
- Çevikbaş, A.**, 1978, Antibacterial activity in the skin secretion of the frog *Rana ridibunda*, *Toxicon*, 16: 195-197 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Doyle, J., Brinkworth, C.S., Wegener, K.L., Carver, J.A., Llewellyn, L.E., Olver, I.N., Bowie, J.H., Wabnitz, P.A. and Tyler, M.J.,** 2003, nNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications, *European Journal of Biochemistry*, 270: 1141-1153 pp.
- Dülger, B., Tok, C.V., Kaya, S. and Sevinç, M.,** 2007, Antimicrobial activity in the skin secretion of *Hyla arborea* (Linnaeus, 1758), *Russian Journal of Herpetology*, 14(2): 117-120 pp.
- Dülger, B., Uğurtaş, İ.H. and Sevinç, M.,** 2004, Antimicrobial activity in the skin secretion of *Bufo viridis* (Laurenti, 1768). *Asiatic Herpetological Research*, 10: 161-163 pp.
- Ferreira, P.M., Lima, D.J., Debiasi, B.W., Soares, B.M., Machado, K.C, Noronha, J.C., Rodrigues, D.J., Sinhorin, A.P., Pessoa, C. and Vieira, G.M.,** 2013, Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from southern Amazon, *Toxicon*, 72: 43-51 pp.
- Filho, G.A.C., Schwartz, C.A., Resck, I.S., Murta, M.M., Lemos, S.S., Castro, M.S., Kyaw, C., Pires, O.R., Leite, J.R.S., Bloch, C. and Schwartz, E.F.,** 2005, Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*, *Toxicon*, 45: 777-782 pp.
- Fredericks, L.P. and Dankert, J.R.,** 2000, Antibacterial and hemolytic activity of the skin of the terrestrial salamander, *Plethodon cinereus*, *Journal of Experimental Zoology*, 287: 340-345 pp.
- Ganz, T. and Lehrer, R.I.,** 1999, Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications, *Molecular Medicine Today*, 5: 292-297 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ghavami, S., Asoodeh, A., Klonisch, T., Halayko, A.J., Kadkhoda, K., Krocak, T.J., Gibson, S.B., Booy, E.P., Naderi-Manesh, H. and Los, M.,** 2008, Brevinin-2R¹ semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(3): 1005-1022 pp.
- Giri, B., Gomes, A., Sengupta, R., Banerjee, S., Nautiyal, J., Sarkar, F.H. and Majumdar, A.P.N.,** 2009, Curcumin synergizes the growth inhibitory properties of Indian Toad (*Bufo melanostictus* Schneider) skin-derived factor (BM-ANF1) in HCT-116 colon cancer cells, *Anticancer Research*, 29: 395-402 pp.
- Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A.K., Dasgupta, S.C. and Giri, B.,** 2010, Anticancer potential of animal venoms and toxins, *Indian Journal of Experimental Biology*, 48: 93-103 pp.
- Gomes, A., Giri, B., Saha, A., Mishra, R., Dasgupta, S.C., Debnath, A. and Gomes, A.,** 2007, Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development, *Indian Journal of Experimental Biology*, 45: 579-593 pp.
- Göçmen, B. and Karış, M.,** 2017, Comparative study on the endangered Marmaris Lycian Salamander populations, *Lyciasalamandra flavimembris* (Mutz & Steinfartz, 1995) (Caudata: Salamandridae), with the description of several new localities, *North-Western Journal of Zoology*, 13(1): 49-57 pp.
- Graham, C., Irvine, A.E., McClean, S., Richter, S.C., Flatt, P.R. and Shaw, C.,** 2005, Peptide Tyrosine Arginine, a potent immunomodulatory peptide isolated and structurally characterized from the skin secretions of the Dusky Gopher frog, *Rana sevosia*, *Peptides*, 26: 737-743 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Graham, C., Richter, S.C., McClean, S., O’Kane, E., Flatt, P.R. and Shaw, C.**, 2006, Histamine-releasing and antimicrobial peptides from the skin secretions of the Dusky Gopher frog, *Rana sevosia*, *Peptides*, 27: 1313-1319 pp.
- Guo, W., Ao, M., Li, W., Wang, J., Yu, L.**, 2012, Major biological activities of the skin secretion of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67: 86-92 pp.
- Hancock, R.E.**, 1997, The bacterial outer membrane as a drug barrier, *Trends in Microbiology*, 5: 37-42 pp.
- Hancock, R.E.**, 2001, Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *The Lancet Infectious Diseases*, 1: 156-164 pp.
- Hayashi, M.A., Bizerra, F.C. and Da Silva, P.I.** 2012; Antimicrobial compounds from natural sources, *Frontiers in Microbiology*, 4: 195 pp.
- He, W., Feng, F. Huang, Y., Guo, H., Zhang, S., Li, Z., Liu, J., Wang, Y. and Yu, H.**, 2012, Host defense peptides in skin secretions of *Odorrana tiannanensis*: proof for other survival strategy of the frog than merely anti-microbial, *Biochimie*, 94: 649-655 pp.
- Hoskin, D.W. and Ramamoorthy, A.**, 2008, Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(2): 357-375 pp.
- Huang, L., Chen, D., Wang, L., Lin, C., Ma, C., Xi, X., Chen, T., Shaw, C. and Zhou, M.**, 2017, Dermaseptin-PH: A novel peptide with antimicrobial and anticancer activities from the skin secretion of the South American Orange-legged Leaf Frog, *Pithecopus (Phyllomedusa) hypochondrialis*, *Molecules*, 22: 1805.
- Kamysz, W., Okroj, M. and Lukasiak, J.**, 2003, Novel properties of antimicrobial peptides, *Acta Biochimica Polonica*, 50, 461-469 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karış, M., Göçmen, B. and Mermer, A.,** 2015. Taxonomical and biological comparison of two Luschan's Lycian salamander, *Lyciasalamandra luschani* (Steindachner, 1891) (Urodela: Salamandridae) populations from southwestern Anatolia, *South-Western Journal of Horticulture, Biology and Environment*, 6(2): 107-136 pp.
- Kim, S.S., Shim, M.S., Chung, J., Lim, D-Y. and Lee, B.J.,** 2007, Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretion of *Rana dybowskii*. *Peptides*, 28: 1532-1539 pp.
- Kückelhaus, S., Leite, J.R.S.A., Neves, M.P., Frota, K.S., Abdala, L.F., Muniz-Junqueira, M.I., Bloch, C. and Tosta, C.E.,** 2007, Toxicity evaluation to mice of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia), *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 13(3): 423-429 pp.
- Laemmli, U.K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685 pp.
- Lai, R., Zheng, Y-T., Shen, J-H., Liu, G-J., Liu, H., Lee, W-H., Tang, S-Z. and Zhang, Y.,** 2002, Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese Red Belly Toad *Bombina maxima*, *Peptides*, 23: 427-435 pp.
- Lehrer, R.I. and Ganz, T.,** 1999, Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence, *Current Opinion in Immunology*, 11: 23-27 pp.
- Lehrer, R.I., Ganz, T. and Selsted, M.E.,** 1991, Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells, *Cell*, 64: 229-230 pp.
- Li, J., Xu, X., Xu, C., Zhou, W., Zhang, K., Yu, H., Zhang, Y., Zheng, Y., Rees, H.H., Lai, R., Yang, D. and Wu, J.,** 2007, Anti-infection peptidomics of amphibian skin, *Molecular & Cellular Proteomics*, 6: 882-894 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liberio, M.S., Joanitti, G.A., Azevedo, R.B., Cilli, E.M., Zanotta, L.C., Nascimento, A.C., Sousa, M.V., Pires, O.R., Fontes, W. and Castro, M.S.,** 2011, Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. *Amino Acids*, 40: 51-59 pp.
- Lin, Y., Hu, N., Lyu, P., Ma, J., Wang, L., Zhou, M., Guo, S., Chen, T. and Shaw, C.,** 2014, Hyalaranins: prototypes of a new class of amphibian antimicrobial peptide from the skin secretion of the oriental broad-folded frog, *Hylarana latouchii*, *Amino Acids*, 46(4): 901-909 pp.
- Liu, J., Jiang, J., Wu, Z., Xie, F.** 2012, Antimicrobial peptides from the skin of the Asian frog, *Odorrana jingdongensis*: de novo sequencing and analysis of tandem mass spectrometry data, *Journal of Proteomics*, 75: 5807-5821 pp.
- Liu, J., Wu, Q., Li, L., Xi, X., Wu, D., Zhou, M., Chen, T., Shaw, C. and Wang, L.,** 2017, Discovery of phylloseptins that defense against gram-positive bacteria and inhibit the proliferation of the non-small cell lung cancer cell line, from the skin secretions of *Phyllomedusa* frogs, *Molecules*, 22: 1428.
- Lu, Y., Li, J., Yu, H., Xu, X., Liang, J., Tian, Y., Ma, D., Lin, G., Huang, G. and Lai, R.,** 2006, Two families of antimicrobial peptides with multiple functions from skin of rufous-spotted torrent frog, *Amolops loloensis*, *Peptides*, 27: 3085-3091 pp.
- Mangoni, M.L., Rinaldi, A.C., Giulio, A.D., Mignogna, G., Bozzi, A., Barra, D. and Simmaco, M.,** 2000, Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin, *European Journal of Biochemistry*, 267: 1447-1454 pp.
- Matsuzaki, K.,** 1999, Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 1-10.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mor, A. and Nicolas, P.**, 1994, Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin, *European Journal of Biochemistry*, 219: 145-154 pp.
- Mor, A., Nguyen, V.H., Delfour, A., Migliore-Samour, D. and Nicolas, P.**, 1991, Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin, *Biochemistry*, 30: 8824-8830 pp.
- Mosmann, T.**, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63 pp.
- Nakatsuji, T. and Gallo, R.L.**, 2012, Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas, *Journal of Investigative Dermatology*, 132: 887-895 pp.
- Nalbantsoy, A., Karış, M., Yalçın, H.T. and Göçmen, B.**, 2016, Biological activities of skin and parotoid gland secretions of bufonid toads (*Bufo bufo*, *Bufo verrucosissimus* and *Bufo variabilis*) from Turkey, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 80: 298-303 pp.
- Nascimento, A.C.C., Zanotta, L.C., Kyaw, C.M., Schwartz, E.N.F., Schwartz, C.A., Sebben, A., Sousa, M.V., Fontes, W. and Castro, M.S.**, 2004, Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the south American frog, *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae), *The Protein Journal*, 23(8): 501-508 pp.
- Nelson, J., Donnelly M., Walker, B., Gray, J., Shaw, C. and Murphy, R.F.**, 1991, Bombesin stimulates proliferation of human breast cancer cells in culture, *Brithish Journal of Cancer*, 63: 933-936 pp.
- Pukala, T.L., Bowie, J.H., Maselli, V.M., Musgrave, I.F. and Tyler, M.J.**, 2006, Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity, *Natural Product Reports*, 23: 368-393 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reshmy, V., Preeji, V., Parvin, A., Santhoshkumar, K. and George, S.,** 2011, Three novel antimicrobial peptides from the skin of the Indian bronzed frog *Hylarana temporalis* (Anura: Ranidae), *Journal of Peptide Science*, 17: 342-347 pp.
- Rozek, T., Wegener, K.L., Bowie, J.H., Olver, I.N., Carver, C.A., Wallace, J.C. and Tyler, M.J.,** 2000, The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*, *European Journal of Biochemistry*, 267: 5330-5341 pp.
- Salzet, M.,** 2002., Antimicrobial peptides are signaling molecules, *Trends in Immunology*, 23(6): 283-284 pp.
- Schwartz, E.F., Schwartz, C.A. and Sebben, A.,** 1998, Occurrence of hemolytic activity in the skin secretion of the caecilian *Siphonops paulensis*, *Natural Toxins*, 6: 179-182 pp.
- Schwarz, T.,** 2012, Immunology. Dermatology. (3rd edition). Ed. Bologna, J.L., Jorizzo, J.L., Schaffer, J.V. China: Elsevier Limited.
- Sciani, J.M., de-Sa-Junior, P.L., Ferreira, A.K., Pereira, A., Antoniazzi, M.M., Jared, C. and Pimenta, D.C.,** 2013, Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 40: 264-273 pp.
- Seo, M.D., Won, H.S., Kim, J.H., Mishig-Ochir, T. and Lee, B.J.,** 2012, Antimicrobial peptides for therapeutic applications, *Molecules*, 17: 12276-1228 pp.
- Siano, A., Gatti, P.I., Imaz, M.S., Zerbini, E., Simonetta, A.C., Lajmanovich, R. and Tonarelli, G.G.,** 2014, A comparative study of the biological activity of skin and granular gland secretions of *Leptodactylus latrans* and *Hypsiboas pulchellus* from Argentina, *Records of Natural Products*, 8(2): 126-135 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. and Bossa, F., 2004,** Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*, *The Journal of Biological Chemistry*, 269(16): 11956-11961 pp.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M.L. and Barra, D., 1996,** Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*, *European Journal of Biochemistry*, 242: 788-792 pp.
- Sousa, J.C., Berto, R.F., Gois, E.A., Fontenele-Cardi, N.C., Honorio, J.E., Konno, K., Richardson, M., Rocha, M.F., Camargo, A.A., Pimenta, D.C., Cardi, B.A. and Carvalho, K.M., 2009,** Leptoglycin: A new Glycine/Leucine-rich antimicrobial peptide isolated from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylidae), *Toxicon*, 54(1): 23-32 pp.
- Spande, T.F., Garrafo, H.M., Edwards, M.W., Yeh, H.J.C., Panel, L. and Daly, J.W., 1992,** Epibatidine: a novel (Chloropyridyl) azabicycloheptane with potent analgesic activity from an Ecuadorian poison frog, *Journal of the American Chemical Society*, 114(9): 3475-3478 pp.
- Steinborner, S.T., Currie, G.J., Bowie, J.H., Wallace, J.C. and Tyler, M.J., 1998,** New antibiotic caerin 1 peptides from the skin secretion of the Australian tree frog *Litoria chloris*. Comparison of the activities of the caerin 1 peptides from the Genus *Litoria*, *Journal of Peptide Research*, 51: 121-126 pp.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H. and Boman, H.G., 1981,** Sequence and specificity of two antimicrobial proteins involved in insect immunity, *Nature*, 292: 246-248 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tempone, A.G., Melhem, M.S.C., Prado, F.O., Motoie, G., Hiramoto, R.M., Antoniazzi, M.M., Haddad, C.F.B. and Jared, C.,** 2007, Amphibian secretions for drug discovery studies: A search for new antiparasitic and antifungal compounds, *Letters in Drug Design & Discovery*, 4: 67-73 pp.
- Tsuruda, K., Arakawa, O., Kawatsu, K., Hamano, Y., Takatani, T. and Noguchi, T.,** 2002, Secretory glands of tetrodotoxin in the skin of the Japanese Newt *Cynops pyrrhogaster*, *Toxicon*, 40: 131-136 pp.
- Türkiye Kurbağa ve Sürüngenleri Gözlemciliği ve Fotoğrafçılığı Topluluğu,** “Anura ve Urodela”, <http://www.turkherptil.org> (Erişim tarihi: 2017).
- Tyler, M.J., Stone, D.J.M. and Bowie, J.H.,** 1992, A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 28: 199-200 pp.
- VanCompernelle, S.E., Taylor, R.J., Oswald-Richter, K., Jiang, J., Youree, B.E., Bowie, J.H., Tyler, M.J., Conlon, J.M., Wade, D., Aiken, C., Dermody, T.S., KewalRamani, V.N., Rollins-Smith, L.A. and Unutmaz, D.,** 2005, Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells, *Journal of Virology*, 79(18): 11598-11606 pp.
- vanZoggel, H., Hamma-Kourbali, Y., Galanth, C., Ladram, A., Nicolas, P., Courty, J., Amiche, M. and Delbe, J.,** 2012, Antitumor and angiostatic peptides from frog skin secretions, *Amino Acids*, 42(1): 385-395 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Veith, M. Göçmen, B., Sotiropoulos, K., Kieren, S, Godmann, O. and Steinfartz, S.,** 2016, Seven at one blow: the origin of major lineages of the viviparous Lycian salamanders (*Lyciasalamandra* Veith and Steinfartz, 2004) was triggered by a single paleo-historic event, *Amphibia-Reptilia*, 37: 373-387 pp.
- Vizioli, J. and Salzet, M.,** 2002, Antimicrobial peptides from Animals: Focus on Invertebrates, *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(11): 494-496 pp.
- Wang, C., Tian, L-L., Li, S., Li, H-B., Zhou, Y., Wang, H., Yang, Q-Z., Ma, L-J. and Shang, D-J.,** 2013, Rapid cytotoxicity of antimicrobial peptide tempoprin-1CEa in breast cancer cells through membrane destruction and intracellular calcium mechanism, *Plos One*, 8(4): 1-12 pp.
- Wang, L., Zhou, M., McClelland, A., Reilly, A., Chen, T., Gagliardo, R., Walker, B. and Shaw, C.,** 2008, Novel dermaseptin, adenoregulin and caerin homologs from the Central American red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas*, revealed by functional peptidomics of defensive skin secretion, *Biochimie*, 90(10): 1435-1441 pp.
- Wei, S., Chi, T., Meng, A., Chen, C., An, T., Wang, M. and Zhang, Y.,** 2013, Characteristics of hemolytic activity induced by skin secretions of the frog *Kaloula pulchra hainana*, *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19: 9 pp.
- Wiliams, A.J.F., Gallup, J.M., Romero, R.R., Brodgen, K.A. and Ackermann, M.R.,** 2002, Increasing anionic peptide distribution and intensity during progression and resolution of bacterial pneumonia, *Clinical and Diaonostic Laboratory Immunology*, 9(1): 28-32 pp.
- Won, H-S., Kim, S.S., Jung, S-J., Son, W-S., Lee, B. and Lee, B-J.,** 2004, Structure-activity relationships of antimicrobial peptides from the skin of *Rana esculenta* inhabiting in Korea, *Molecules and Cells*, 17(3): 469-476 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xi, X., Li, R., Jiang, Y., Lin, Y., Wu, Y., Zhou, M., Xu, J., Wang, L., Chen, T. and Shaw, C.,** 2013, Medusins: a new class of antimicrobial peptides from the skin secretions of phyllomedusine frogs, *Biochimie*, 95(6): 1288-1296 pp.
- Xu, X. and Lai, R.,** 2015, The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions, *Chemical Reviews*, 115: 1760-1846 pp.
- Yang, Z.G., Suna, H.X. and Fang, W.H.,** 2005, Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice, *Vaccine*, 23: 5196-5203 pp.
- Yiğit, N.,** 2003, Örümcek zehirlerinin antimikrobiyal aktivitesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(3):1-9 pp.
- Yun, H.R., Yoo, H.S. Shin, D.Y., Hong, S.H., Kim, J-H., Cho, C.K. and Choi, Y.H.,** 2009, Apoptosis induction of human lung carcinoma cells by Chan Su (*Venenum Bufonis*) through activation of caspases, *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 2(3): 210-217 pp.
- Zare-Zardini, H., Ebrahimi, L., Ejtehad, M.M., Hashemi, A., Azam, A.G., Atefi, A. and Soleimanizadeh, M.,** 2013, Purification and characterization of one novel cationic antimicrobial peptide from skin secretion of *Bufo kavirensis*, *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(4): 416-424 pp.
- Zasloff, M.,** 1987, A class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84: 5449-5453 pp.
- Zhang, R., Zhou, M., Wang, L., McGrath, S., Chen, T., Chen, X. and Shaw, C.,** 2010, Phylloseptin-1 (PSN-1) from *Phyllomedusa sauvagei* skin secretion: a novel broad-spectrum antimicrobial peptide with antibiofilm activity, *Molecular Immunology*, 47: 2030-2037 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhou, C., Wang, Z., Peng, X., Liu, Y., Lin, Y., Zhang, Z., Qiu, Y., Jin, M., Wang, R. and Kong, D., 2017, Discovery of two bombinin peptides with antimicrobial and anticancer activities from the skin secretion of Oriental fire- bellied toad, *Bombina orientalis*, *Chemical Biology & Drug Design*, doi: 10.1111/cbdd.13055 (in press).

Zhou, J., McClean, S., Thompson, A., Zhang, Y., Shaw, C., Rao, P. and Bjourson, A.J., 2006, Purification and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretion of *Hylarana guentheri*, *Peptides*, 27: 3077-3084 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Mert KARIŞ, 14.11.1987 tarihinde Antakya (Hatay)'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı şehirde tamamladı. 2010 yılında Ege Üni. Fen Fak. Biyoloji bölümü Zooloji Anabilim Dalı'ndan mezun oldu. Şubat-2011'de Ege Üni Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji Bilimdalı'nda başladığı Yüksek Lisans öğrenimini Ağustos-2012'de 18 ayda tamamladı. Şubat-2013'te Doktora eğitimine aynı anabilim dalında başladı. Science Citation Index (SCI ve SCI-E) tarafından taranan hakemli dergilerde 8 adet, Zoological Record başta olmak üzere diğer indekslerce taranan hakemli dergilerde 16 adet olmak üzere toplam 24 uluslararası bilimsel makale, 1'i ulusal 8'i uluslararası olmak üzere toplam 9 sözlü/poster bildirisi bulunmakta olup yayınlanma aşamasında ve devam eden çalışmaları da mevcuttur. Ayrıca 114Z599 ve 114Z946 nolu TÜBİTAK projelerinde doktora bursiyeri olarak çalışmıştır. 3 adet ulusal biyolojik çeşitlilik envanter ve izleme projesinde çift yaşar-amfibi uzmanı olarak çalışmaktadır. 2 adet Ege Üni. BAP, 1 adet EBİLTEM ve 4 adet uluslararası (MBZ) projesinde araştırmacı olarak çalışmış/çalışmaktadır. Son olarak TRT Belgesel ekibiyle çekilecek olan Anadolu Engereği ana temalı belgeselde uzman/danışman olarak görev yapmaktadır.