

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**ÜLKEMİZDE YAŞAYAN RANA CİNSİNE DAHİL
(*R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. holtzi*, *R. tavasensis*)
KURBAĞA TÜRLERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL
PEPTİDLERİN BAZI İNSAN PATOJENLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ebru TANRIVERDİ O

Danışman: Prof. Dr. Dinçer AYZ

Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Doktora Programı

İzmir
2024

EBRU TANRIVERDİ O tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Ülkemizde Yaşayan Rana Cinsine Dahil (*R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. holtzi*, *R. tavaensis*) Kurbağa Türlerindeki Antimikrobiyal Peptidlerin Bazı İnsan Patojenleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22/02/2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Dinçer AYZ

Raportör Üye: Prof. Dr. Kerim ÇİÇEK

Üye : Prof.Dr Yusuf KUMLUTAŞ

Üye : Prof. Dr. Murat AFSAR

Üye : Doç. Dr. Esra AKAT ÇÖMDEN

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Ülkemizde Yaşayan Rana Cinsine Dahil (*R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. holtzi*, *R. tavasensis*) Kurbağa Türlerindeki Anti-mikrobiyal Peptidlerin Bazı İnsan Patojenleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” 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.

22/02 /2024

Ebru TANRIVERDİ O

ÖZET**Ülkemizde Yaşayan *Rana* Cinsine Dahil (*R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. holtzi*, *R. tavasensis*) Kurbağa Türlerindeki Antimikrobiyal Peptidlerin Bazı İnsan Patojenleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

TANRIVERDİ O, Ebru

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dinçer AYZAZ

Şubat 2024, 68

Kurbağa deri salgısı, antimikrobiyal peptitler (AMP) bakımından oldukça zengin bir kaynaktır. AMP'ler kurbağalarda deri yoluyla vücuda giren patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturan moleküllerdir ve doğal bağışıklığın önemli elemanlarıdır. AMP'ler farklı familyalar, cinsler, türler ve hatta alttürlerde bile farklılık gösteren türe özgü peptitler olarak bilinmektedir. Ribozomlarda sentezlenen bu peptitler ≤ 5 kDa olup geniş spektrumlu mikrobisidal aktiviteye sahip moleküllerdir. AMP'lerin sahip oldukları mekanizmaların fiziksel doğası mikroorganizmanın bu peptite karşı direnç geliştirmesini önler. Dolayısıyla bu peptitler potansiyel olarak terapötik ajanlar olarak kabul edilirler. Kurbağa derisindeki AMP'lerin ekspresyonundaki çarpıcı varyasyonlar, terapötik savunmanın az olduğu spesifik mikroorganizmaları hedef alan yeni moleküler ve yapısal motifleri keşfetmek için kullanılabilir.

Bu çalışmada ülkemizde yayılış gösteren *Rana* cinsine ait *Rana dalmatina*, *Rana macrocnemis*, *Rana tavasensis* ve *Rana holtzi* deri salgılarındaki protein profilleri Tricine SDS Page elektroforezi ile belirlenmiştir. Ayrıca *Eshericha coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus* bakterileri üzerindeki plaka çukur yöntemi kullanılarak inhibisyon zonları ölçülmüştür. Tricine Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS PAGE) elektroforez sonuçlarına göre *R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. tavasensis*

salgısından birer *R. holtzi* salgısında ise iki adet 5 kDa 'un altında peptit bulunmuştur. Plaka çukur aktivite sonuçlarına göre *E. coli* üzerinde hiçbir türün salgısının aktivite göstermediği *B. cerus* üzerinde tüm türlerin aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bakteriler üzerinde en çok aktiviteyi *R. dalmatina* deri salgısı gösterirken, en az aktiviteyi ise *R. holtzi*' ye ait deri salgısı gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal peptitler, Rana, *R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R.tavasensis*, *R. holtzi*, Tricine-SDS Page



ABSTRACT**Investigation of the Effects on Some Human Pathogens of Antimicrobial Peptides in Frog Species Included in *Rana* genus (*R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. holtzi*, *R. tavasensis*) Living in Our Country**

TANRIVERDİ O, Ebru

PhD Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof Dr. Dinçer AYZ

February 2024, 68

Frog skin secretion is a very rich source of antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are molecules that form the first line of defense against pathogens that enter the body through the skin in frogs and are important elements of natural immunity. AMPs are known as species-specific peptides that differ in different families, genera, species and even subspecies. These peptides, synthesized in ribosomes, are ≤ 5 kDa and have broad-spectrum microbicidal activity. The physical nature of the mechanisms possessed by AMPs prevents the microorganism from developing resistance to this peptide. These peptides are therefore considered potentially therapeutic agents. Striking variations in the expression of AMPs in frog skin can be used to discover new molecular and structural motifs that target specific microorganisms for which therapeutic defenses are scarce.

In this study, protein profiles in the skin secretions of *Rana dalmatina*, *Rana macrocnemis*, *Rana tavasensis* and *Rana holtzi*, which belong to the rana genus widespread in our country, were determined by Tricine Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS PAGE) electrophoresis. Additionally, inhibition zones were measured using the plate pit method on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* bacteria. According to the Tricine SDS Page electrophoresis results, one peptide under 5 kDa was found in the secretions of *R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, and *R. tavasensis*, and

two in the secretions of *R. holtzi*. According to the plate well activity results, it was determined that the secretions of no species showed activity on *E. coli*, while all species showed activity on *B. cerus*. It was determined that the skin secretion of *R. dalmatina* showed the most activity against bacteria, while the skin secretion of *R. holtzi* showed the least activity.

Keywords: Antimicrobial Peptides, Rana, *R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. tavasensis*, *R. holtzi*, Tricine-SDS Page



ÖNSÖZ

2013 Dünya Ekonomik Forumu'nun 50 küresel tehdit listesinde antibiyotik direnci ilk sırada yer almış ve yakın zamanda dünyanın “antibiyotik sonrası dönem” diye adlandırılan ve en basit enfeksiyon hastalıklarının bile tedavisinde kullanılacak ilaç bulunamayacak bir döneme girileceği konusuna dikkat çekilmiştir. Antibiyotik direncinin giderek artması ve son yıllarda ticari firmaların yeni antimikrobiyal ajanları geliştirme çalışmalarına giderek daha az katılıyor olması, içerisinde bulunduğumuz antibiyotik çağını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir. Bu nedenle yeni antibiyotiklere aday olan ve yeni nesil antibiyotikler olarak isimlendirilen antimikrobiyal peptit (AMP) 'ler son zamanlarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur.

Hızlı ve geniş spektrumlu öldürme kinetiklerine sahip olan ve amfibi salgısında bolca bulunan AMP'ler familyalara, türlere hatta alttürlerle özgüdür. Bu yüzden daha fazla AMP' nin bulunup ortaya çıkarılması yeni antibiyotik keşifleri için oldukça önemlidir. Biz de çalışmamızda, daha önce çalışılmamış ülkemizde yaşayan rana türlerinin deri salgısını çalışmaya karar verdik. Bu çalışma ile bilinmeyen AMP'lerin ortaya çıkarılmasını ve ilaç geliştirme alanlarına katkı sağlayacağımızı düşünmekteyiz.

Bu çalışma E.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından FDK-2020-21881 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doktora programı; 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı ile ekonomik destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) tarafından desteklenmiştir.

İZMİR

22/ 02/ 2024

Ebru TANRIVERDİ O

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
TABLolar.....	xviii
SİMGE ve KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Tezde Kullanılan Anur Türleri.....	3
2.2. Kurbağa Deri Yapısı.....	6
2.2.1. Dermal Bezler.....	7
2.3. Amfibi Deri Salgılarının Bileşenleri.....	9

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.1. Antimikrobiyal Peptitler (AMP'ler).....	10
2.4. Bakteriler.....	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Gereç.....	22
3.1.1. Arazi Çalışmaları.....	22
3.1.2. Bakteri Suşları.....	24
3.1.3. Çözelti, Boya ve Tamponlar.....	24
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Salgı Toplanması.....	26
3.2.2. Liyofilizasyon.....	27
3.2.3. Diyaliz.....	28
3.2.4. Sterilizasyon.....	29
3.2.5. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntem ile Total Protein Miktar Tayini.....	30
3.2.6. Elektroforetik Olarak Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	32
3.2.7. Plaka Çukur Yöntemiyle Aktivite Sonuçları.....	34
4. BULGULAR.....	35

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.1.Arazi Çalışmaları.....	35
4.2. Liyofilizasyon.....	36
4.3. Diyaliz Sonuçları.....	36
4.4. Sterilizasyon.....	36
4.5. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemiyle Total Protein Miktarları.....	37
4.6.Tricine-SDS Page Elektroforez Sonuçları.....	38
4.7. Plaka Çukur Yöntemiyle Aktivite Sonuçları.....	42
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	56
TEŞEKKÜR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kurbağa Deri Diagramı.....	6
Şekil 2.2. Mukoz Bez Yapısı.....	8
Şekil 2.3. Granüler bez yapısı.....	9
Şekil 2.4. AMP' lerin ortak yapısal özellikleri ve membran hedeflerini.....	13
Şekil 2.5. Fıçlı tahtası Modeli.....	14
Şekil 2.6. Toroidal Model.....	15
Şekil 2.7. Kilim Modeli.....	16
Şekil 2.8. Gram pozitif ve gram negatif hücre zarflarının ayrıntılı yapısının karşılaştırılması.....	18
Şekil 2.9. Prokaryotik bir sitoplazmik zarın yapısı: bir fosfolipit çift tabakası.....	19
Şekil 3.1. Rana macrocenemis, Bursa/Uludağ/Sarıalan.....	22
Şekil 3.2. Rana holtzi, Niğde/Ulukışla/Maden Köy/ Karagöl.....	23
Şekil 3.3. Rana tavasensis, Antalya/Elmalı/Girdev Gölü.....	23
Şekil 3.4. Rana dalmatina, Kırklareli/İğneada/Longoz Ormanları.....	24
Şekil 3.5. Stimulator ile Elektrik Uygulanması.....	27

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.6. Örneklerin Liyofilizatöre Yerleştirilmeden Önceki Aşaması.....	28
Şekil 3.7. Diyaliz Membranına Örnek Yerleştirilmesi.....	29
Şekil 3.8. Örneğin Sterilizasyonu.....	30
Şekil 4.1. BCA Standart Grafiği ve Denklem.....	37
Şekil 4.2. <i>R. holtzi</i> Salgı Örneğinin Protein Profilleri.....	39
Şekil 4.3. <i>R. tivasensis</i> Salgı Örneğinin Protein Profilleri.....	40
Şekil 4.4. <i>R. macrocnemis</i> Salgı Örneğinin Protein Profilleri	41
Şekil 4.5. <i>R.dalmatina</i> Salgı Örneğinin Protein Profilleri	42
Şekil 4.6. <i>R.holtzi</i> Salgı Örneğinin Aktivite Sonucu Oluşturduğu Zonlar.....	43
Şekil 4.7. <i>R.tivasensis</i> Salgı Örneğinin Aktivite Sonucu Oluşturduğu Zonlar.....	44
Şekil 4.8. <i>R.macrocnemis</i> Salgı Örneğinin Aktivite Sonucu Oluşturduğu Zonlar	45
Şekil 4.9. <i>R.dalmatina</i> Salgı Örneğinin Aktivite Sonucu Oluşturduğu Zonlar.....	46

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. BCA Yönteminde Standartların Hazırlanması.....	31
Tablo 4.1. Salgı Örneklerinin Total Protein Miktarları.....	38
Tablo 5.1. Rana macronemis'in Ülkemizdeki Dağılışı.....	47
Tablo 5.2. Rana dalmatina'nın Ülkemizdeki Dağılışı.....	48
Tablo 5.3. Rana holtzi'nin Ülkemizdeki Dağılışı.....	49
Tablo 5.4. Rana tavasensis' in Ülkemizdeki Dağılışı.....	49

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	Aminoasit
AMP	Antimikrobiyal Peptitler
AMR	Antimikrobiyal Direnç
APS	Amonyum Persülfat
BCA	Bikinkoninik Asit
BSA	Bovin (Sığır) serum Albümin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IUCN	Uluslararası Doğayı Koruma Birliği
kDa	Kilodalton
M.W	Moleküler Ağırlık
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
NE	Norepinefrin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1.GİRİŞ

Doğuştan gelen bağıklık tüm canlı organizmalarda ilk savunma hattını oluşturur ve mikroplara karşı hemen harekete geçer. Ataları sudan karaya geçişi başarmış olan amfibilerde her ne kadar adaptif immünite olsa da memelilerdeki kadar gelişmemiştir ve bu yüzden doğuştan gelen immünite amfibi konakçı tepkisinde temel rol oynamaktadır (Hsu, 1998).

Kurbağa deri salgısı doğal bağııklığın molekülleri olan antimikrobiyal özellikli peptitler bakımından oldukça zengin bir kaynaktır. Bu peptitler hayvanı özellikle deri yoluyla vücuduna giren mikroorganizmalara karşı korumaktadır (Hancock, 2001). Çalışma konumuz olan antimikrobiyal peptit (AMP)' ler gram negatif, gram pozitif bakteriler, virüsler ve bazı kanser hücreleri üzerinde aktivite göstermektedir.

Günümüzde bilinçsiz tüketilen antibiyotiklerden dolayı mikroorganizmalar birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiş durumdadır. Bu patojenleri ortadan kaldırmak için yeni antimikrobiyal ajanların keşiflerine ihtiyaç vardır. Pozitif yüke sahip olan AMP' lerin negatif yüklü mikroorganizmalarla etkileşip yok etme mekanizmalarından dolayı potansiyel olarak terapötik ajanlar olarak kabul edilirler (Toke, 2005).

Günümüze kadar izole edilen ve üzerlerinde çalışmalar yapılan AMP' lerin sayısı hızla artmış ve toplamda 5000'den fazla sayıda doğal ya da sentetik AMP keşfedilmiştir. Bu peptitler farklı familyalara, cinslere, türlere hatta alttürler için kurbağalarda farklılık gösterirler (Vonhoye et al., 2003). Tez çalışmamızda belirlenen kurbağa türlerindeki yeni AMP'lerin ortaya çıkarılması çalışmamızın amaçlarından biridir.

Çalışmamızda belirlediğimiz *Rana dalmatina*, *Rana macrocnemis* ve ülkemiz için endemik olan *Rana holtzi* ve *Rana tavasensis* kurbağa türlerindeki AMP'lerin ortaya çıkarılması ve insan patojenleri olan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* bakteri türleri üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Amfibilerin üç grubu da (Gymnophiona, Urodela ve Anura) yaklaşık 400 milyon yıl önce Devoniyen Dönemi'nde ortaya çıkan çeşitli tetrapodlardan türemiştir (Wells, 2010). Acanthaostega ve Ichthyostega en ilkel tetrapodlar olarak bilinmektedirler. Balıktan tetrapoda geçiş sırasında Devoniyen'in çorak arazisinden farklı olarak 10 metre ve daha uzun ağaçlardan oluşan yoğun alt tabakalara sahip Karbonifer ormanları yaygındı. Bitkiler karada çeşitlenirken, karasal omurgasızlar ve omurgalılarda da buna karşılık gelen bir çeşitlenme meydana geliyordu. Karasal omurgalıların evrimi, anatomi, fizyoloji, davranış ve bir dizi başka özellikte değişiklikler gerektiriyordu. Su ve nem gerektiren yumurtalardan kuru koşullara, serbest yaşayan embriyolardan doğrudan gelişmeye dayanaklı olanlara geçmek oldukça kritikti. Fakat başka adaptasyonlarda gerekliydi. Su desteği olmadan hareket ve kas iskelet sistemi de zorunlu düzenlemeler gerektirecekti. Kara ortamında beslenme, gıda için farklı av ve bitki materyallerinin kullanılması gibi davranışsal ve morfolojik değişimler gerektiriyordu (Vitt and Caldwell, 2014).

Modern amfibiler, zaman zaman onları amfibilerden ziyade erken tetrapodlar olarak düşünülen Paleozoik formlardan ayırmak için lissamphibler olarak adlandırılır. Tüm lissamphibiler Geç Paleozoyik'te bir arada yaşayan ortak bir ataya sahiptir. 20. Yüzyılda Amphibia adı sürüngen, kuş veya memeli olmayan tetrapodlar için kullanılmıştır (Cannatella, 2007).

Yaşayan amfibiler üç ordo ile temsil edilir: Apoda (Gymnophiona), Urodela (Caudata, Semenderler) ve Anura (kuyruksuz kurbağalar) (Vitt and Caldwell, 2014).

Ordo 1: Apoda (Gymnophiona): Bacakları olmayan vücutları silindirik ve halkalı yapıya sahip amfibilerdir. Deri içerisinde dermis orijinli küçük kemik pul-larının yanında derilerinde mukus ve zehir bezleri de bulunur (Budak ve Göçmen, 2008). Gymnophiona, tropikal Amerika, Afrika ve Asya'da ve tipik olarak bol yağış alan bölgelerde görülen tropikal amfibilerdir. Toplam uzunlukları 7-8 cm ile 1,5 m arasında değişir; çoğu orta büyüklükte ve 50 cm'den küçüktür. Türün tüm

erkeklerinde kloakın dışarıya çıkarılabilir bir uzantısı olan Phallodeum bulunur, dölleme dahildir (Zug,1993).

Ordo 2: Urodela (Caudata, Kuyruklu Kurbağalar): Boyutları 10 cm ile 1 m arasında değişir. Erkeklerde çiftleşme organı yoktur, erkek spermlerini küme halinde zemine bırakır dişi kloak yoluyla vücuda alır ve dölleme dahili şekilde gerçekleşir (Zug, 1993; Budak ve Göçmen, 2008). Göz kapakları mevcuttur. Genel olarak erginlerde solungaç yapısı bulunmaz, erginlerde iyi gelişmiş akciğer vardır. Ön ayaklarda 4 arka ayaklarda 5 parmak bulunur (Özeti ve Yılmaz,1994).

Ordo 3: Anura (Kuyuksuz Kurbağalar): Anurlar yüksek enlemler, bazı okyanus adaları dışında çoğu nemli ortamda yaşarlar. Bazı türler kuru çöllerde bile yaşayabilirler. Yetişkinlerde kuyruk yoktur ve kaudal (kuyruk) omurlar, **urostil** adı verilen çubuk benzeri bir yapıya dönüşür. Arka ekstremiteler uzun ve kaslıdır (Harley and Miller, 2007). Diğer amfibiler gibi anurların da derisi çıplak olup pul, kıl ve tüy gibi yapılar bulundurmaz (Guo et al., 2020).

2.1. Tezde Kullanılan Anur Türleri

- ***Rana dalmatina* (Çevik Kurbağa):** Tüm *Rana* türlerinde olduğu gibi *R. dalmatina*'da da temporal şerit mevcuttur. Vücut boyları 5-9 cm arasında değişiklik göstermektedir. Arka bacaklar oldukça uzundur; yaşlı fertlerde öne doğru uzatıldığında tibio-tarsal eklem başının uç kısmını geçmektedir (Özeti ve Yılmaz,1994). Erkeklerde dış ses kesesi bulunmaz. Sırt taraf sarımsı pembemsi ve gri kahverengidir. Bu zemin üzerine siyah noktalar mevcuttur. Karın kısmı sarımsı beyazdır (Baran ve ark., 2021).
- ***Rana macrocnemis* (Uludağ Kurbağası):** Vücut boyları 7-8 cm kadardır. Dorso-lateral kıvrımlar oldukça belirgindir (Demirsoy, 1996). Temporal şerit bulunur. Arka bacaklar uzundur; öne doğru uzatıldığında tibio-tarsal eklem başının uç kısmına erişmektedir (Özeti ve Yılmaz, 1994). Terra typica'sı (Tip Lokalite) Uludağ'dır. Erkeklerinde iç ses kesesi bulunur. Sırt taraf pembemsi kahverengi ve deri pürüklüdür. Karın taraf pembemsi ve lekesizdir (Budak ve Göçmen, 2008).

- ***Rana holtzi* (Toros Kurbağası):** Vücut boyları 6-7,5 cm arasında değişiklik gösterir ve dağ kurbağalarının en küçüğü olarak bilinir (Demirsoy,1996). Baş yanlarında koyu renkli şeritler bulunur. Sırt taraf sarımsı kirli yeşil, sarımsı pembe veya gri yeşildir. Bu renk zemin üzerine siyahımsı yeşil veya kahverengi lekeler bulunur. Karın tarafı genellikle pembemsi veya sarımsı nadiren de gri beyazdır. Ülkemize endemik bir türdür (Baran ve ark., 2021).
- ***Rana tavasensis* (Tavas Kurbağası):** Vücut boyları 8 cm kadardır. Temporal şerit mevcuttur. Erkelerde iç ses kesesi bulunur. Sırt zemin rengi koyu kahverenginden sarımsı açık kahverengine kadar değişiklik gösterir. Belirtilen zemin renginin üzerinde koyu lekeler bulunur. Karın tarafı sarımsı beyaz renkte olup lekesizdir. Ülkemize endemik bir dağ kurbağasıdır (Baran ve ark., 2021).

Anurlarda **amleksus** olarak isimlendirilen kucaklaşma ya da kur yapma davranışı görülür. Bu davranış bireylerin üreme alanlarını bulmalarına ve potansiyel eşleri belirlemelerine yardımcı olur (Harley and Miller, 2007). Döllenme çoğunlukla haricidir, yumurtalar ve larvalar tipik olarak suda yaşar. Sudaki larvalar 25 cm'ye (tüm kurbağaların en büyüğü) kadar büyürler ve daha sonra nispeten küçük yavrulara dönüşürler. Birçok aileden karasal anurlar suda yaşayan yumurtalar bırakır ve suda yaşayan larvalar karasal yavrulara dönüşür (Crump, 2009). Metamorfoz, anurların yumurta ile başlayıp yetişkin aşamasında sona eren dönüşüm sürecidir. Amfibiler yumurtadan çıktıklarında larva formuna sahiptirler. Daha sonra anatomilerinde, diyetlerinde ve yaşam tarzlarında çok önemli değişikliklere uğrarlar ve tamamen sucul olan ilk evrelerinden karada yaşamaya adapte olmuş hayvanlara dönüşene kadar yavaş yavaş mutasyona uğrarlar (Britannica, I.E., 2008).

Yetişkin amfibiler, çok çeşitli omurgasızlarla beslenen etoburlardır. Gerçek bir dil ilk kez amfibilerde görülür. Anurlarda dil, çenenin ön kenarına yapışır ve ağzın tabanına geri katlanır. Dilin ucundaki mukus ve bukkal bezler yapışkan sekresyonlar salgılar. Av menzile girdiğinde, bir anuran ileri atılır ve dilini dışarı fırlatır. Dilin ucu avı yakalar ve dil ile av ağzın içine geri döner (Harley and Miller, 2007).

Amfibiler ektotermiktir. Amfibiler güneşte güneşlenerek veya sıcak yüzeylerde uzanarak kendilerini ısıtabilirler. Vücut sıcaklıkları, hava sıcaklığının 10 ° C üzerine çıkabilir (Zug, 1993).

Amfibilerin sinir sistemi diğer omurgalılarınkine benzer. Yetişkin omurgalıların beyni, üç embriyolojik alt bölümden gelişir. Amfibilerde ön beyin, renk değişimini ve iç organ fonksiyonlarını düzenleyen koku alma merkezleri ve bölgeleri içerir. Orta beyin, duyu bilgisiyi özümseyen ve motor tepkileri başlatan optik tektum adı verilen bir bölge içerir. Orta beyin ayrıca görsel duyu bilgisiyi işler. Arka beyin, motor koordinasyonunda ve kalp atış hızını ve solunum mekaniğini düzenlemede işlev görür (Harley and Miller, 2007).

Sucul anur formlar, gaz değişiminde solungaçlar, deri, akciğerler ve bukokofarengeal yüzeylerin kombinasyonlarını kullanabilir. Karasal formlar ise solunum gazlarını deri, akciğerler ve bukokofarengeal yoluyla değiştirirler (Whitford, 1973).

Amfibilerin derisi, oksijen (O₂) alımını ve karbondioksit (CO₂) atılımını kolaylaştıran benzersiz bir damar sistemi içerir. Kutanöz gaz değişimi, rutin olarak O₂ alımının %0 ila %100'ünü ve CO₂ atılımının %20 ila %100' ünü karşılayabilir. Bundan dolayı ince bir epidermise ihtiyaç duyarlar ve sonuç olarak yüksek oranda su kaybı yaşarlar (Tattersal, 2007).

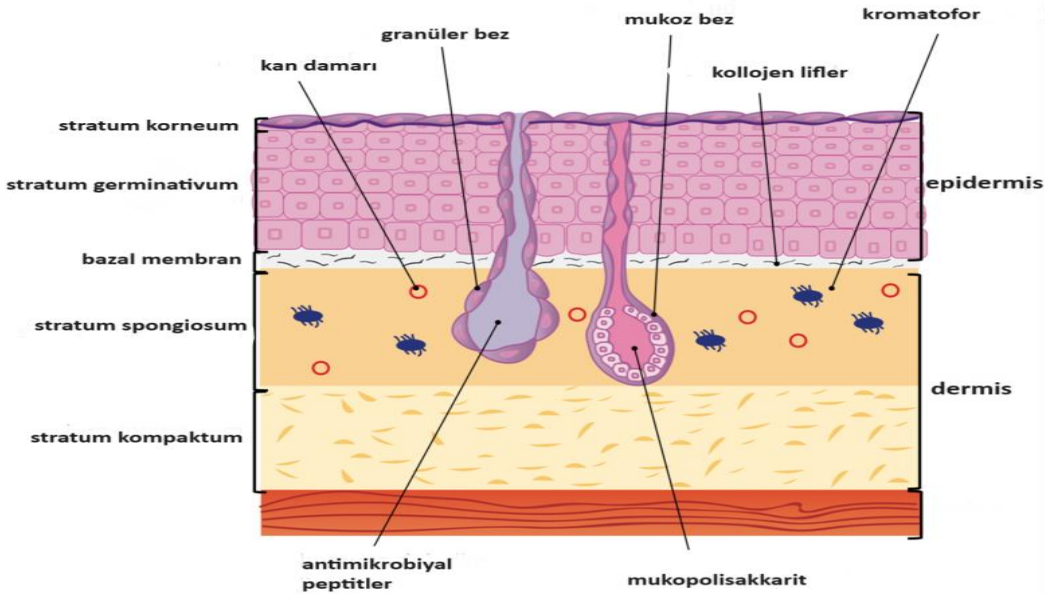
Amfibilerde deri, gaz değişimi, iyon ve su taşınmasının yanı sıra sıcaklık kontrolü, kimyasal ve mekanik duyu alım, üreme ve avcılara ve mikroorganizmalara karşı savunma gibi diğer birçok hayati işlevi yerine getirir (Mauricio et al., 2021).

Amfibi derisi, solunumun yanı sıra su alımı, iyon taşınımı, ısı transferi, kamuflaj ve predatörlere karşı caydırıcılığına katkıda bulunur. Diğer önemli özelliklerinden biri de patojen istilasına karşı fiziksel, kimyasal, immünolojik ve mikrobiyolojik engellerin karmaşık bir ağını oluşturan kritik bir bağışıklık organı görevi görmesidir (Varga, et al., 2019).

2.2. Kurbağa Deri Yapısı

Kurbağa derisi epidermal ve dermal tabakalardan oluşur. Epidermis ve dermis bazal membran ile birbirinden ayrılır. Her tabaka ağırlıklı olarak epitel ve fibroblastik hücrelerden meydana gelir. **Epidermis**, skuamoz epitelten oluşur ve epiderminin en üst tabakası olan stratum korneum çok ince bir keratinize hücre tabakasından oluşmaktadır (Vitt and Caldwell, 2014). Epiderminin en içteki katmanı stratum germinativumdur. Bu tabaka yeni hücreleri üretme yeteneğine sahiptir. Doğrudan dermise bağlanan stratum germinativum tabakası, epitel hücreleri, bağışıklık hücreleri (langerhans hücreleri) ve kromatoforları da içerir. Stratum corneum ile stratum germinativum tabakaları arasında ara katman görevi gören stratum spinosum tabakası yer alır (Varga et al., 2019).

Dermis, bir bağ dokusu olup matriksine gömülü birçok hücre türünü (pigment hücreleri, mukoza ve granüler bezler, kan damarları, sinirler) içeren daha kalın bir katmandır. En içte bulunan dermis tabakası stratum compactumdur ve bu tabaka yoğun şekilde örülmüş bir bağ dokusudur. En dışta bulunan nispeten daha gevşek yapıya sahip olan kan damarları, sinir uçları ve bezleri bulunduran dermiş tabakası ise stratum spongiosumdur (Zug,1993), (Şekil 2.1. Kurbağa Deri Diagramı, Demori et al.,2019).



Şekil 2.1. Kurbağa Deri Diagramı. (Demori et al., 2019)

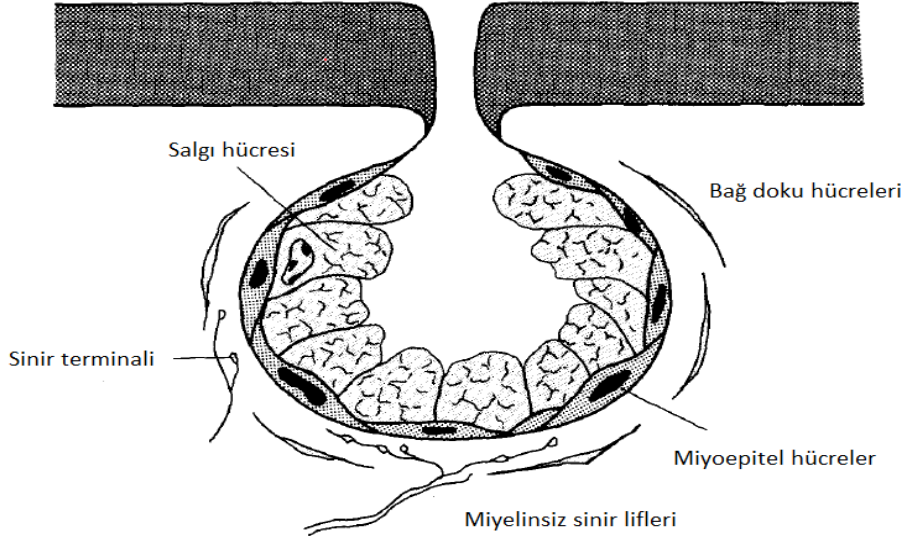
2.2.1 Dermal Bezler

Sudaki bir ortamdan karasal bir ortama geçiş, bir dizi morfofonksiyonel ve davranışsal adaptasyonun kademeli olarak edinilmesinin bir işlevi olarak ortaya çıkmıştır. Diğer organların yanı sıra bu hayvanların derileri yeni yaşam tarzlarıyla ilişkili değişiklikler göstermiştir. Balıklarda ve ilk amfibilerde bulunan koruyucu kutanöz yapılar olan pullar karasal ortamda gereksiz hale gelmiştir. Bununla birlikte organizmanın karasal ortamda bir dizi olumsuz faktöre karşı korunmasında rol oynayan yüzeysel ve kornifiye bir epidermal hücre tabakası ortaya çıkmıştır. Dahası, epidermisten türetilen ve dehidrasyondan kaınmadaneme bir rol oynamış olması gereken çok hücreli ekzokrin bezler ortaya çıkmıştır (Toledo and Jared, 1995).

Temel olarak, amfibi derisinde mukoza bezleri ve granüler (seröz) bezler olmak üzere iki tür bez mevcuttur. Bu bezlerin her ikisi de alveolar (asiner) bezlerden oluşmaktadır ve her iki bez de ekzokrin bezdir. Dermal bezler, kanal, interkalar bölge ve bez alveol olmak üzere c bölümden oluşur (Toledo and Jared, 1995).

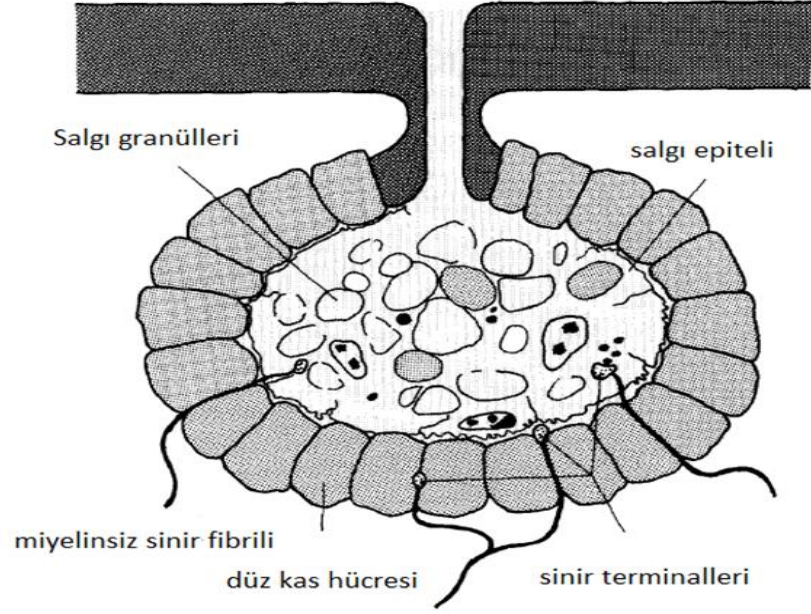
Mukoz bezleri, deri alanında mm başına yaklaşık elli bez olacak şekilde derinin tüm yüzeyine dağılmıştır. Başlıca Na^+ ve Cl^- iyonları içeren sulu bir salgı üretirler (şekil 2.2. Mukoz Bez Yapısı) (Sjöberg and Flock, 1976). Mukoza bezleri tipik olarak küçüktür ve vücutta yaygın olarak bulunur. Deriyi nemli, pürüzsüz tutan, su kaybınınleyen, deriyi mekanik hasardan koruyan ve patojenleri yakalayan mukopolisakkaritler üretir (Clark et al., 1994). Birçok dermal bezde bulunan miyoepitelyal kılıf mukoz bezlerinde yoktur (Fontana et al., 2006). Mukoza bezleri ayrıca doğrudan innervasyondan yoksun olma eğilimindedir ve içeriklerini sürekli olarak deri üzerine salgıladıkları düşünülmektedir (Hoffman and Dent, 1977).

Mukus salgısı, tüm amfibilerin homeostazındaneme bir rol oynar. Mukus, deri yoluyla su kaybını veya kazancını düzenler, sudaki sürtünmeyi azaltan ve sudan kaynaklanan aşınma gibi mekanik hasarı en aza indirerek bir kayganlaştırıcı görevi görür (Clarke, 1997).



Şekil 2.2. Mukoz Bez Yapısı (Sjöberg and Flock, 1976)

Granüler (Seroz) bezler, mukoz bezlerinden yaklaşık üç kat daha büyüktür fakat vücut yüzeyinde mukoz bezlere oranla daha az sayıda bulunan bezlerdir (Şekil 2.2. Granüler Bez Yapısı) (Sjöberg and Flock, 1976). Granüler bez hücrelerinin sitoplazması granüller bakımından oldukça zengin ve lümenleri ise dardır. Holokrin tip seröz bezleri tarafından üretilen salgı, hücrelerin lümeninde granüler olarak depolanır ve uyarıldığında serbest bırakılır (Demas et al., 2012). Bu bezler vücutta deri yüzeyinin altında bulunurlar ve yırtıcı hayvanlara olduğu kadar mikrobiyal ve mantar enfeksiyonlarına karşı konak savunmasında çok önemli bir rol oynayan kimyasal bileşikler salgırlar (Clark et al., 1994).



Şekil 2.3. Granüler Bez Yapısı (Sjöberg and Flock, 1976)

Granüler bezlerin vücutta dağılışı şekli muhtemelen korumayla bağlantılıdır. Örneğin, tropikal Afrika kurbağası olan *Xenopus tropicalis*'de bezler hem ventral hem de dorsal deri üzerinde hemen hemen aynı şekilde dağılmıştır. Bu durum suda yaşayan hayvanın suda her yönden saldırıya maruz kalmasıyla açıklanabilir (Toledo and Jared, 1995). Ekolojik uyum bakımından derileri bu karmaşık çevresel faktörlerle mücadele etmek için kimyasal bir savunma sistemi geliştirmiştir. Şimdiye kadar, bu savunma sisteminde nörotoksik, kardiyotoksik, analjezik, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler dahil olmak üzere çok yönlü işlevlere sahip birçok farmakolojik küçük bileşik ve gen kodlu peptitler/proteinler tanımlanmıştır (Guo et al., 2020).

2.3. Amfibi Deri Salgılarının Bileşenleri

Granüler bezlerin salgıları, farklı alkaloidler, biyojenik aminler, steroidler ve peptitler veya proteinler gibi biyolojik aktivitelere sahip büyük miktarlarda bileşik içerirler. Bezlerin salgıladıkları salgılar, derinin fizyolojik fonksiyonlarını düzenlemek ve onları yırtıcı hayvanlardan ve mikroorganizmalardan korumak adına amfibiler için büyük önem taşır. (Barra and Simmaco, 1995). Amfibi deri salgılarında, peptit öncüleri olan biyojenik aminler büyük ölçüde katekolaminlerin ve

indolalkilaminlerin türevleridir. Salgıda adrenalin, noradrenalin, dopamin ve epinin de bulunabilir. Noradrenalin, dopamin ve epinin, memelilerde en yaygın olarak böbreküstü bezi tarafından üretilen adrenalin hormonunu sentezlemek için kullanılır. Biyojenik aminler genellikle vazokonstriktördür ve bazıları halüsinojenik ve hipertansif özelliklere sahip oldukları için geçici nörolojik işlev bozukluklarına yol açabilirler (Clarke, 1997).

Birçok eski kültürde, amfibilerin deri salgıları hastalıkların tedavisi için ilaç yapımında kullanılmıştır. Kurutulmuş kurbağa derisinin salgıları, artrit tedavisinde geleneksel Çin tıbbında kullanılmıştır. Çin kurbağasının deri bezlerinden hazırlanan Chan Su (Çin tıbbının geleneksel ilacı) kalp hastalıkları, lösemi, rinosinüzit ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Gomes et al., 2007).

Amfibi deri salgısında bulunan antimikrobiyal, antifungal, antivirüs veya hemolitik aktiviteye sahip çok sayıda peptit ve protein vardır, bu peptitler genel olarak antimikrobiyal peptit (AMP) olarak isimlendirilir (Rollins-Smith, 2009).

2.3.1. Antimikrobiyal Peptitler (AMP'ler)

İlk AMP' ler, 1939'da prokaryotik hücrelerde bilinen *Bacillus brevis*'ten izole edilmiştir ve gramicidinler olarak adlandırılan bu peptitlerin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur (Dubos, 1939). Gramisidinlerin daha sonra, klinik kullanım için terapötik potansiyellerini göstererek kobay derisi üzerindeki enfekte yaraları başarıyla tedavi ettiği gösterilmiş ve antibiyotik olarak ticari üretilen ilk AMP' ler olmuşlardır (Van Epps, 2006).

Çok hücreli organizmaların AMP' leri ilk olarak 1980'lerde, bilinen bağışıklık sistemlerinin gözlemlediklerini açıklayamayacağını düşünen araştırmacılar tarafından karakterize edildi: antikorlar veya lenfositler içermeyen bir *Cecropia* güvesi pupasının bakteriyel enfeksiyona karşı direnci, bir tavşandan alınan nötrofillerin güçlü mikrobisid aktivitesi ve steril olmayan bir akvaryumda *Xenopus laevis*' in derisindeki bir yaranın enfeksiyon olmadan iyileşmesi (Stenier et al.,1981; Selsted et al.,1985; Zasloff, 1987). O zamandan beri AMP' ler çeşitli mantar, bitki ve hayvan türlerinde keşfedilmiştir (Fan et al., 2016).

AMP' ler, hayvanları mikrobiyal, viral veya hücreyel davetsiz misafirlerden koruyan, genetik olarak kodlanmış proteinlerin ve peptitlerin doğuştan gelen ağının merkezi bileşenleridir. Gen kodlu olduklarından, bazı AMP 'ler deri dahil olmak üzere bariyer bölgelerinde veya solunum, mide-bağırsak ve ürogenital yollarda istilaya karşı hassas olan yerlerde önceden konumlanmışlardır (Lehrer, 2013).

AMP' ler kaynağına göre çok farklı iki türe ayrılabilir. Birinci tip, gen kodlu peptitlerdir. Ribozomlar tarafından sentezlenen oligopeptitler veya proteinlerdir ve hemen hemen her tür organizmada bulunabilirler. İkinci sınıf, ribozomlarda sentezlenmek yerine bakteri ve mantarlar tarafından spesifik olarak üretilen peptit antibiyotiklerdir. Bu peptit antibiyotikler, çoklu enzimlerin, D-amino asitlerin ve diğer bazı proteojenik olmayan aminoasitlerin kompleksleridir. Dallı veya halkalı bir yapı içerdiklerinden çeşitli modifikasyonlara uğrayabilirler (Wiesner and Vilcinskas, 2010).

AMP' ler tipik olarak genellikle 8- 50 amino asit rezidülerinden oluşan, genellikle olağan L konfigürasyonunda, +2 ila +6 net pozitif yüke sahip küçük moleküllerdir (Hancock and Sahl, 2006). Çoğunlukla yapılarında arginin, lizin ve histidin amino asitlerinin bulunması nedeniyle katyoniktirler. Tipik olarak, bir AMP' nin amino asitlerinin %50' den fazlası hidrofobiktir (Hancock and Diamond, 2000).

AMP' ler üç boyutlu yapılarına göre üç ana sınıfa ayrılabilir (Boman, 2003):

1. Amfipatik bir α -sarmal konformasyon benimseyen sistein amino asitleri olan ve olmayan katyonik peptitler
2. Düz bir β -sheet yapısını benimseyen üç disülfür bağına sahip peptitler
3. Belirli amino asitlerin yüksek yüzdesine sahip peptitler, özellikle prolin, arginin ve triptofan

Amfibilerde Antimikrobiyal Peptitler (AMP'ler)

Kurbağaların deri salgılarında bulunan peptitlerin büyüklükleri 8 ila 50 amino asit rezüdi arasında değişir. Zararlı mikroorganizmalara karşı etkili ve hızlı hareket eden bir savunma aracı olarak granüler bezler tarafından derinin dış tabakası

üzerine salınırlar (Duda et al.,2002). Bununla birlikte, bu peptitler, lizin, arginin ve histidin dahil olmak üzere pozitif yüklü amino asitler açısından zengindir ve yaklaşık % 40-70 oranında hidrofobik amino asit içerir. Çoklu pozitif amino asitlerin varlığından dolayı, bu peptitler pH 7'de +2 ile +6 arasında pozitif yük taşırlar. Sulu çözeltide, bu peptitler herhangi bir kararlı ikincil yapıya sahip değildir, ancak bir fosfolipidin yakınında, iki tabakalı peptitler amfipatik alfa heliks yapısı oluşturma eğilimindedir (Conlon and Mechkarska, 2014). Ribozomlarda sentezlenen bu peptitler ≤ 5 kDa olup geniş spektrumlu mikrobisidal aktiviteye sahip moleküllerdir (Hancock and Diamond, 2000).

Zasloff ve meslektaşları 1987'de kurbağaların deri salgılarında bulunan peptitlerin antibakteriyel aktivitesini ilk kez rapor etmişlerdir. Bu moleküllerin algılanmasına yönelik geniş ticari ilgi, yine Zasloff tarafından *Xenopus levis*'in deri salgısındaki magainin keşfi ile başlamıştır (Zasloff, 1987).

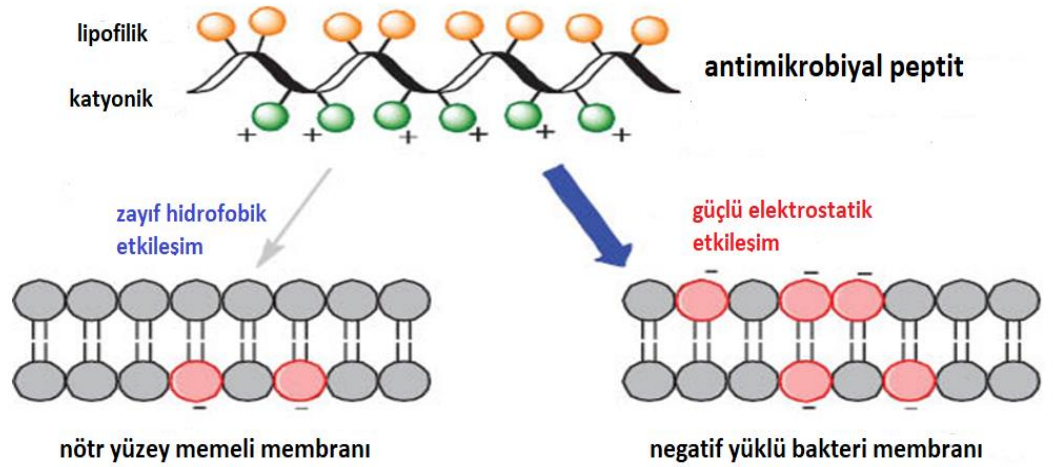
Ranidae familyasından farklı türlerle yapılan araştırmalar, derilerinin çok sayıda farklı antimikrobiyal peptit içerdiğini göstermiştir. Bunlardan *Rana pipiens* derisinden izole edilen ilk peptitin mast hücrelerinden histamin saldığı gösterilmiştir (Horikawa et al 1985). Daha yakın zamanlarda, sırasıyla *Rana brevipoda* ve *Rana esculenta*'dan brevinin-1 ve brevinin-1E olarak adlandırılan antimikrobiyal aktiviteye sahip homolog peptitler izole edilmiştir. Bu peptitler, pozitif bir net yüke sahiptir ve iki prolin dahil 24 amino asit içerir (Simmaco et al., 1993). Rana cinsine ait türlerde 13 farklı peptit familyası tanımlanmıştır: Brevinin-1,2, esculentin-1,2, ranatuerin-1,2, ranaleksin, palustrin-1,2,3, tigerinin ve japonicins-1,2 familyasıdır (Vanhoye et al., 2003). 20'den fazla Rana türlerinde 160 AMP tespit edilmiştir. Örneğin; *Rana palustris*' e ait deri salgısında 8 farklı familyaya ait 22 farklı AMP bulunmuştur. Bu peptitlerin her biri boyut, yük, hidrofobiklik, konformasyon ve etki spektrumu bakımından birbirlerinden farklıdır (Li et al., 2007).

Antimikrobiyal Peptitlerin Çalışma Mekanizması

AMP'ler Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere, mantarlara, virüslere ve protozoalara karşı etkili bir işlev gösterir. Farklı türler, çeşitli mikropların büyümesini önleme aktivitesine sahip farklı peptitler üretir. AMP'lerin ana aileleri, amfipatik

doğrusal sarmal peptitler olarak kabul edilmektedir. Katyoniktirler ve yapıları büyük miktarlarda pozitif yük taşıyan rezidüer ve hidrofobik bölgeler içerir. Bu özellikleri negatif yüklü moleküller ve/veya membran lipitleri ile birleşerek membran yapısını tahrip etmelerini sağlar (Rollins-Smith et al., 2005).

Ökaryot hücrelerin sitoplazma zarı, bakteri hücresinden farklı olarak fosfatidil-kolin ve sfingomiyelin gibi elektriksel olarak nötral, fosfolipitlerden yapılmıştır. Bakteri dış membranı ise negatif yüklü fosfatidilgliserol ve kardiyolipinden oluşmaktadır. Bu farklılıklar, AMP'lerin insan hücreleri üzerine önemli toksik etkileri olmaksızın bakteriler üzerindeki öldürücü etkilerini açıklamaktadır (Madigan et al.,1997). (Şekil 2.4. AMP'lerin ortak yapısal özellikleri ve membran hedefleri, Locock et al.,2014)



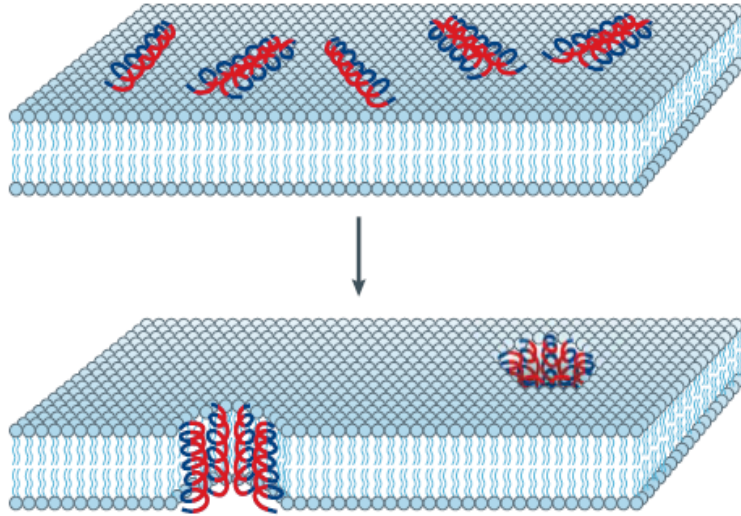
Şekil 2.4. AMP'lerin ortak yapısal özellikleri ve membran hedefleri (Locock et al.,2014)

Katyonik karaktere sahip olmaları tüm AMP'lerin ortak özelliğidir ve anyonik fosfolipitler içeren hedef hücre zarları ile mükemmel etkileşime girmelerini sağlar. Birçok AMP'nin negatif yüklü kanser hücrelerini de öldürdüğü tespit edilmiştir (Calderon and DeVries, 1997). AMP'ler, hızlı bir hemoliz ile sonuçlanabilecek eritrositlerle etkileşime girme yeteneğine sahiptir. AMP'lerin çoğu, hidrofobik

ortamlarda amfipatik bir α -sarmal yapısını benimseyerek hedef zarın fosfolipit çift katmanını bozabilir, bu da sonunda hücrelerin ölümü veya büyümenin inhibisyonu ile sonuçlanabilir (Simmaco et al., 1998).

AMP' lerin hedef zara nasıl girdiğini ve daha sonra iyon kanallarının, transmembran gözeneklerin veya hücre zarının kapsamlı bir şekilde yırtılmasına yol açtığını göstermek için birçok model önerilmiştir.

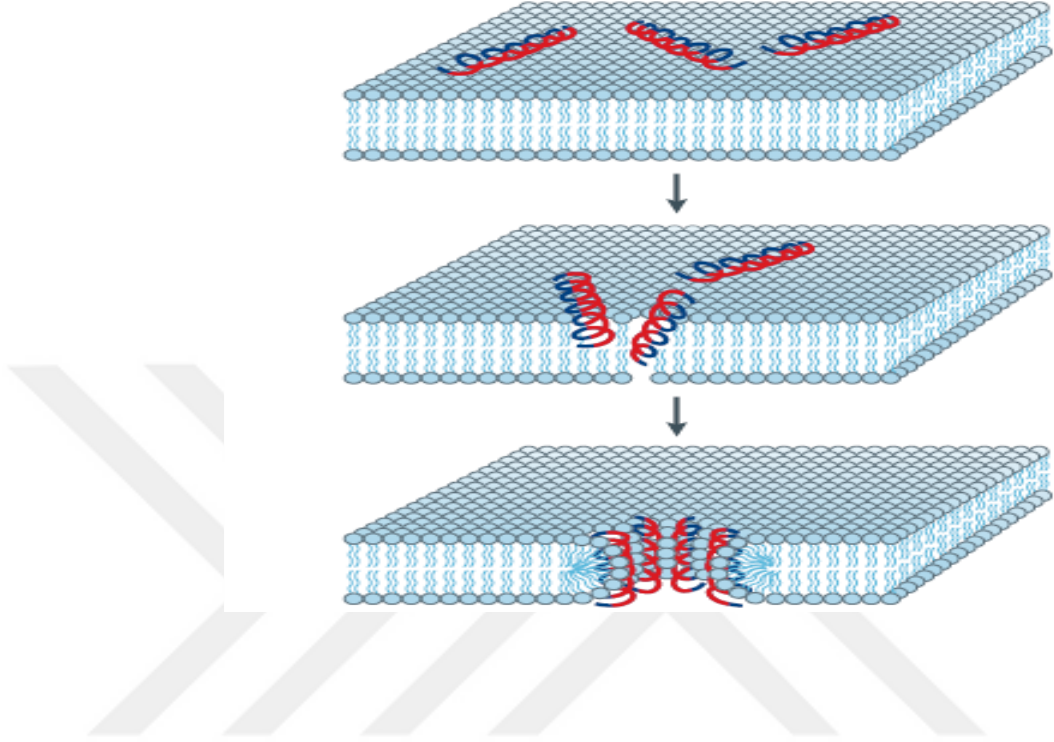
Fıçı Tahtası Modeli: Bu modelde peptitler öncelikle hücre membranına paralel konuma gelir ve ardından çift katlı membran düzlemine dik olarak yerleşerek fıçı şeklini oluştururlar (Zhank et al.,2001). (Şekil 2.5.Fıçı tahtası Modeli, Brogden, 2005).



Şekil 2.5. Fıçı tahtası Modeli. Kırmızıyla vurgulananlar hidrofilik peptit bölgeleri maviyle vurgulananlar ise hidrofobik peptit bölgeleridir (Brogden, 2005).

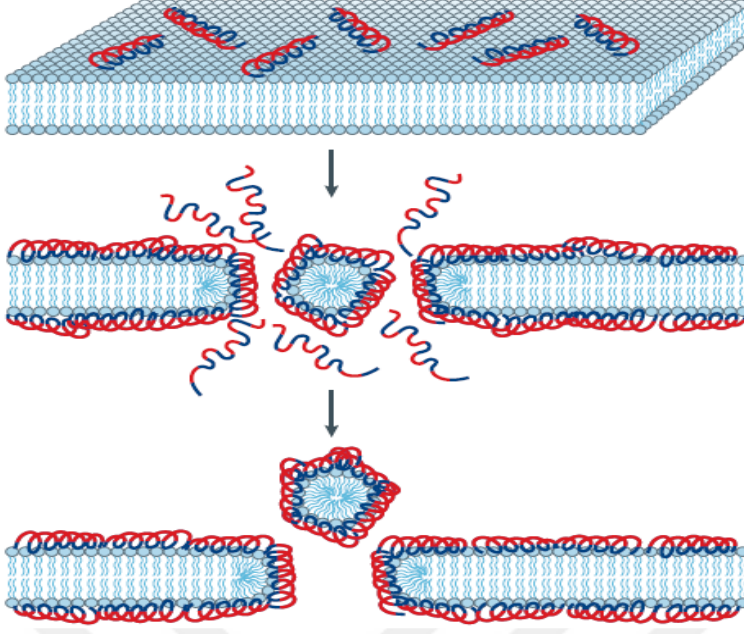
Toroidal (solucan deliği) Modeli: Peptitlerin, hedef zara dikey olarak yerleştirildiklerinde bile, tam uzunluktaki transmembran gerilmeleri boyunca lipit

baş grupları ile birleştiğini gösterir. AMP'lerin hidrofobik bölgeleri membranın polar grupları ile yer değiştirir ve membranın hidrofobik kısımlarında yarıklar oluşur (Şekil 2.6 Toroidal Model , Brogden, 2005).



Şekil 2.6. Toroidal Model. Kırmızıyla vurgulananlar hidrofobik peptid bölgeleri maviyle vurgulananlar ise hidrofobik peptid bölgeleridir (Brogden, 2005).

Kilim Modeli: Bu model ise AMP'lerin monomerleri membran yüzeyine paralel yönde tutması ve üzerini halı gibi kaplaması özelliği ile kilim ya da halı modeli olarak adlandırılmaktadır. AMP molekülleri çift tabakalı lipit tabakada porlar oluşturarak deterjana benzer bir etki ile membranın parçalanmasına yol açarlar (Bolin-tineanu and Kaznessis, 2011) (Şekil 2.7. Kilim Modeli, Brogden, 2005).



Şekil 2.7. Kilim Modeli. Kırmızıyla vurgulananlar hidrofilik peptit bölgeleri maviyle vurgulananlar ise hidrofobik peptit bölgeleridir (Brogden, 2005).

Tarih boyunca, insanlar ile enfeksiyon ve hastalığa neden olan çok sayıda mikroorganizma arasında sürekli bir savaş yaşanmıştır. Veba, tüberküloz, sıtma ve son zamanlarda insan immün yetmezlik virüsü / edinilmiş immün yetmezlik sendromu pandemisi, insan popülasyonunun önemli bir bölümünü etkilemiş ve önemli morbidite ve mortaliteye neden olmuştur. 20. yüzyılın ortalarından itibaren, antibakteriyel ilaç geliştirme ve diğer enfeksiyon kontrol araçlarındaki büyük ilerlemeler insanların lehine çevrilmiştir. Bakteriyel enfeksiyonlarla ilgili olarak, penisilin 1940'ların başlarında kullanıma hazır hale geldiğinde durum önemli ölçüde iyileşmiştir. Antibakteriyel ilaçlar dağıtılır dağıtılmaz, bakteriler çeşitli direnç biçimleri göstererek yanıt vermiştir. Antimikrobiyal kullanım arttıkça, bakteriyel patojenlerin sergilediği direnç mekanizmalarının seviyesi ve karmaşıklığı da artmaya başlamıştır (Tenovar, 2006). Bundan dolayı alternatif yeni nesil antibiyotik çalışmaları hız kazanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar AMP'lerin yeni nesil antibiyotiklere aday olabileceğini göstermiştir.

2.4.Bakteriler

Hücre duvarı dışında prokaryotlar ökaryot canlılardan daha basittirler. Bakterilerin çoğu, sitoplazma zarı dışında bir de sitoplazmanın dışında yer alan, hücre duvarı adı verilen, kimyasal olarak karmaşık bir dış kaplamaya daha sahiptir. Bu yapı, organizmaları aşırı ozmolarite, kimyasallar ve hatta antibiyotikler gibi düşman ortamlardan korur (Brooks et al., 2007).

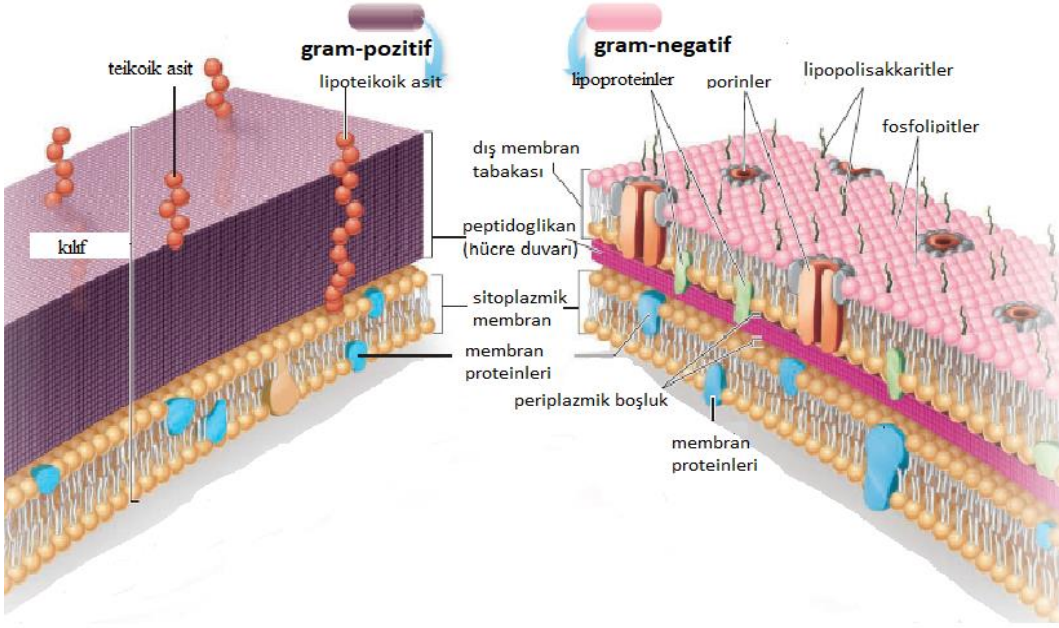
Hücre Duvarının Yapısı

Çoğu bakterinin hücre duvarları, nispeten katı niteliklerini peptidoglikan (PG) adı verilen bir makromolekülden alır. Peptidoglikanın miktarı ve tam bileşimi, ana bakteri grupları arasında değişiklik gösterir (Cowan, 2011).

Hücre duvarının gram boyası ile verdiği tepkimeye bağlı olarak, bakteriler iki büyük gruba ayrılır: **gram-pozitif** ve **gram-negatif**.

Gram – Pozitif Hücre Duvarı: Gram boyama sonucunda gram-pozitif bakteriler mor renkte görülür (Madikan and Marikon, 2010). Gram-pozitif hücre duvarının büyük kısmı, kalınlığı 20 ila 80 nm arasında değişen kalın, homojen bir peptidoglikan kılıf içerir. Ayrıca teikoik asit ve lipoteikoik asit dahil olmak üzere sıkıca bağlı asidik polisakkaritler içerir (Cowan, 2011) (Şekil 2.8).

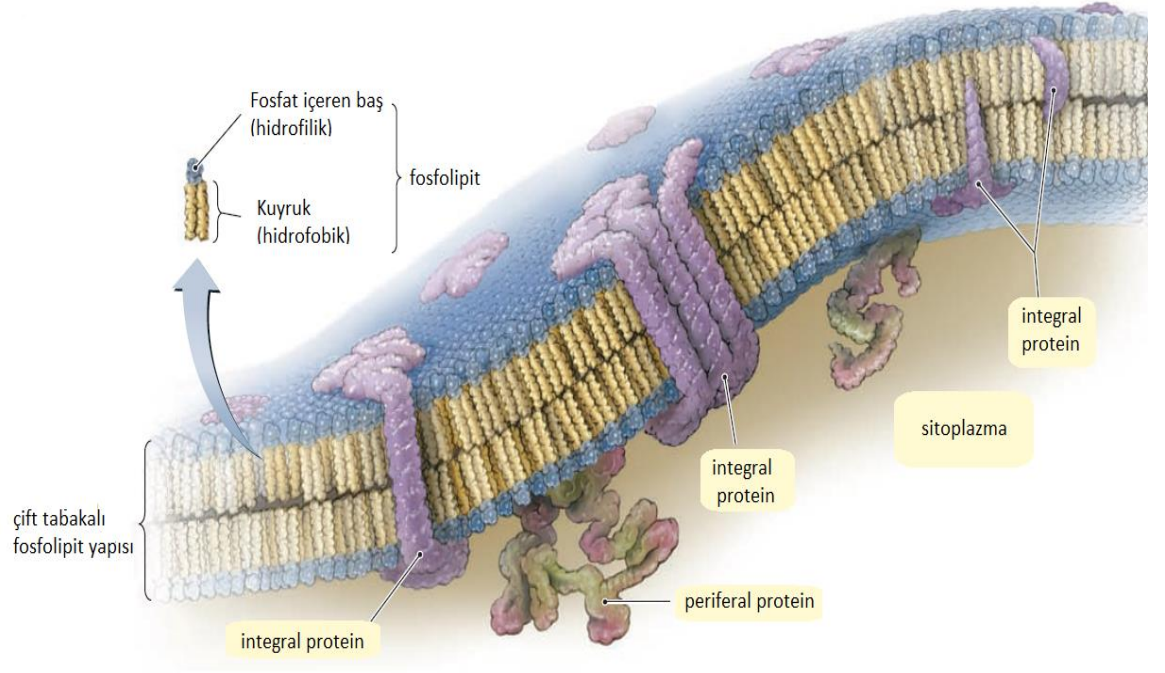
Gram –Negatif Hücre Duvarı: Gram-negatif bakteriler ise gram boyama sonucunda kırmızı görünürler (Madikan and Marikon, 2010). Gram-negatif duvar, tek, ince (1-3 nm) bir peptidoglikan tabakasıdır. Daha önce tarif edildiği gibi biraz sert bir koruyucu yapı görevi görse de, inceliği gram-negatif bakterilere daha büyük bir esneklik ve parçalanmaya karşı hassasiyet verir (Şekil 2.8 Gram pozitif ve gram negatif hücre zarflarının ayrıntılı yapısının karşılaştırılması, Cowan, 2011)



Şekil 2.8. Gram pozitif ve gram negatif hücre zarflarının ayrıntılı yapısının karşılaştırılması (Cowan, 2011).

Sitoplazma Zarının Yapısı

Sitoplazmik zarlar yaklaşık 8 nm kalınlığındadır ve çift tabakalı fosfolipitlerden oluşur. Bu fosfolipitler hem hidrofobik (yağ asidi) hem de hidrofilik (gliserolfosfat) bileşenler içerirler (Brooks et al., 2007). Sulu bir ortama yerleştirilen fosfolipitler, bipolar yapıları nedeniyle doğal olarak bir çift tabaka oluştururlar. Zar proteinleri olan **integral proteinleri** membran içine gömülüdür. Buna karşılık **periferik zar proteinleri** ise zarın yüzeyine bağlıdır. Hücre zarının proteinleri, tanıma proteinleri, enzimler, reseptörler, taşıyıcılar veya kanallar olarak işlev görebilir. Hücre zarları boyunca konsantrasyon gradyanlarına sahip olan maddelerin çoğu elektrik yüklü kimyasallar olduğundan, zar boyunca karşılık gelen bir elektrik gradyanına sahiptir. Elektrik yüklerinin bir zar tarafından ayrılmasının nedeni, hücrenin içinin dışına kıyasla genellikle elektriksel olarak negatif olmasından kaynaklanır. Bu, negatif yüklü kimyasalları itme ve pozitif yüklü maddeleri hücrelere çekme eğilimindedir (Şekil 2.9. Prokaryotik bir sitoplazmik zarın yapısı: bir fosfolipit çift tabakası, Bouman and Primm, 2018).



Şekil 2.9. Prokaryotik bir sitoplazmik zarın yapısı: bir fosfolipit çift tabakası (Bouman and Primm, 2018).

Tezde Kullanılan Bakteriler

- ***Staphylococcus aureus***: Fakültatif anaerob, hareketsiz, sporsuz ve nadiren kapsüllü olan gram pozitif bir bakteri kokudur (Sastry, 2018). Stafilkoklar, küçük sferik yaklaşık 1 µm büyüklüğünde katalaz üreten bakterilerdir (Kayser et al., 2005). *S. aureus* önemli bir insan patojenidir ve normalde sağlıklı deride enfeksiyona neden olmaz, ancak iç dokulara veya kan dolaşımına girmesine izin verilirse bu bakteriler potansiyel olarak ciddi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir (Taylor and Unakal, 2022). Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit, septik artrit, protez cihaz enfeksiyonları, pulmoner enfeksiyonlar (pnömoni ve ampiyem), gastroenterit, menenjit ve idrar yolu enfeksiyonu gibi birçok septuma yol açabilir (Tong et al., 2015).
- ***Bacillus cereus***: Gram-pozitif olan Bacillus bakteri cinsinin üyeleri, aerobik veya fakültatif anaerobiktir ve değişken spor oluşturan çubuk formundadırlar (Drobniewski, 1993). Toprakta doğal olarak bulunan sporlu bir bakteridir. Toprakla yakın temas halindeki sebzelerde ve diğer ürünlerde

yaygın olarak bulunur. Genel olarak bağırsak lümenine büyük çapta sıvının salgılanmasına neden olarak kusma ve diyareye neden olur. *B.cereus* ishal ve kusmalara neden olan iki ekzotoksin üretir. Hastalık genellikle uzun süre sıcakta tutulan pişmiş et ve sebzelerle ilişkilendirilir (Cowan, 2011).

- ***Listeria monocytogenes***: Fakültatif anaerobik, kapsülsüz, kamçılı ve çubuk şeklinde olan gram pozitif bir bakteridir. Doğada her yerde bulunurlar. Gıda ile gastrointestinal sisteme girerse insan enfeksiyonuna dönüşebilir (Kayser et al., 2005). Özellikle süt ve ürünleri, et ile fermente edilmiş sucuk gibi et ürünleri ve deniz ürünlerinde bulunabilir. Genellikle bulaş gıda yoluyla olmaktadır (Gudbjörnsdottir et al., 2004). İnsanlarda menenjit, septisemi, konjunktivit, deri ve mukoza lezyonlarına ve kan tablosunda monositoza neden olmaktadır (Goulet et al., 2006).
- ***Escherichia coli***: Enterobacteriaceae bakteri ailesinin bir üyesi olan E. coli, insanların ve sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal yollarının en yaygın kommensal sakinidir ve aynı zamanda en önemli patojenlerden biridir. Çubuk şeklinde ve boyutları 1-3µm olan gram negatif bir bakteridir (Kaper et al., 2004). Kommensal olarak, konakçılarla karşılıklı yarar sağlayan bir birlikte içinde yaşar ve nadiren hastalığa neden olur. Bununla birlikte, geniş bir hastalık yelpazesinden sorumlu olduğu için aynı zamanda en yaygın insan ve hayvan patojenlerinden biridir (Yoon et al., 2009). Gram negatif bakteriler arasında kan dolaşımı enfeksiyonu ve idrar yolu enfeksiyonlarının en sık nedenlerinden biridir. Vajinal ve endoservikal kolonizasyona ve ayrıca hamile kadınlarda intraamniyotik ve puerperal enfeksiyon ve neonatal gibi farklı enfeksiyonlara neden olur (Guiral et al. 2011). Bunun yanında herhangi bir ekstraintestinal bölgeyi enfekte ederek menenjit, deri enfeksiyonları, miyozit ve osteomyelitte neden olabilir (Russo and Johnson 2003).
- ***Salmonella typhimurium***: Enterobacteriaceae ailesine ait endotoksin üreten, hareketli, kapsülsüz, genellikle aerob ve fakültatif anaerob olan gram-negatif bir bakteridir (Tortora et al., 2018). İnsanlarda enfeksiyonun kaynağı genellikle yediği besi hayvanlarıdır, ancak özellikle hastanelerde, pediatri birimlerinde ve gündüz bakımevlerinde salgın döngüleri meydana gelebilir (Anderson et al.,1977). Kan dolaşımına geçerek bakteriyemi yapma ve hemen hemen her organa invazyon yapıp lokal enfeksiyona sebep olma potansiyeline sahiplerdir (Shkalim et al.,2012). Erişkin bireylerde ateş,

titreme, terleme, miyalji, iştahsızlık, kilo kaybı ve sepsis bulguları tespit edilebilir. Ayrıca 4 ay ve altı çocuklarda Salmonella sonucu menenjit de görölmektedir (Yücel, 2020).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Ülkemizde yaşayan *Rana* cinsine dahil (*R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. holtzi*, *R. tavasensis*) kurbağa türlerindeki antimikrobiyal peptitlerin bazı insan patojenleri üzerine etkilerinin araştırılması başlıklı tez çalışmamızda *R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. holtzi* ve *R. tavasensis* türlerinin deri salgısı çalışılmıştır.

3.1.1 Arazi Çalışmaları

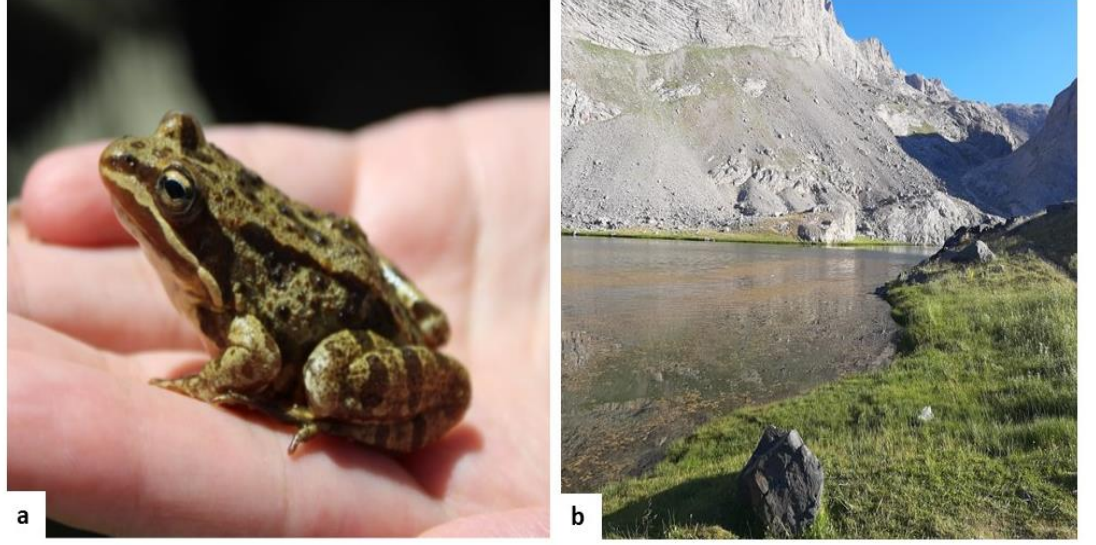
Tez çalışmasında kullanılan tüm türlerin arazi çalışmaları T.C Tarım ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü 21264211-288.04-E.1016837 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

Rana macrocnemis: 10-11 Temmuz 2020 tarihlerinde Bursa/Uludağ/Sarıalan mevkiinde arazi çalışması yapılmıştır. *R. macrocnemis* 40° 07' 54" K, 29° 06' 50" D koordinatlarında 10 birey atrap yardımıyla toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. a) *Rana macrocnemis*, b) Bursa/Uludağ/Sarıalan

Rana holtzi: 31 Temmuz 2020 tarihinde Niğde/Ulukışla/Maden Köy' de Karagöl çevresinde arazi çalışması yapılmıştır. *R.holtzi* 37° 24' 15"K, 34° 33' 35" D koordinatlarında 36 birey atrap yardımıyla toplanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2.a) *Rana holtzi*, b) Niğde/Ulukışla/Maden Köy/ Karagöl

Rana tavasensis: 3-5 Temmuz 2021 tarihlerinde Antalya/Elmalı/Girdev Gölü çevresinde arazi çalışması yapılmıştır. *R. tavasensis* 36° 40' 29" K, 29° 40' 02" D koordinatlarında 20 birey atrap yardımıyla toplanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. a) *Rana tavasensis*, b) Antalya/Elmalı/Girdev Gölü

Rana dalmatina: 21 Mayıs 2022 tarihinde Kırklareli/İğneada/Longoz Ormanları'nda Mert Gölü yakınlarında arazi çalışması yapılmıştır. *R. dalmatina* 41° 52' 34" K, 27° 58' 53" D koordinatlarında 11 birey atrap yardımıyla toplanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. a) *Rana dalmatina*, b) Kırklareli/İğneada/Longoz Ormanları

3.1.2 Bakteri Suşları

- *Escherichia coli* ATCC 11775
- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Bacillus cereus* ATCC 11778
- *Listeria monocytogenes* ATCC 1911

3.1.3. Çözelti, Boya ve Tamponlar

0,1 M NaCl + 0,01 M EDTA (pH: 8) (Salgı yıkama solüsyonu)

- 2,920 g NaCl tartılır.
- 1,46 g EDTA tartılır.

- 500 ml deiyonize su içerisinde çözdürülür.
- HCl ve NaOH ile pH 8' e ayarlanır.

2,5 M Tris Tamponu (Tris-HCl, pH: 8.8)

- 30,285 g Tris-base tartılır.
- 60 ml deiyonize su içerisinde çözdürülür.
- HCl ile pH: 8.8' e ayarlanır.
- Deiyonize su ile 100 ml' ye tamamlanır.
- + 4 °C' de saklanır.

Akrilamid/Bis (30%T, 2,67%C)

- 29 g akrilamid tartılır.
- 1 g N,N"-Metilen-bis Akrilamid tartılır.
- Deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- + 4 °C' de saklanır.

APS (amonyum persülfat)

- 0,03 g amonyum persülfat tartılır.
- 1 ml deiyonize suda çözdürülür.
- + 4 °C' de saklanır.

Yürütme tamponu (Running Buffer)

- 4,5 g tricine tartılır.
- 3,03 g tris-Base tartılır.
- 0,5 g SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) tartılır.
- Deiyonize su ile 1 L'ye tamamlanır.
- + 4 °C' de saklanır.

Örnek (vükleme) Tamponu (pH: 6.8)

- %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-mercaptoethanol, %0,004 bromfenol mavisi ve 0,125 M tris-HCl içerir. -20 °C' de saklanır.

%5 Gluteraldehit Sabitleme Solusyonu

- %25'lik gluteraldehit solusyonundan 20 ml alınır.
- 80 ml deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- -20 °C'de saklanır.

%10 Asetik Asit Solusyonu

- 10 ml asetik asit alınır.
- 90 ml deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Coomassie Brilliant Blue (CBB) Boyama Solusyonu

- 0,025-0,030 g CBB tartılır.
- 100 ml %10 asetik asit solusyonunda çözdürülür.

Protein Marker (M.W. 1,060-26,600)

- 2X örnek (yükleme) tamponu ultra pür su ile 1:1 oranında seyreltilerek 1X örnek (yükleme) tamponu elde edilir.
- Protein marker 1X örnek (yükleme) tamponu ile 1:20 oranında seyreltilip volümlere ayrılarak -20 °C'de saklanır.

3.2.Yöntem

Tezde kullanılan deney hayvanlarıyla etik kurallara uyularak çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.02.2020 tarih ve 2020-031 sayılı izni ne bağlı olarak yürütülmüştür.

3.2.1. Salgı Toplanması

Arazi çalışmalarında toplanan bireyler öncelikle distile suyla yıkanmıştır. Yıkanan bireylere Students Stimulator (C.F. Palmer Ltd. London, England) benzeri özel yapım, pille çalışan bir stimülatör yardımıyla 10V' luk elektrik akımı uygulanmıştır (Şekil 3.5). Elektrik uygulanan bireyler steril bir kap içine alınarak her birey

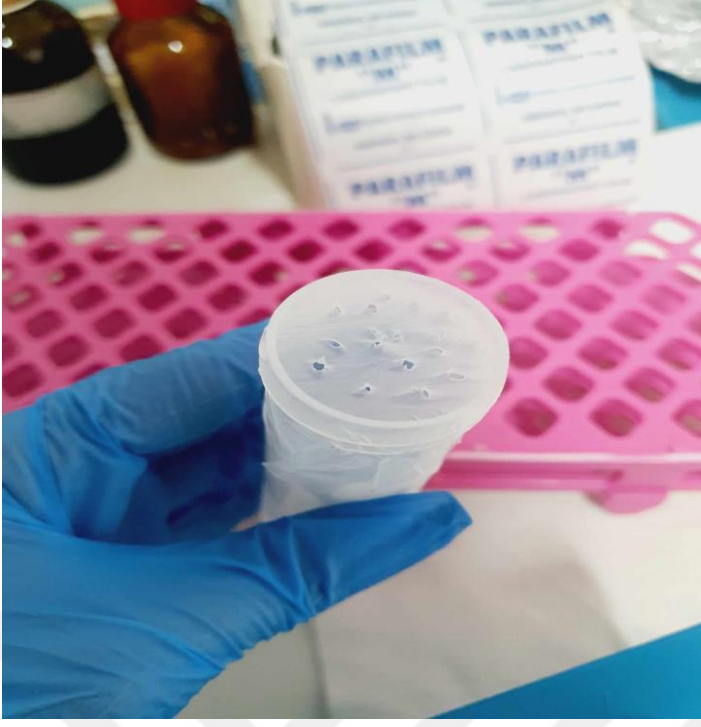
başına 15 ml olacak şekilde 0,01 M EDTA içeren 0,1 M NaCl (pH 8)'lü yıkama solüsyonu konularak yıkanmıştır. Toplanan salgı örnekleri santrifüj tüplerine alınıp $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Ardından salgı örnekleri 5000 x rpm' de ve $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 12 dk santrifüjlenmiştir. Örnekler üzerindeki süpernatant mikropipet yardımıyla falkon tüplerine 20 ml olacak şekilde konulmuştur.



Şekil 3.5. Stimulator ile Elektrik Uygulanması

3.2.2. Liyofilizasyon

$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulan örnekler hiç çözülmeden kapakları açılıp ve ağız kısımları parafilmle kapatılıp delikler açılarak liyofilizatöre yerleştirilmiştir (Şekil 3.6). Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları (MATAL)'nda Christ Alpha 1-2 LD Plus Lyophilizer cihazı ile örneklerin sıvı kısmı tamamen uzaklaştırılıp kuru hale gelene kadar (ortalama 2 gün) liyofilize edilmiştir. Liyofilize olan örnekler $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.6. Örneklerin Liyofilizatöre Yerleştirilmeden Önceki Aşaması

3.2.3. Diyaliz

Liyofilize olan salgı örneklerinden tuzu uzaklaştırıp kısmı olarak saflaştırmak için diyaliz işlemi yapılmıştır. Bu işlem Spectra/ Por 6 Pre-wetted Standart Rc Dialysis Tubing, 1-50 kD MWCO diyaliz membranı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir türe ait liyofilize örnekten 0,4 g tartılıp 2 ml ultra pür su ile süspanse hale getirilmiştir. Diyaliz membranı distile su ile yıkandıktan sonra alt kısmına sıkı bir düğüm atılıp, süspanse örnek mikropipet yardımıyla tüp içerisine dikkatlice boşaltılmıştır. Tüp içerisinde bir miktar hava kalacak şekilde tüpün diğer ucuna da sıkı bir düğüm atılmıştır (Şekil 3.7). Ardından diyaliz tüpü bir beher içinde bulunan saf suya bırakılmıştır. İçerisinde örnek bulunan beher strafor içerisindeki buza yerleştirilip manyetik karıştırıcıda 80 x rpm’de her saat başı diyaliz suyu değiştirilmek üzere 5 saat boyunca saf suya karşı diyaliz yapılmıştır. Tüm salgı örnekleri için aynı işlem basamakları tekrarlanmıştır ve tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7. Diyaliz Membranına Örnek Yerleştirilmesi

3.2.4. Sterilizasyon

Total protein tayini, SDS-Page elektroforez ve biyoaktivite işlemlerine başlamadan önce oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacıyla sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonucu tuzu uzaklaştırılan salgı örnekleri 0.22 µm enjektör tipi filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Steril hale getirilmiş örnekler daha önceden otoklavlanmış 2 ml kapaklı eppendorf tüplere 500 µl'lik hacimlerde konulup -20 °C'e muhafaza edilmiştir. Diyalizle tuzu uzaklaştırılmış ve steril hale getirilmiş örneklerin konsantrasyonunu artırmak amacıyla tekrar Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları (MATAL)'nda Christ Alpha 1-2 LD Plus Lyophilizer cihazı kullanılarak 6-8 saat liyofilizasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8. Örneğin Sterilizasyonu

3.2.5. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemiyle Total Protein Miktar Tayini

Total protein tayini için BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılmıştır. Bu yöntem mikro ölçekte, 96 kuyucuklu plaklar kullanılarak uygulanmıştır.

Standartların Hazırlanması

Standartlar, %0,9 tuz, %0,05 sodyum azid ve 2 mg/ml konsantrasyonunda stok sığır serum albumin (BSA, Pierce) içeren ampullerden tablo 3.1 'e göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. BCA Yönteminde Standartların Hazırlanması (Temizkan ve Arda, 2017)

Şişe kodu	Son BSA derişimi (µg/ml)	BSA kaynağı ve alınacak hacim (µl)	Seyreltici hacim (µl)	Toplam hacim (µl)
S1	2000	Stoktan (ampülden) 300	0	300
S2	1500	Stoktan (ampülden) 375	125	500
S3	1000	Stoktan (ampülden) 325	325	650
S4	750	S2' den 175	175	350
S5	500	S3' ten 325	325	650
S6	250	S5' ten 325	325	650
S7	125	S6' dan 325	325	650
S8	25	S7' den 100	400	500
KÖR	0	0	400	400

BCA Reaktif Çözeltisi

BCA protein analiz kitinde bulunan A reaktifi, NaCl (sodyum klorür), bikinkoninik asit, Na₂CO₃ (sodyum karbonat), NaHCO₃ (sodyum bikarbonat), Na₂C₄H₄O₆ (sodyum tartrat) ve NaOH (sodyum hidroksit) içermektedir. B reaktifi ise CuSO₄ (küprük sülfat) içermektedir. A ve B reaktifleri 50:1 oranında karıştırılarak BCA reaktifi elde edilmiştir.

Örneklerin Hazırlanması

- Tüm standartlar, örnekler ve kör' den kuyucuklara 25 µl pipetlenmiştir.
- Ardından standartlar, örnekler ve kör üzerine BCA reaktifinden 200 µl eklenip kapağı kapatılmıştır.
- 96 kuyucuklu plaka 37 °C' de 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan çıkarılan örnekler, soğuması için oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.
- Örnekler Biotek Epoch 2 Microplate Reader cihazında 562 nm' de ölçümleri yapılmıştır.
- Standartların verdiği absorbans değerleri baz alınarak standart grafiği çizilmiş ve eğim denklemi elde edilmiştir.
- Bu denkleme göre her örnek için total protein miktarları hesaplanmıştır.

3.2.6. Elektroforetik Olarak Protein Profillerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada dikey Bio-Rad Mini Protean Tetra Cel elektroforez cihazı kullanılarak Tricine-SDS Page elektroforezi yapılmıştır.

%16 Ayırıştırıcı (Yürütme) Jelin (Resolving Gel) Hazırlanması

- Akrilamid/Bis'ten 5,33 ml alınıp 100 ml'lik behere eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda tüm malzemeler eklenene kadar karıştırılmıştır.
- 2,5 M Tris tamponundan 4,3 ml eklenmiştir.
- Deiyonize sudan 220 µl eklenmiştir.
- TEMED' den 6 µl eklenmiştir.
- APS' den de 100 µl eklenmiştir.
- Manyetik karıştırıcıda homojen hale gelen jel, daha önce ayarlanmış ve işaretlenmiş olan iki plaka arasına işaretlenmiş yere kadar hava kabarcığı bırakılmadan dökülmüştür.
- Dökülen ayırıştırma jelinin üzerine 1 ml distile su eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca polimerleşmeye bırakılmıştır.

%4 Yükleme Jelinin (Stacking Gel) Hazırlanması

- Akrilamid/Bis'ten 0,66 ml alınıp 100 ml' lik bir behere eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda tüm malzemeler eklenene kadar karıştırılmıştır.
- 2,5 M Tris tamponundan 0,76 ml eklenmiştir.
- Deiyonize sudan 3,42 ml eklenmiştir.
- TEMED' den 5 µl eklenmiştir.
- APS' den de 150 µl eklenmiştir.
- Tüm malzemeler manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır.
- Daha önce plakalar arasına dökülen ve polimerleşen %16 ayırıştırıcı jelin üzerindeki saf su kâğıt filtreler yardımıyla çıkarılmıştır.
- Tüm suyun çıkarıldığından emin olduktan sonra pipet yardımıyla %4 yükleme jeli dökülüp ve jel tarağı plakalar arasına yerleştirilmiştir.
- Jel oda sıcaklığında 1 saat boyunca polimerleşmeye bırakılmıştır.

Örneklerin Hazırlanması , Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

- Steril PCR tüplerine her bir türe ait salgı örneklerinden 20 µl konulmuştur.
- Her bir örneğin üzerine yükleme tamponundan 10 µl eklenmiştir
- Örnekler 95 °C' de 3 dk su banyosunda denatüre edilmiştir.
- Daha önceden seyreltilmiş olan Protein Marker (M.W. 1,060-26,600)'dan 5 µl alınıp steril PCR tüpüne konulmuştur.
- Protein marker 65 °C' de 5 dk su banyosunda denatüre edilmiştir.
- Denatüre olan tüm örnekler ve protein marker yüklenmeden önce buz üzerine alınmıştır.
- Klipsler ve jel tarağı dikkatlice jel kasetinden çıkarılmıştır.
- Jel kaseti elektroforez tankına kısa plaka içe gelecek şekilde yerleştirilmiştir.
- Tankın içine 750 ml yürütme tamponu (Running Buffer) konulmuştur.
- 1. kuyucuğa marker olmak üzere tüm örnekler sırayla kuyucuklara yüklenmiştir.
- Örnekler Bio-Rad PowerPac Basic güç kaynağı kullanılarak 125 V' ta 130 dk yürütülmüştür.

Jelin Fiksasyonu ve Boyanması

- Jel kasetlerinden dikkatlice çıkarılan jel cam bir kaba alınıp saf su ile yıkanmıştır.
- Jel %5 gluteraldehit sabitleme solüsyonuna alınarak çalkalayıcıda 150 x rpm' de 25 dk fikse edilmiştir.
- Fiksasyon işlemi sona erdikten sonra jel saf su ile tekrar yıkanıp CBB boyama solüsyonuna alınarak çalkalayıcıda 150 x rpm' de 2 saat boyanmıştır.
- Boyanın giderilmesi için jel, saf sudan geçirilip ardından %10 asetik asit solüsyonunda gece boyu 150 x rpm'de çalkalayıcıda yıkanmıştır.
- Tamamen boyadan arınan jel BioRad ChemiDoc MP System cihazıyla görüntülenmiştir.
- Jeldeki nispi bant yoğunlukları GelAnalyzer programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Plaka Çukur Yöntemi ile Aktivite Tayini

Genel antimikrobiyal tarama testi, kuyucuk difüzyon yöntemi ile Mueller–Hinton agar besiyeri kullanılarak yapılmıştır.

- Çalışma içerisinde *E.coli* ATCC11775, *B. cereus* ATCC 11778, *S.aureus* ATCC 25923 ve *L.monocytogenes* ATCC 1911 tip türleri kullanılmıştır.
- 17 g Mueller–Hinton agar tartılıp 500 ml distile su içinde çözdürülmüştür. Otoklavda 115 °C 'da 10 dakika sterilize edilip, 50 °C 'a soğutulmuştur.
- Mueller–Hinton agar üzerine 5 mm çapında steril olarak kuyucuklar açılmıştır.
- Fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde hazırlanan 0,5 McFarland yoğunluğundaki mikroorganizmalardan 100 mikrolitre inoküle edilerek L baget ile yayılmıştır.
- İnokülasyondan sonra açılan kuyucuklara her türe ait deri salgısı ekstraktlarından 50 ul olacak şekilde aktarılmıştır.
- Petriler 37°C de 24 saatlik inkübasyona bırakıldıktan sonra oluşan zonlar saptanıp mm cinsinden ölçülmüştür.

4.BULGULAR

4.1 Arazi Çalışmaları

Rana macrocnemis

10 Temmuz 2020 tarihinde Bursa/Uludağ/Sarıalan' da arazi çalışması yapılmış fakat yeteri sayıda hayvan bulunamamıştır. 11 Temmuz 2020 tarihinde aynı bölgede gece arazi çalışması yapılarak toplamda 10 birey yakalanmıştır. Rakım 1620 m, hava sıcaklığı 22 °C, su sıcaklığı ise 14 °C olarak ölçülmüştür. Hayvanların vücut ağırlıkları ise 11-18 g arasında değişiklik göstermektedir.

Rana holtzi

31 Temmuz 2020 tarihinde Niğde/Ulukışla/Maden Köyü/Karagöl' de gündüz arazi çalışması yapılmış ve 36 birey yakalanmıştır. Rakım 2608 m, hava sıcaklığı 24 °C, su sıcaklığı ise 20 °C olarak ölçülmüştür. Hayvanların vücut ağırlıkları 8- 15 g arasında değişiklik göstermektedir.

Rana tavasensis

20-21 Nisan 2021 tarihlerinde Denizli/Tavas/Akdağ' da gündüz arazi çalışması yapılmış sadece 2 tane juvenil birey yakalanmıştır. 27 Nisan 2021 tarihinde Antalya/Elmalı/Girdev Gölü'nde gece saatlerinde arazi çalışması yapıldı fakat 1 juvenil birey bulundu. Bu habitatta çok sayıda *Pelophylax caralitanus*, *Pelophylax bedriagae* ve *Bufo bufo* kurbağa türleri tespit edilmiştir. 3-5 Temmuz 2021 tarihlerinde aynı bölgede tekrar gece arazi çalışması yapılmış 20 birey yakalanmıştır. Rakım 1775 m hava sıcaklığı 14 °C, su sıcaklığı ise 17 °C olarak ölçülmüştür. Hayvanların vücut ağırlıkları 10-17 g arasında değişiklik göstermektedir.

Rana dalmatina

10 Temmuz 2020 tarihinde Balıkesir/Susurluk/Yaylaçayır/Serçeören Köyü'nde gündüz saatlerinde ormanlık alanda ve su kenarlarında arazi çalışması yapılmış fakat hayvan bulunamamıştır. 11 Temmuz 2020 tarihinde

Bursa/Uludağ/Zeyniler 'de gündüz arazi çalışması yapılmış *Rana dalmatina* bulunamamıştır. Yine aynı gün Bursa/İnegöl/Dipsizler Köyü'nde bataklık ve sazlık alanlarda çalışma yapılmış fakat hayvan bulunamamıştır. 12-14 Kasım 2021 tarihinde Kırklareli/İğneada/Longoz Ormanları Mert Gölü çevresinde gündüz saatlerinde arazi çalışması yapılmış 2 ergin, 1 juvenil birey yakalanmıştır. 21 Mayıs 2022 tarihinde aynı mevkide tekrar gündüz saatlerinde arazi çalışması yapılmıştır ve 11 birey yakalanmıştır. Rakım 0 (deniz seviyesi), hava sıcaklığı 20 °C, su sıcaklığı ise 16,5 °C olarak ölçülmüştür. Hayvanların vücut ağırlıkları 12-20 g arasında göstermektedir.

4.2. Liyofilizasyon

Liyofilize işlemini yaklaşık 2 gün sürmüştür. 2 gününün sonunda örneklerdeki su tamamen uzaklaştığı, her bir falkon tüpün içerisinde yaklaşık 0,3-0,6 g liyofilize (katı halde) örnek tespit edilmiştir. Her türe ait (*R.dalmatina*, *R. holtzi*, *R.macrocnemis* ve *R. tavasensis*) liyofilize örnekler tek bir falkon tüpüne toplanmıştır.

4.3 Diyaliz Sonuçları

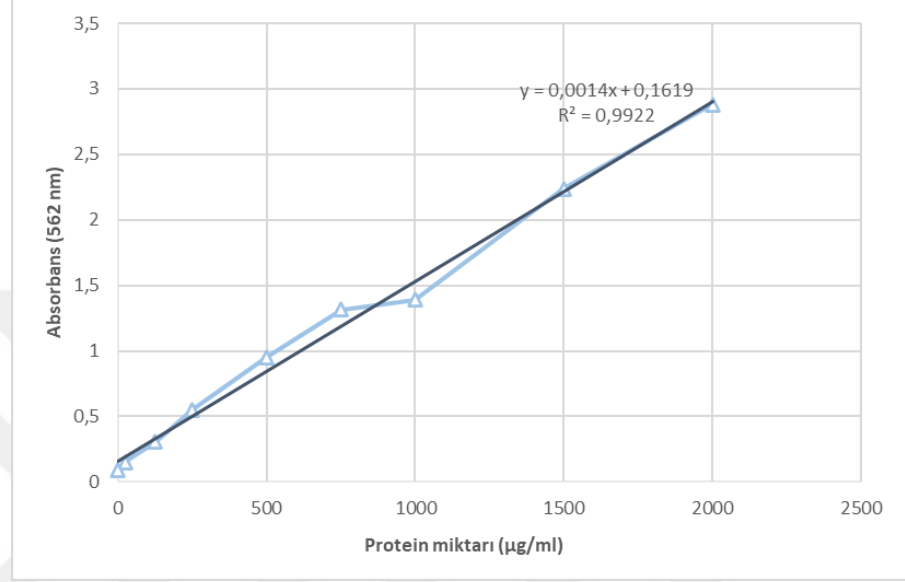
Saf suyun tuz oranı % 0 olarak tespit edilmiştir. Her saat başı diyaliz suyunun tuz oranı ölçülmüş örnekten tuz çıkışının olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu değerler % 2,26-1,9 oranında başlayıp her saat başı diyaliz suyu değiştirmiştir. Bu işlem her örnek için 5 saat sürmüştür ve 5 saatin sonunda diyaliz suyunun %0 olduğu artık tuz çıkışının olmadığı tespit edilmiştir.

4.4. Sterilizasyon

Diyaliz sonunda elde edilen örnekler başlangıçtaki diyaliz tüpüne koyulan örnek miktarıyla aynı yani 2 ml 'dir. Fakat sterilizasyon için kullanılan 0.22 µm enjektör tipi filtreden geçirilen örneklerin bir miktarı 400-500 µl'nin filtre içinde kalarak örnek kaybı yaşandığı tespit edilmiştir.

4.5 BCA Yöntemiyle Total Protein Miktarları

Kısmi olarak saflaştırılmış salgı örneklerinin BCA standart grafiği şekil 4.1'dedir. Bu grafik BSA protein standartlarının 562 nm'de verdikleri absorbanslara göre hazırlanmıştır.



Şekil 4.1. BCA Standart Grafiği ve Denklemler

Her türün salgı örneklerinin protein miktarları grafik üzerinde oluşan denkleme göre hesaplanmıştır. Örneklerin total salgı miktarları çizelge 4.1' de yer almaktadır. En düşük protein miktarı *R. holtzi* en yüksek protein miktarı ise *R. dalmatina* olarak tespit edilmiştir.

TÜR	TOTAL PROTEİN MİKTARI (µg/ml)
<i>Rana holtzi</i>	13,64
<i>Rana tavasensis</i>	18,64
<i>Rana macrocnemis</i>	27,21
<i>Rana dalmatina</i>	92,21

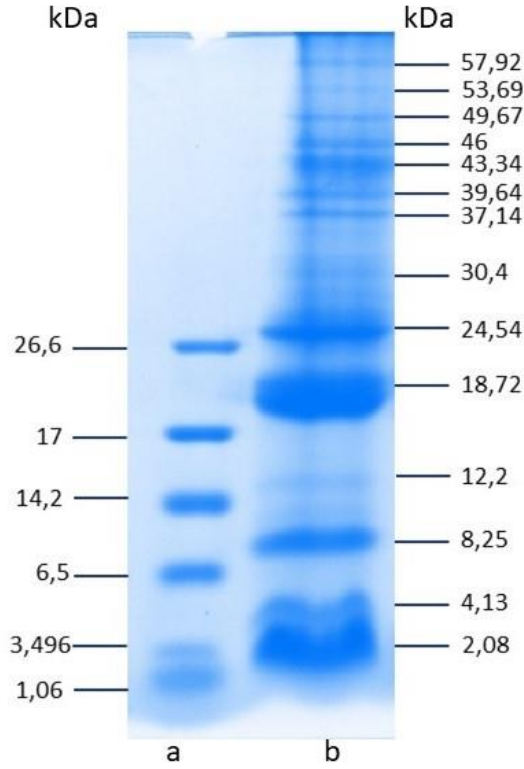
Tablo 4.1. Salgı Örneklerinin Total Protein Miktarları

4.6 Tricine SDS-Page Elektroferez Sonuçları

Türlere ait salgı örneklerinin protein profilleri Tricine SDS-Page elektrofrez ile belirlenmiştir. Elektrofretik analizlerin protein hesaplamaları GelAnalizer programı ile yapılmıştır.

Rana holtzi

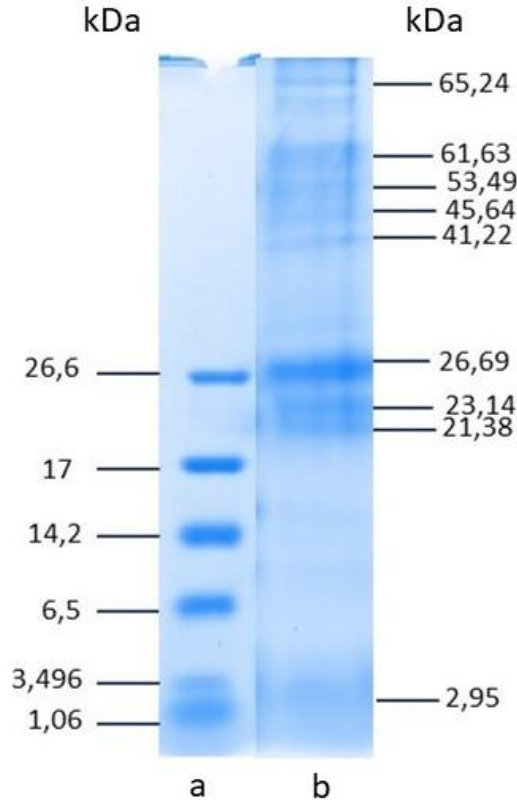
Elektrofretik sonuçlara göre *R.holtzi* salgı örneğinde 2,08 kDa, 4,13 kDa, 8,25 kDa, 12,2 kDa, 18,72 kDa, 24,54 kDa, 30,4 kDa, 37,14 kDa, 39,64 kDa, 43,34 kDa, 46 kDa, 49,67 kDa, 53,69 kDa ve 57,92 kDa ağırlığında 14 farklı peptit belirlenmiştir. 5 kDa 'un altında 2 farklı peptit tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *R. holtzi* Salgı Örneğinin Protein Profilleri a) Marker, b) *R. holtzi*

Rana tavasensis

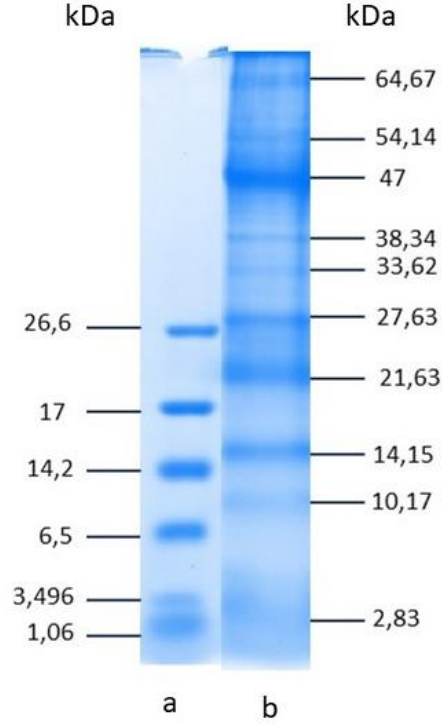
Elektroforetik sonuçlara göre *R.tavasensis* salgı örneğinde 2,95 kDa, 21,38 kDa, 23,14 kDa, 26,69 kDa, 41,22 kDa, 45,64 kDa, 53,49 kDa, 61,63 kDa ve 65,24 kDa ağırlıklarında 9 farklı peptit belirlenmiştir. 5 kDa 'un altında 1 peptit tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *R. tavasensis* Salgı Örneğinin Protein Profilleri a) Marker b) *R tavasensis*

Rana macrocnemis

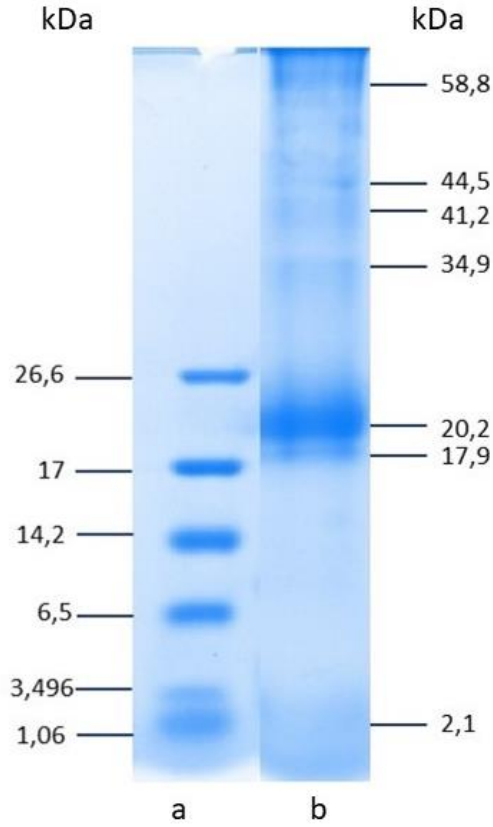
Elektroforetik sonuçlara göre *R.macrocnemis* salgı örneğinde 2,83 kDa, 10,17 kDa, 14,15 kDa, 21,63 kDa, 27,63 kDa, 33,62 kDa, 38,34 kDa, 47 kDa, 54,14 kDa ve 64,67 kDa ağırlıklarında 10 farklı peptit belirlenmiştir. 5 kDa 'un altında 1 peptit tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *R. macrocnemis* Salgı Örneğinin Protein Profilleri a) Marker b) *R. macrocnemis*

Rana dalmatina

Elektroforetik sonuçlara göre *R. dalmatina* salgı örneğinde 2,1 kDa, 17,9 kDa, 20,2 kDa, 34,9 kDa, 41,2 kDa, 44,5 kDa ve 58,8 kDa ağırlıklarında 7 farklı peptit belirlenmiştir. 5 kDa 'un altında 1 peptit tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

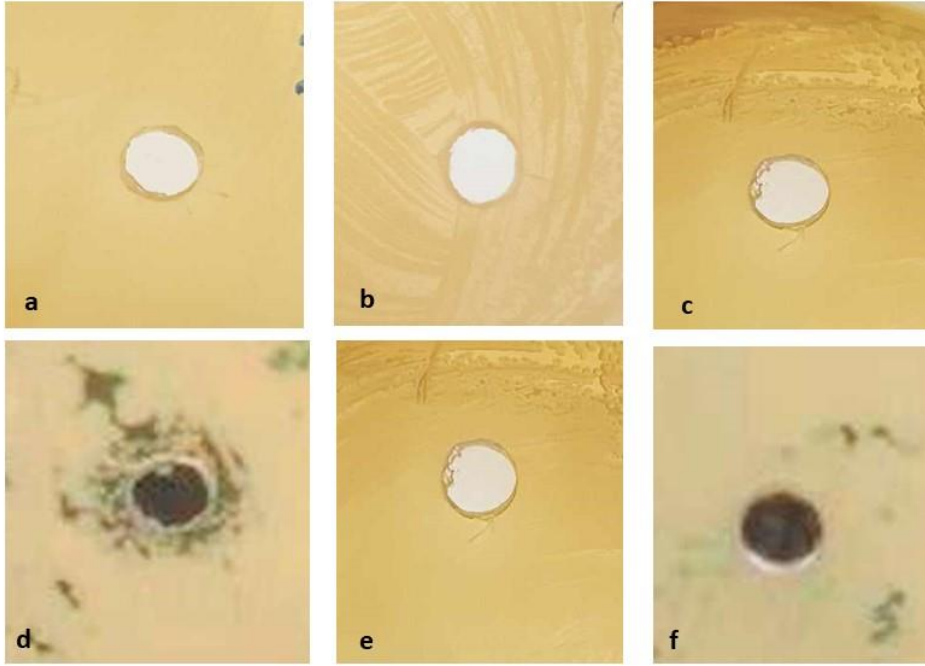


Şekil 4.5. *R. dalmatina* Salgı Örneğinin Protein Profilleri a) Marker b) *R.dalmatina*

4.7. Plaka Çukur Yöntemiyle Aktivite Sonuçları

Rana holtzi

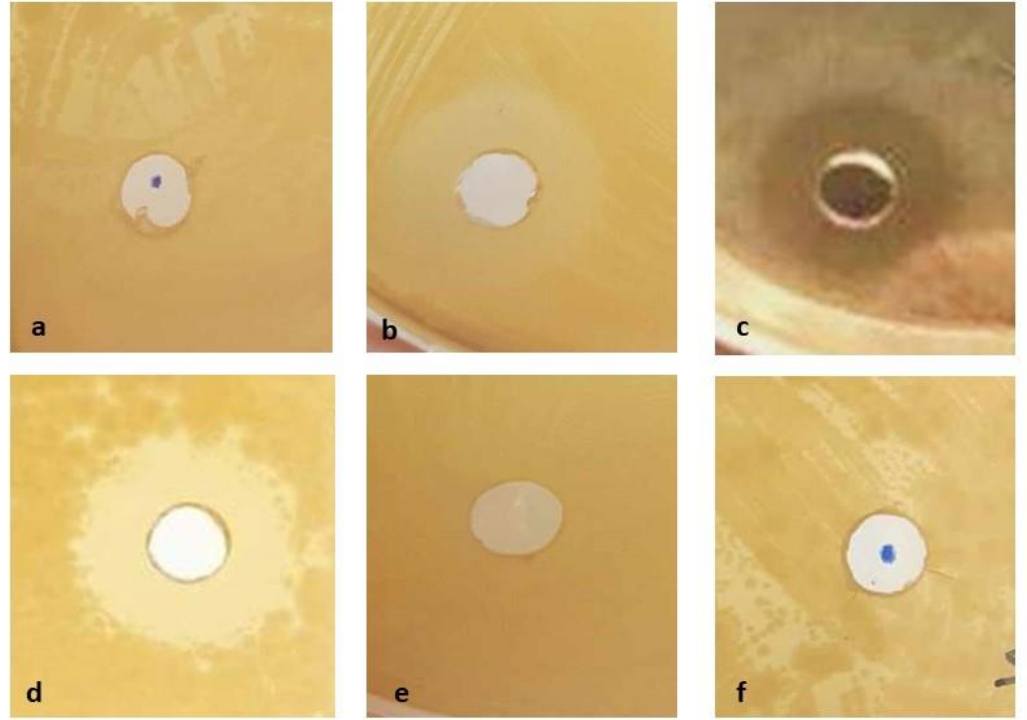
Plaka çukur yöntemiyle *R.holtzi*' ye ait salgı örneği *E. coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes*, *S.typhimurium* üzerinde herhangi bir aktivite göstermeyerek zon oluşturmadığı tespit edilmiştir. *B.cereus* bakteri türü üzerinde aktivite göstermiş, 10 mm' lik bir zon ölçülmüştür.



Şekil 4.6. *R. holtzi* salgı örneğinin aktivite sonucu oluşturduğu zonlar **a)** *E. coli* **b)** *S. aureus* **c)** *L. monocytogenes* **d)** *B. cereus* **e)** *S. typhimurium* **f)** Saf su

Rana tavasensis

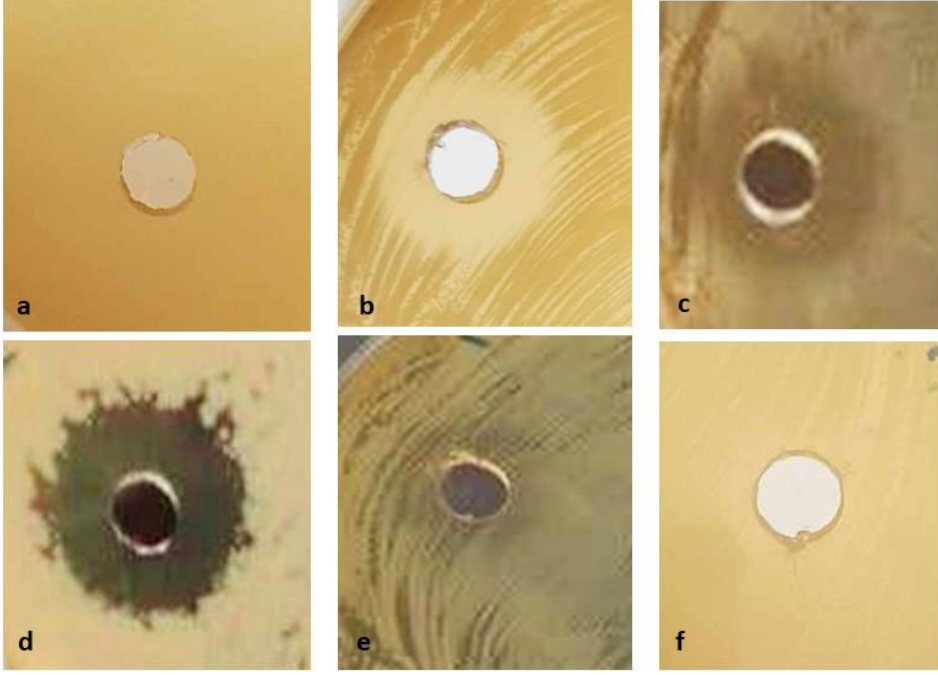
Plaka çukur yöntemiyle *R. tavasensis*' e ait salgı örneği *E. coli* ve *S. typhimurium* bakterileri üzerinde aktivite göstermezken *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* bakterileri üzerinde aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *S. aureus*'da 16 mm, *L. monocytogenes*'de 16 mm ve *B. cereus*'da ise 18 mm'lik zon ölçülmüştür.



Şekil 4.7. *R.tavasensis* salgı örneğinin aktivite sonucu oluşturduğu zonlar a) *E.coli* b) *S.aureus* c) *L.monocytogenes* d) *B.cereus* e) *S.typhimurium* f) Saf su

Rana macrocnemis

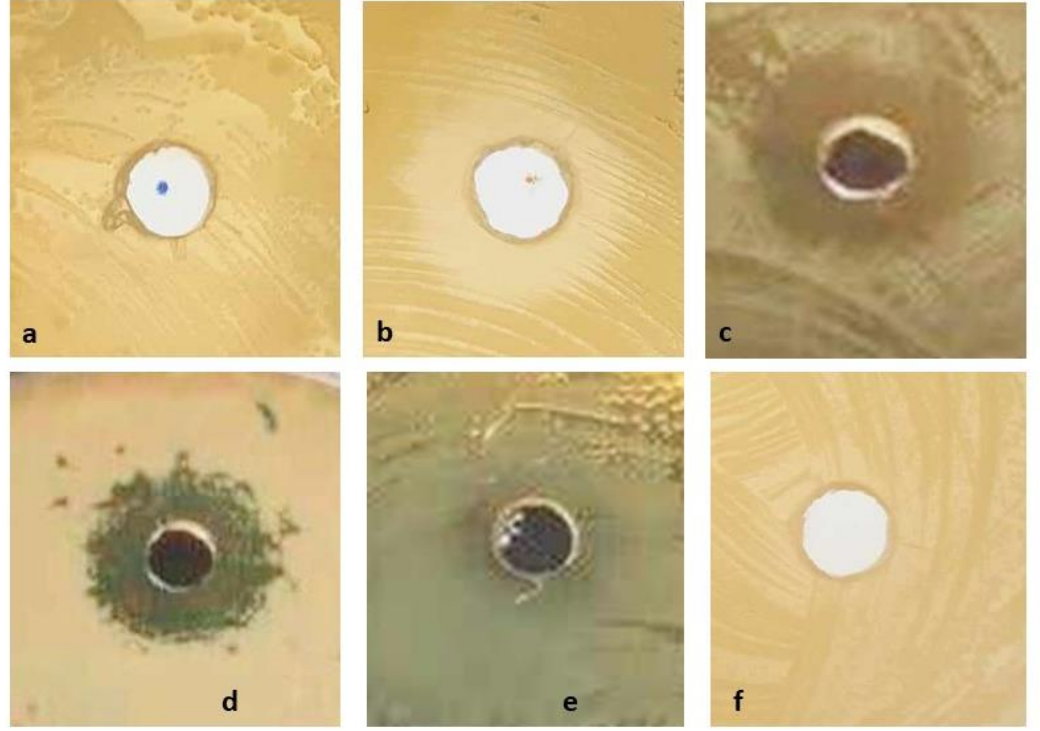
Plaka çukur yöntemiyle *R.macrocnemis*' e ait salgı örneği *E. coli* ve *S.typhimurium* bakterileri üzerinde aktivite göstermezken *S.aureus*, *L.monocytogenes* ve *B.cereus* üzerinde aktivite gösterip zon oluşturduğu tespit edilmiştir. *S.aureus*'da 16 mm, *L.monocytogenes*' de 15 mm ve *B.cereus* 'da ise 20 mm' lik zon oluşturmuştur.



Şekil 4.8. *R. macrocnemis* salgı örneğinin aktivite sonucu oluşturduğu zonlar **a)** *E. coli* **b)** *S. aureus* **c)** *L. monocytogenes* **d)** *B. cereus* **e)** *S. typhimurium* **f)** Saf su

Rana dalmatina

Plaka çukur yöntemiyle *R. dalmatina*'ya ait salgı örneği diğer türlerin salgı örnekleri gibi *E. coli* üzerinde aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Fakat diğer türlerin salgı örneklerinden farklı olarak *S. typhimurium* üzerinde ve diğer bakteri türleri olan *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* üzerinde de aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *S. typhimurium*'da 13 mm *S. aureus*'da 15 mm, *L. monocytogenes*'de 18 mm ve *B. cereus* 'da 18 mm'lik zon oluşturmuştur.



Şekil 4.9. *R. dalmatina* salgı örneğinin aktivite sonucu oluşturduğu zonlar **a)** *E.coli* **b)** *S.aureus* **c)** *L.monocytogenes* **d)** *B.cereus* **e)** *S.typhimurium* **f)** Saf su

5. TARTIŞMA

Tez çalışmasında kullanılan türlerin arazi çalışmaları öncelikle tip lokaliteleri olan bölgelerde yapılmıştır. *Rana macronemis*' in farklı araştırmacılar tarafından gerek tip lokalitesi olan bölgelerde gerek farklı lokalitelerde de arazi çalışmaları sonucu varlığı tespit edilmiştir (Tablo 5.1).

Lokalite	Referans
Bursa/Uludağ/Sarıalan	Arserim ve Mermer, 2008; Çicek, 2011
Bursa/Uludağ/Kirazlıyayla	Çicek,2011
Bursa/Uludağ/ Kilimli Göl	Çicek,2011
Bursa/Uludağ/ Kara Göl	Çicek,2011
Eskişehir/Yazılıkaya	Yıldırımhan et al., 2006
Ordu/Çambaşı Platosu	Yıldırımhan et al.,2006
Kütahya/Emet/Eğrigöz Dağı	Ilgaz et al., 2019
Artvin/Borçka	Afşar et al., 2011
Konya/Ereğli/Seviçova	Baran et al.,2007
Elâzığ/Maden/Örtülü Köy	Baran, et al.,2007
Antalya /Taşkesiği	Heckmann et al., 2011
Rize/Ovit Platosu	Karaca et al.,2017; Kutrup et al.,2011
Hakkâri/Berçelan	Afşar et al.,2015
Trabzon/Akçaabat/Hıdırnebi Yaylası	Kutrup et al.,2011

Trabzon/Maçka	Kutrup et al.,2011
Kars/ Sarıkamış	Kutrup et al.,2011

Tablo 5.1. *Rana macronemis* 'in Ülkemizdeki Dağılışı

Bu çalışmada *R. macrocnemis* türleri Arserim ve Mermer (2008) ve Çicek 'in de (2011) belirtmiş olduğu gibi Bursa/ Uludağ/ Sarıalan mevkinde arazi çalışması sonucu toplanmıştır.

Rana dalmatina 'nın arazi çalışmaları kapsamında ülkemizde farklı lokalitelerde bulunduğu belirtilmiştir (Tablo 5.2). *R.dalmatina* türleri için Bursa/İnegöl/Dipsizler Köyü'nde arazi çalışması yapılmış fakat hiç birey bulunamamıştır. Çalışmamızda, Ilgaz ve Kumlutaş'ın da (2005) belirttiği gibi *R.dalmatina* türleri Kırklareli/İğneada/Longoz Ormanları'nda toplanmıştır.

Lokalite	Referans
Bursa/Karacabey	Düşen et al., 2009
Bursa/İnegöl	Düşen et al., 2009
Bursa/Kemalpaşa	Düşen et al., 2009
Bursa/Uludağ	Heckmann et al., 2011
Sakarya/Akyazı	Düşen et al., 2009; Heckmann et al., 2011
Sakarya/Karasu	Düşen et al., 2009
Yalova/Çınarcık	Yıldırımhan et al., 2016
Trabzon/ Çaykara	Yıldırımhan et al., 2016
Kırklareli/İğneada	Ilgaz and Kumlutaş, 2005

Tablo 5.2. *Rana dalmatina* 'nın Ülkemizdeki Dağılışı

Ülkemiz için endemik bir tür olan *Rana holtzi* için yapılan çalışmalarda araştırmacılar üç farklı lokalite olduğunu tespit etmişlerdir (Tablo 5.3). Bizim çalışmamızda bireyler Yıldız ve Göçmen (2012), Yoldaş ve Erişmiş (2021)'in araştırmalarındaki gibi Niğde/Ulukuşla/Karagöl'de toplanmıştır.

Lokalite	Referans
Mersin/Çamlayayla/Eğrigöl	Baran et al., 2007
Niğde/Ulukuşla/ Karagöl	Yıldız and Göçmen, 2012; Yoldaş and Erişmiş, 2021
Niğde/Ulukuşla/Çinigöl	Yıldız and Göçmen, 2012; Guarino and Erişmiş, 2008,

Tablo 5.3. *Rana holtzi*'nin Ülkemizdeki Dağılışı

Rana tavasensis de ülkemiz için endemik bir diğer türdür. Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (IUCN) Tehdit Altındaki Türler Kırmızı Listesinde yer almaktadır ve sınırlı coğrafi dağılımı ve 2009'dan bu yana azalan nüfus büyüklüğü nedeniyle nesli tükenmekte olan tür olarak sınıflandırılmıştır (IUCN, 2016). Tip lokalitesi Denizli/Tavas/Akdağ/Çakıroluk'tur. Fakat farklı araştırmacılar farklı lokalitelerde de varlığını bildiren çalışmalar yapmışlardır (Tablo5.4). Bu çalışma kapsamında *R. tavasensis* için Denizli/Tavas/Akdağ/ Çakıroluk mevkinde arazi çalışması yapılmış fakat sadece 1 juvenil birey bulunmuştur. Daha sonra Franzen ve arkadaşlarının (2008) da belirttiği gibi Antalya/Elmalı/Girdev Gölü'nde arazi çalışması yapılarak türler toplanmıştır.

Lokalite	Referans
Denizli/Tavas/Akdağ/Çakıroluk	Düşen,2012; Çapar and Başkale, 2016
Antalya/Elmalı/Girdev Gölü	Franzen et al. 2008
Muğla/Atlidere	Kalaycı and Özdemir, 2018

Tablo 5.4. *Rana tavasensis*' in Ülkemizdeki Dağılışı

Ujszegi ve arkadaşları (2021) norepinefrin (NE) enjeksiyonu yaparak, Li ve arkadaşları (2007) da hayvanları susuz eter buharına maruz bırakarak deri salgılarını elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise deri salgıları Wang ve arkadaşlarının (2009) ve El Haj Moussa ve arkadaşlarının (2015) çalışmalarındaki gibi elektrik stimülatörü ile elektrik uygulanarak toplanmıştır.

Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'daki Rana cinsinde bulunan antimikrobiyal peptitler 10-47 aminoasit (aa) rezidü uzunluğundadır. Sekans benzerliklerine göre 13 farklı peptit familyası tanımlanmıştır (Goraya et al., 2000). Bunlar; brevinin-1 ve brevinin-2 familyaları (Morikawa et al.,1992), esculentin-1, esculentin-2 familyaları (Simamaco et al., 1994) ranatuerin-1, ranatuerin-2 (Goraya et al.,1998), ranalexin (Clark et al.,1994), palustrin-1, palustrin-2, palustrin-3 familyaları (Basir et al., 2000), tigrinin familyası (Sai, et al., 2001) ve japonicin-1, japonicin-2 familyasıdır (Isaacson et al., 2002). Rana üyelerinde bulunan başka bir peptit familyası ise temporinlerdir, bunlar 10-13 aa rezidüden oluşan kısa peptitlerdir (Simmaco et al., 1996). Her ne kadar bu familyalara ait peptitlerin Rana cinslerinin deri salgılarında bulunduğunu söylesek de farklı gruplarda da bulunabilirler. *Pelophylax ridibundus* 'un deri salgısında da 2,48 kDa ve 2,66 kDa ağırlıklarında brevinin ailesine ait iki peptit bulunmuştur (Asoodeh et al.,2012).

R. dalmatina 'nın kısmi olarak saflaştırılmış deri salgılarında 5 kDa 'un altında 2.1 kDa ağırlığında bir peptit belirlenmiştir. *R.dalmatina* larvalarında yapılan bir çalışmada ise norepinefrin (NE) enjeksiyonu sonrası alınan salgılar yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile saflaştırılarak 1 kDa ağırlığında bir peptit tespit edilmiş ve Brevinin adlı antimikrobiyal peptit olduğu belirtmiştir (Ujszegi et al., 2021). Farklı Rana türlerinin çoğunda bulunan Brevinin ailesi peptitler ilk olarak *R. brevipoda porsa*'nın deri salgısında elde edilen Brevinin-1 ve Brevinin -2 peptitleri tanımlanmıştır. (Morikawa et al.,1992).

Tez çalışmamızda kullanılan diğer türlerin ise (*R. macronemis*, *R. holtzi*, *R.tavasensis*) daha önce deri salgılarındaki protein profilleri belirlenmemiş ve bu türlerin AMP profilleri ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada ise elektroforetik sonuçlara göre *R. macronemis*' in salgısında 2,83

kDa, *R. tavasensis* ' in salgısında 2,95 kDa, *R.holtzi*' nin salgısında ise 2,08 kDa ve 4,13 kDa ağırlığında peptitler olduğu belirlenmiştir.

Literatürde farklı Rana türlerinin deri salgılarındaki AMP'lerle ilgili çalışmalar da mevcuttur. *R. temporaria* deri salgında 1,963 kDa ağırlığında Brevinin familyasında 1 peptit belirlenmiştir (Samgina et al., 2011). Yine *R.temporaria* üzerinde Nikolaieva ve arkadaşlarının (2018) yapmış oldukları %12 lik SDS- PAGE elektroforetik çalışmalarda ise 11 kDa ağırlığının altında herhangi bir peptit tespit edilmemiştir.

R.esculenta deri salgısında brevinin ailesine ait 12 kDa, 3,18 kDa ve 3,30 kDa olmak üzere 3 peptit, temporin ailesinden de 1,41 kDa ağırlığında 1 peptit tespit edilmiştir (Ali et al.,2003).

Başka bir rana türü olan *R. boyllii* deri salgısında ise yine brevinin ailesinden 2,60 kDa, 2,57 kDa ve 2,52 kDa olmak üzere 3 peptit, ranatuerin ailesinden 3,30 kDa ve 2,87 kDa olmak üzere 2 peptit, temporin ailesinden de 1,38 kDa olmak üzere 1 peptit belirlenmiştir (Conlon et al.,2003)

R.pleuraden deri salgısında 5 kDa 'un altında 3,04 ve 3,02 kDa olmak üzere ve diğer rana türlerinden farklı olarak da pleurain A1 ve pleurain A2 olarak isimlendirilen 2 peptit belirlenmiştir (Wang et al., 2007).

R. dybowskii deri salgısında ise ağırlıkları 1,902 ila 2,27 kDa arasında değişen Dybowskin-1, Dybowskin-2, Dybowskin-3, Dybowskin-4, Dybowskin-5 ve Dybowskin-6 olmak üzere 6 yeni peptit izole edilmiştir (Kim et al.,2007).

Kurbağalar mikrop yüklü ortamlarda bile hayatta kalmak için başarılı stratejiler geliştirirler. Bu hayvanların deri salgıları geniş spektrumlu, sitolitik antimikrobiyal özellikli peptitlerin zengin bir deposunu içermektedir (Zaslof, 2002). AMP'ler bakteri, virüs, mantar ve parazitlere karşı geniş spektrumlu mikrobiyosidal aktiviteye sahip hızlı etki gösterdiklerinden dolayı yeni nesil antibiyotiklere aday gösterilmişlerdir.

2050 yılına kadar antimikrobiyal direnç (AMR)'ten yılda 10 milyon insanın hayatını kaybedeceği tahmin ediliyor (O'Neill, 2016). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 22 ülkedeki AMR'li bakterilerin en az 500.000 kişiyi enfekte ettiğini bildirmiştir (WHO, 2018). Bu yaygın dirençli bakteriler arasında *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.aureus*, *S. pneumoniae* ve *Salmonella pp.* bulunur (Fleming, 1945).

Bu çalışmada *R.dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. tavasensis* ve *R. holtzi* 'nin kısmı olarak saflaştırılmış deri salgılarının *E.coli*, *S.aureus*, *B.cereus*, *S.typhimurium* ve *L.monocytogenes* bakterileri üzerinde aktivite tayinleri yapılmıştır.

Conlon ve arkadaşları (2004) *R.dalmatina* deri salgısında Brevinin-1 peptidini izole edip *E. coli* ve *S.aureus* üzerinde orta dereceli etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Yapmış oldukları Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) testlerine göre *S. aureus* için konsantrasyon 7 μ M iken *E. coli* için konsantrasyonun 30 μ M olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise kısmi olarak saflaştırılmış *R. dalmatina* 'nın deri salgısı *E. coli* üzerinde aktivite göstermezken *S. aureus* 'da 15 mm, *L. monocytogenes*'de 18 mm, *B. cereus*'da 18 mm ve *S. typhimurium*'da ise 13 mm zoon göstermiştir. *E. coli* 'nin diğer bakterilere göre *R. dalmatina* deri salgına karşı daha dirençli olduğunu söyleyebiliriz.

Afsar ve arkadaşlarının (2011) *R. macrocnemis* deri salgı üzerindeki çalışmalarında salgılar 80 °C' de su banyosunda 30 dakika bekletilip santrifüjlenmiştir ve santrifüjden sonra bizim çalışmamızın aksine pellet (çökelti) kısmı alınarak çalışılmıştır. Alınan pellet distile su, 0,1 N HCl, 0,1 N NH₄OH ve 1 M fosfat tamponları ile seyreltilmiş ve aktivite tayinleri yapılmış. Distile suyla seyreltikleri pelletin *E.coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* ve *B. cereus* üzerinde herhangi bir aktivite olmadığını vurgulamışlardır. Biz çalışmamızda ise 0,1 M NaCl ve 0,01 M EDTA (pH: 8) içeren yıkama solüsyonuna alınan salgıların santrifüj işleminden geçtikten sonra süpernatantları alınmıştır. Bu süpernatantlar liyofilize edildikten sonra tuzu uzaklaştırmak amacıyla diyaliz yapılmış ve tekrar liyofilize edildikten sonra aktivite tayinleri yapılmıştır. Yapılan plaka çukur aktivite tayinlerine göre ise *R. macrone-mis*'in kısmi olarak saflaştırılmış salgı örnekleri *E. coli* ve *S. typhimurium* üzerinde aktivite göstermezken *S. aureus* 'da 16 mm, *B. cereus* 'da 20 mm ve *L. monocytogenes* 'de ise 15 mm zoon göstermiştir.

Ülkemize endemik olan *R. tavasensis* ve *R. holtzi* için deri salgısı çalışmaları literatürde yoktur. Bu çalışmada *R. tavasensis*' in deri salgıları *E. coli* ve *S. typhimurium* üzerinde aktivite göstermezken *S. aureus* ' da 16 mm, *B. cereus*'da 18 mm ve *L. monocytogenes*' de 16 mm zon oluşturmuştur. *R. holtzi*'nin deri salgıları ise *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* ve *L. monocytogenes* 'de hiçbir aktivite göstermezken sadece *B. cereus* üzerinde 13 mm zon oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki diğer türlere kıyasla en az aktivite gösteren *R. holtzi*' ye ait salgı örneği olmuştur. *R. holtzi*, diğer rana türlerine oranla daha izole bir alanda yaşadığı için farklı mikroorganizmalara karşı bağışıklık kazanmamış olabileceği düşünülmektedir.

Ülkemizde yaşamayan farklı Rana türlerine ait salgı aktivite çalışmaları da yapılmıştır. *R. esculenta*'dan izole edilen temporin-1Ec *E. coli* üzerinde aktivite göstermezken *S. aureus* üzerinde aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Ali et al.,2003). Guatam ve Jangir' in (2016) yapmış oldukları *R. cynophlyctis* deri salgısının çalışmasında ise bizim çalışmamızda kullandığımız yıkama solüsyonu (0,1 M NaCl + 0,01 M EDTA) kullanarak salgılar toplanmış, fakat sonrasında diyaliz yapılarak NaCl ve EDTA uzaklaştırılmamıştır. Yıkama solüsyonu + salgı içeren örnekler *E. coli* üzerinde 13 mm, *S. aureus* üzerinde ise 15 mm zon oluşturduğunu bildirmişlerdir. Yine bir Rana türü olan *R. pleuradan* salgısına ait MIC testlerine göre *S.aureus* için 15 µg/ml konsantrasyon uygulanırken *E. coli* için 60 µg/ml salgı konsantrasyonu uygulanmıştır (Wang et al., 2007). Hem bizim hem de diğer araştırmacıların çalışmalarını değerlendirdiğimizde diğer bakterilere oranla gram negatif bakteri olan *E. coli*' nin Rana türlerinin salgılarına karşı daha dirençli olduğunu söyleyebiliriz.

El Haj Moussa ve arkadaşları (2015) Ranidae familyasına ait *Pelophylax ridibundus* deri salgısında plaka çukur testleri yapmış ve *E. coli* üzerinde 17 mm' lik bir oluşturduğunu söylemişlerdir.

Farklı anur türlerinden Hylidae familyası üyelerinden *Hyla punctata*' nın deri salgısında MIC testlerine göre *S. aureus*' a 8 µM konsantrasyonda uygulanırken *E. coli*' ye 32 µM konsantrasyon uygulanmıştır. *Hyla biobeba*'nın deri salgısı örneklerinde ise MIC testlerine göre *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde konsantrasyon belirlenmemiştir (Siano et al., 2014).

Yapmış olduğumuz plaka çukur aktivite tayininde en çok aktiviteyi *R.dalmatina*'nin deri salgısı gösterirken, en az aktiviteyi *R. holtzi*'nin deri salgısı gösterdiğini tespit ettik. *R.holtzi*'nin deri salgısının bu kadar az aktivite göstermesi yaşadığı soğuk ve yüksek habitata bağlanabilir. Çünkü çevre sıcaklığı ile amfibi deri salgısındaki antimikrobiyal peptit üretimi arasında orantısal bir bağlantı vardır. Güneydoğu Avustralya'daki *Litoria peronii*'de (Peron Ağaç Kurbağası), kışın iki antimikrobiyal peptitin üretiminin azaldığı tespit edilmiştir (Bilusich et al.,2009). Benzer şekilde, tropik Avustralya'daki *Litoria rothii*'de de (Roth' un Ağaç Kurbağası) (*Litoria rothii*) yalnızca yaz aylarında antimikrobiyal peptitler ürettiği görülüyor (Sherman et al., 2009).

AMP'lerin sekansları bir amfibi türünden diğerine önemli ölçüde farklılık gösterir. Bir kurbağa deri salgısı 10-20 farklı antimikrobiyal özellikli peptit içerebilir ve farklı etki spektrumuna sahip olabilir. AMP'lerin gösterdikleri etkiler farklı familyalara, cinslere, türlere hatta alttürlerle ait kurbağalarda farklılık gösterir (Duellman and Trueb, 1994).

Veith ve arkadaşlarının (2003), Kalaycı ve arkadaşlarının (2017) mitokondiyal ribozom gen analizleri sonuçları *R.holtzi* ve *R.macronemesis* 'in sinonim olduğunu belirtmişken Çevik ve arkadaşları (2006) yapmış oldukları serolojik çalışmalarda ayrı türler olduğunu söylemişlerdir. Bizim çalışmamızda da hem protein profilleri hem de plaka çukur aktivite sonuçları her iki türde de farklı çıkmıştır. Bu sonuçlara göre *R. holtzi* ve *R.macronemesis* 'i ayrı türler olarak değerlendirmeyi uygun bulmaktayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ülkemizde dağılışı gösteren Rana türlerine (*R. dalmatina*, *R. macrocnemis*, *R. tavasensis*, *R. holtzi*) ait deri salgılarındaki AMP'ler araştırılmıştır. Arazi çalışmaları sonucu sahadan toplanan bireylere stimülatör yardımıyla elektrik uygulanarak salgıları toplanmıştır. Alınan salgılar diyaliz yapılarak tuzu uzaklaştırılmış ve Tricine SDS-Page elektroforezi ile protein profilleri incelenmiştir. Farklı boyutlarda peptitlerin varlığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda her bir türe ait salgı örnekleri gram-negatif (*E. coli* ve *S. typhimurium*) ve gram-pozitif (*S. aureus*, *B. cereus* ve *L. monocytogenes*) bakteri üzerinde plaka çukur tayin yöntemiyle aktivitelerine bakılmıştır. Bu aktivite sonuçlarına göre her bir kurbağa türü en az bir bakteri üzerinde aktivite göstermiştir. En çok inhibisyon zonu oluşturan tür *R. dalmatina* iken en az inhibisyon zonunu *R. holtzi* göstermiştir.

Deri salgıları toplanırken literatürdeki bazı çalışmalarda saf su kullanırken bazı çalışmalar da ise 0,01 M EDTA içeren 0,1 M NaCl (pH 8) 'lü solüsyon kullanmışlardır. Biz de çalışmamızda 0,01 M EDTA içeren 0,1 M NaCl (pH 8)' lü solüsyonu kullanarak salgıları topladık. Fakat örnek içerisindeki tuzu uzaklaştırmak için diyaliz yapmamız gerekti. Salgılar saf suya alınarak fazladan işleme tabi tutulmadan çalışılabilirdi. Yine amfibi AMP' lerinin elektroforetik olarak protein profillerinin belirlenmesi için literatürde sadece HCl -SDS Page elektroforez yöntemi kullanılmış. Biz de bu yöntemi kullandık fakat AMP' ler gibi küçük ağırlığa sahip peptitleri jelde görüntüleyemedik. Bu yöntemin küçük peptitler için uygun olmadığını fark ettik. Sonra daha duyarlı ve hassas bir yöntem olan Tricine -SDS Page elektroforez yöntemini denedik ve bu yöntemle en küçük peptitleri bile tespit edebildik. AMP' ler gibi küçük ağırlıktaki peptitler için Tricine-SDS Page elektroforez yöntemini önermekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Afsar, B., Afsar, M., & Kalyoncu, F., 2011.** 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.
- Afsar, M., Afsar, B., & Arikan, H., 2015.** Classification of the mountain frogs of the Berçelan Plateau (Hakkâri), east Anatolia (Turkey). *Herpetozoa*, 28(1-2), 15-27 pp.
- Ali, M. F., Knoop, F. C., Vaudry, H., & Conlon, J. M., 2003.** Characterization of novel antimicrobial peptides from the skins of frogs of the *Rana esculenta* complex. *Peptides*, 24(7), 955-961 pp.
- Anderson, E. S., Ward, L. R., de Saxe, M. J., & De Sa, J. D. H., 1977.** Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *Epidemiology & Infection*, 78(2), 297-300 pp.
- Arserim, S. K., & Mermer, A., 2008.** Hematology of the Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 25(1), 39-46 pp.
- Asoodeh, A., Zardini, H. Z., & Chamani, J., 2012.** Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (*Rana ridibunda*). *Journal of Peptide Science*, 18(1), 10-16 pp.
- Baran, İ., Avcı, A., Kumlutaş, Y., & Olgun, K., Ilgaz, Ç., 2021.** Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri, Palme Yayınevi, 2028, Ankara, 223s.
- Baran, İ., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Olgun, K., Avcı, A., & İret, F., 2007.** On new populations of *Rana holtzi* and *Rana macrocnemis* (Ranidae: Anura). *Turkish Journal of Zoology*, 31(3), 241-247.
- Barra, D., & Simmaco, M., 1995.** Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends in biotechnology*, 13(6), 205-209 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bilusich, D., Jackway, R. J., Musgrave, I. F., Tyler, M. J., & Bowie, J. H. (2009).** The host-defence skin peptide profiles of Peron's Tree Frog *Litoria peronii* in winter and summer. Sequence determination by electrospray mass spectrometry and activities of the peptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 23(17), 2628-2636 pp.
- Bolinteanu, D. S., & Kaznessis, Y. N., 2011.** Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: a review. *Peptides*, 32(1), 188-201 pp.
- Boman, H. G., 2003.** Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of internal medicine*, 254(3), 197-215 pp.
- Britannica, I. E., 2008.** Britannica Illustrated Science Library Fish and Amphibians, 100p.
- Brogden, K. A., 2005.** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature reviews microbiology*, 3(3), 238-250 pp.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., & Jawetz, M., 2007.** Adelberg's medical microbiology. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 7(3), 273 pp.
- Budak, A., & Göçmen, B., 2008.** *Herpetoloji*. Ege Üniversitesi. 230 s.
- Calderón, R. O., & DeVries, G. H., 1997.** Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a Schwann cell line. *Journal of neuroscience research*, 49(3), 372-380 pp.
- Cannatella, D. C., 2007.** An integrative phylogeny of Amphibia." *Hearing and sound communication in amphibians*. New York, NY: Springer New York, 2007. 12-43p.
- Capar, D., & Başkale, E., 2016.** Population size of endemic *Rana tavasensis* in its terra typica, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 40(5), 729-733 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Çevik, İ.E., Arıkan, H., Kaya, U. and Atatür, M.K., 2006.** Comparative morphological and serological studies of three Anatolian Mountain frogs, *Rana macrocnemis*, *R. camerani* and *R. holtzi* (Anura, Ranidae), *Amphibia-Reptilia*, 27: 63–71 pp.
- Clark, D. P., Durell, S., Maloy, W. L., & Zasloff, M., 1994.** Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14), 10849-10855 pp.
- Clarke, B. T., 1997.** The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews*, 72(3), 365-379 pp.
- Conlon, J. M., Sonnevend, A., Patel, M., Davidson, C., Nielsen, P. F., Pal, T., & 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(5), 207-213 pp.
- Conlon, J. M., Seidel, B., & Nielsen, P. F., 2004.** An atypical member of the brevinin-1 family of antimicrobial peptides isolated from the skin of the European frog *Rana dalmatina*. *Comparative biochemistry and physiology part C: Toxicology & Pharmacology*, 137(2), 191-196 pp.
- Conlon, J. M., & Mechkarska, M., 2014.** Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family Pipidae. *Pharmaceuticals*, 7(1), 58-77 pp.
- Cowan, M. K., 2011.** Microbiology: a system approach Marjorie Kelly Cowan. Kathleen Parc Talaro-, 312-338p.
- Crump, M. L., 2009.** Amphibian diversity and life history. *Amphibian ecology and conservation. A handbook of techniques*, 3-20p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Çiçek, K., 2011.** Food composition of Uludağ frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ (Bursa, Turkey). Food Composition of Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ (Bursa, Turkey), 87-99 pp.
- Demas, G., Nelson, R. J., & Nelson, R. (Eds.), 2012.** Ecoimmunology. OUP USA.92-144p.
- Demirsoy, A., 1996.** Amfibiler: Türkiye omurgalıları: Türkiye omurgalı faunasının sistematik ve biyolojik özelliklerinin araştırılması ve koruma önlemlerinin saptanması. Çevre Bakanlığı Çevre Koruma Genel Müdürlüğü. 69 s.
- Demori, I., El Rashed, Z., Corradino, V., Catalano, A., Rovegno, L., Queirolo, L., ... & Grasselli, E., 2019.** Peptides for skin protection and healing in amphibians. *Molecules*, 24(2), 347.
- Drobniewski, F. A., 1993.** *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6(4), 324-338 pp.
- Dubos, R. J., 1939.** Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 70(1), 1 pp.
- Duda Jr, T. F., Vanhoye, D., & Nicolas, P., 2002.** Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. *Molecular biology and evolution*, 19(6), 858-864 pp.
- Düşen, S., Uğurtaş, İ. H., Aydoğdu, A., & Oğuz, M. C., 2009.** The helminth community of the agile frog, *Rana dalmatina* Bonaparte, 1839 (Anura: Ranidae) collected from Northwest of Turkey. *Helminthologia*, 46, 177-182 pp.
- Düşen, S., 2012.** First data on the helminth fauna of a locally distributed mountain frog, "Tavas frog" *Rana tavasensis* Baran & Atatür, 1986 (Anura: Ranidae), from the inner-west Anatolian region of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 36(4), 496-502 pp.
- El Haj Moussa, A., Olama, Z., Moussad, E., Kavunja, H., & El-Dakdouki, H., 2015.** Characterization of anuran skin peptides: An alternative to the classical

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- therapeutic agents used for MDR pathogens. *Int. J. Curr. Microbiol. App Sci*, 4(16), 889-900 pp.
- Fan, L., Sun, J., Zhou, M., Zhou, J., Lao, X., Zheng, H., & Xu, H., 2016.** DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides. *Scientific reports*, 6(1), 24482 pp.
- Fleming, A., 1945.** Penicillin—Its Discovery, Development, and Uses in The Field of Medicine and Surgery. *The Journal of the Royal Institute of Public Health and Hygiene*, 8(2), 36-49 pp.
- Franzen M, Bubmann M, Kordges T, Thiesmeier B., 2008.** Die Amphibien und Reptilien der Südwest-Türkei. Berlin, Germany: Laurenti-Verlag (in German).30 (3), 446-446 p.
- Fontana, M. F., Ask, K. A., Macdonald, R. J., Carnes, A. M., & Staub, N. L., 2006.** Loss of traditional mucous glands and presence of a novel mucus-producing granular gland in the plethodontid salamander *Ensatina eschscholtzii*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 87(3), 469-477 pp.
- Gomes, A., Giri, B., Saha, A., Mishra, R., Dasgupta, S. C., Debnath, A., & Gomes, A., 2007.** Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development pp.
- Goraya, J., Knoop, F. C., & Conlon, J. M., 1998.** Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biochemical and biophysical research communications*, 250(3), 589-592 pp.
- Goraya, J., Wang, Y., Li, Z., O'Flaherty, M., Knoop, F. C., Platz, J. E., & Conlon, J. M., 2000.** Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*. *European Journal of Biochemistry*, 267(3), 894-900 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Goulet, V., Jacquet, C., Martin, P., Vaillant, V., Laurent, E., & De Valk, H., 2006.** Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003. *Eurosurveillance*, 11(6), 3-4 pp.
- Gautam, S., & Jangir, O. P., 2016.** Study of Antimicrobial Effect of Rana cyanophlyctis Skin Bioactive Molecules pp.
- Guarino, F. M., & Erismis, U. C., 2008.** Age determination and growth by skeletochronology of Rana holtzi, an endemic frog from Turkey. *Italian Journal of Zoology*, 75(3), 237-242 pp.
- Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M. L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A. M., ... & Bredholt, S., 2004.** The incidence of Listeria monocytogenes in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, 21(2), 217-225 pp.
- Guiral, E., Bosch, J., Vila, J., & Soto, S. M., 2011.** Prevalence of Escherichia coli among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: relationship with virulence. *FEMS microbiology letters*, 314(2), 170-173 pp.
- Guo, X., Li, B., Liang, S., Lai, R., & Liu, H., 2020.** A novel Kunitz-type neurotoxin peptide identified from skin secretions of the frog Amolops loloensis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 528(1), 99-104 pp.
- Hancock, R. E., & Diamond, G., 2000.** The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*, 8(9), 402-410 pp.
- Hancock RE., 2001.** Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*, 1:156-164 pp.
- Hancock, R. E., & Sahl, H. G., 2006.** Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), 1551-1557 pp.
- Harley, J. P., & Miller, S. A., 2007.** *Zoology*. McGraw-Hill Higher Education. 619 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Heckmann, R. A., Amin, O. M., Tepe, Y., Dusen, S., & Oguz, M. C., 2011.** Acanthocephalus ranae (Acanthocephala: Echinorhynchidae) from amphibians in Turkey, with special reference to new morphological features revealed by SEM, and histopathology. *Sci Parasitol*, 12(1), 23-32 pp.
- Hoffman CW, Dent JN.,1977.** Effects of neurotransmitters upon the discharge of secretory product from the cutaneous glands of the red-spotted newt. *Journal of Experimental Zoology* 202: 155–162 pp.
- Horikawa, R., Parker, D. S., Herring, P. L., & Pisano, J. J.,1985.** Pipinins: new mast cell degranulating peptides from Rana pipiens. In *Fed Proc* (Vol. 44, p. 695) pp.
- Hsu, E., 1998.** Mutation, selection, and memory in B lymphocytes of exothermic vertebrates. *Immunological reviews*, 162(1), 25-36 pp.
- İlgaz, Ç., & Kuşlutaş, Y., 2005.** The amphibian and reptile species of İğneada (Kırklareli) and its vicinity. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(4), 558-560 pp.
- İlgaz, Ç., Akkaya, A., & Çiçek, K., 2019.** A new locality record of Rana macrocnemis Boulenger, 1885 (Amphibia: Ranidae) in Western Anatolia, Turkey. *Biharean Biologist*, 13(1), 39-41 pp.
- Isaacson, T., Soto, A., Iwamuro, S., Knoop, F. C., & Conlon, J. M., 2002.** Anti-microbial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog Rana japonica. *Peptides*, 23(3), 419-425 pp.
- IUCN 2016.** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4 [online] Website <http://www.iucnredlist.org> (accessed 22 February 2016).
- Kalaycı, T. E., Kalaycı, G., & Özdemir, N., 2017.** Phylogeny and systematics of Anatolian mountain frogs. *Biochemical Systematics and Ecology*, 73, 26-34 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kalaycı, T. E., & Özdemir, N., 2018.** New locality records for Turkish endemic species *Rana tavasensis* (Baran and Atatür, 1986). *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 3(2), 77-79 pp.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L., 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140 pp.
- Karaca, B., Özdemir, N., & KALAYCI, T. E., 2017.** Some Toxic Effects of Ammonium Sulfate Fertilizer to *Rana macrocnemis* Tadpoles From Rize Black Sea Region, Turkey. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 10(3), 107-113 pp.
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., & Zinkernagel, R. M., 2005.** Medical microbiology 698 p.
- Kutrup, B., Özdemir, N., Bülbül, U., & Çakır, E., 2011.** A skeletochronological study of age, growth and longevity of *Rana macrocnemis* populations from four locations at different altitudes in Turkey. *Amphibia-Reptilia*, 32(1), 113-118 pp.
- Kim, S. S., Shim, M. S., Chung, J., Lim, D. Y., & Lee, B. J., 2007.** Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretion of *Rana dybowskii*. *Peptides*, 28(8), 1532-1539 pp.
- Lehrer, R. I., 2013.** Evolution of antimicrobial peptides: A view from the cystine chapel. *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*, 1-27 pp.
- Li, J., Xu, X., Xu, C., Zhou, W., Zhang, K., Yu, H., ... & Wu, J., 2007.** Anti-infection peptidomics of amphibian skin. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(5), 882-894 pp.
- Locock, K. E., Michl, T. D., Griesser, H. J., Haeussler, M., & Meagher, L., 2014.** Structure–activity relationships of guanlylated antimicrobial polymethacrylates. *Pure and Applied Chemistry*, 86(8), 1281-1291 pp.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J., 1997.** Brock biology of microorganisms (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Mauricio, B., Mailho-Fontana, P. L., Sato, L. A., Barbosa, F. F., Astray, R. M., Kupfer, A., ... & Antoniazzi, M. M., 2021.** Morphology of the cutaneous poison and mucous glands in amphibians with particular emphasis on caecilians (*Siphonops annulatus*). *Toxins*, 13(11), 779 pp.
- Morikawa, N., Hagiwara, K. I., & Nakajima, T., 1992.** Brevinin-1 and-2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. *Biochemical and biophysical research communications*, 189(1), 184-190 pp.
- Nikolaieva, I., Yu, D., Oliinyk, D., Oskyrko, O., Marushchak, O., Halenova, T., & Savchuk, O., 2018.** Amphibian skin secretions: a potential source of proteolytic enzymes. *Biotechnologia Acta*, 11(5), 42-48 pp.
- O'Neill, J., 2016.** Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*. London: Wellcome Trust. 80 pp.
- Özeti, N., & Yılmaz, İ., 1994.** *Türkiye Amfibileri*. Ege Üniversitesi. 221 s.
- Rollins-Smith, L. A., Reinert, L. K., O'Leary, C. J., Houston, L. E., & Woodhams, D. C., 2005.** Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. *Integrative and comparative biology*, 45(1), 137-142 pp.
- Rollins-Smith, L. A. (2009).** The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1593-1599 pp.
- Russo, T. A., & Johnson, J. R., 2003.** Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and infection*, 5(5), 449-456 pp.
- Sai, K. P., Jagannadham, M. V., Vairamani, M., Raju, N. P., Devi, A. S., Nagaraj, R., & Sitaram, N., 2001.** Tigerinins: Novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2701-2707 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Samgina, T. Y., Gorshkov, V. A., Vorontsov, Y. A., Artemenko, K. A., Ogourtsov, S. V., Zubarev, R. A., & Lebedev, A. T., 2011.** Mass spectral study of the skin peptide of brown frog *Rana temporaria* from Zvenigorod population. *Journal of Analytical Chemistry*, 66, 1353-1360 pp.
- Sastry, A. S., 2018.** Review of microbiology and immunology. *The Health Sciences Publisher*.
- Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., Harwig, S. S., & Lehrer, R. I., 1985.** Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 260(8), 4579-4584 pp.
- Sherman, P. J., Jackway, R. J., Nicholson, E., Musgrave, I. F., Boonthung, P., & Bowie, J. H. (2009).** Activities of seasonably variable caerulein and rothein skin peptides from the tree frogs *Litoria splendida* and *Litoria rothii*. *Toxicon*, 54(6), 828-835 pp
- Shkalim, V., Amir, A., Samra, Z., & Amir, J., 2012.** Characteristics of non-typhi *Salmonella* gastroenteritis associated with bacteremia in infants and young children. *Infection*, 40, 285-289 pp.
- Siano, A., Húmpola, M. V., de Oliveira, E., Albericio, F., Simonetta, A. C., Lajmanovich, R., & Tonarelli, G. G., 2014.** Antimicrobial peptides from skin secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *Journal of Natural Products*, 77(4), 831-841 pp.
- Simmaco, M., Mignogna, G., & Barra, D., 1998.** Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Peptide Science*, 47(6), 435-450 pp.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D., & Bossa, F., 1994.** Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 11956-11961 pp.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M. L., & Barra, D., 1996.** Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *European Journal of Biochemistry*, 242(3), 788-792 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D., & Bossa, F., 1993.** Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. *FEBS letters*, 324(2), 159-161 pp.
- Sjöberg, E., & Flock, Å., 1976.** Innervation of skin glands in the frog. *Cell and tissue research*, 172, 81-91 pp.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H., & Boman, H. G., 1981.** Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292(5820), 246-248 pp.
- Ujszegi, J., Ludányi, K., Móricz, Á. M., Krüzselyi, D., Drahos, L., Drexler, T., ... & Hettyey, A., 2021.** Exposure to *Batrachochytrium dendrobatidis* affects chemical defences in two anuran amphibians, *Rana dalmatina* and *Bufo bufo*. *BMC Ecology and Evolution*, 21(1), 1-14 pp.
- Tattersall, G., 2007.** Skin breathing in amphibians. *Endothelial Biomedicine: a Comprehensive Reference*, 85-91 pp.
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G., 2022.** *Staphylococcus aureus*. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Temizkan, G., & Arda, N., 2017.** Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 770 s.
- Tenover, F. C., 2006.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6), S3-S10 pp.
- Toke, O., 2005.** Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 80(6), 717-735 pp.
- Toledo, R. D., & Jared, C., 1995.** Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 111(1), 1-29 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler Jr, V. G., 2015.** Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603-661 pp.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L., 2018.** Microbiology: an introduction. Pearson, 825 p.
- Van Epps, H. L., 2006.** René Dubos: unearthing antibiotics. *The Journal of experimental medicine*, 203(2), 259 pp.
- Vanhoye, D., Bruston, F., Nicolas, P., & Amiche, M., 2003.** Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European journal of biochemistry*, 270(9), 2068-2081 pp.
- Varga, J. F., Bui-Marinos, M. P., & Katzenback, B. A., 2019.** Frog skin innate immune defences: sensing and surviving pathogens. *Frontiers in immunology*, 9, 3128 pp.
- Veith, M., Schmidtler, J. F., Kosuch, J., Baran, I., & Seitz, A., 2003.** Palaeoclimatic changes explain Anatolian mountain frog evolution: a test for alternating vicariance and dispersal events. *Molecular Ecology*, 12(1), 185-199 pp.
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P., 2014.** Herpetology An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles, Forth Edition. *China: Elsevier*, 523-524 pp.
- Wang, X., Song, Y., Li, J., Liu, H., Xu, X., Lai, R., & Zhang, K., 2007.** A new family of antimicrobial peptides from skin secretions of Rana pleuraden. *Peptides*, 28(10), 2069-2074 pp.
- Wang, H., Yan, X., Yu, H., Hu, Y., Yu, Z., Zheng, H., ... & Liu, J., 2009.** Isolation, characterization and molecular cloning of new antimicrobial peptides belonging to the brevinin-1 and temporin families from the skin of Hylarana latouchii (Anura: Ranidae). *Biochimie*, 91(4), 540-547 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wells, K. D., 2010.** The ecology and behavior of amphibians. In *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago press, 1400 p.
- Whitford, W. G., 1973.** The effects of temperature on respiration in the Amphibia. *American Zoologist*, 13(2), 505-512 pp.
- Wiesner, J., & Vilcinskas, A., 2010.** Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1(5), 440-464 pp.
- World Health Organization, 2018.** High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows.
- Yildirimhan, H. S., Bursey, C. R., & Goldberg, S. R., 2006.** Helminth parasites of the Taurus frog, *Rana holtzi*, and the Uludag frog, *Rana macrocnemis*, with remarks on the helminth community of Turkish anurans. *Comparative Parasitology*, 73(2), 237-248 pp.
- Yildiz, M. Z., & Göcmen, B., 2012.** Population dynamics, reproduction, and life history traits of Taurus frog, *Rana holtzi* Werner, 1898 (Anura: Ranidae) in Karagöl (Ulukışla, Niğde), Turkey. *Herpetologica Romanica*, 6, 1-40 pp.
- Yoldas, T., & Erismis, U. C., 2021.** Response of Anatolian mountain frogs (*Rana macrocnemis* and *Rana holtzi*) to freezing, anoxia, and dehydration: Glucose as a cryoprotectant. *Cryobiology*, 98, 96-102 pp.
- Yoon, S. H., Jeong, H., Kwon, S. K., & Kim, J. F., 2009.** Genomics, biological features, and biotechnological applications of *Escherichia coli* B: "Is B for better?!". *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*, 1-17 pp.
- Yücel, E., 2020.** Salmonella enfeksiyonları, tanı ve tedavisi. *Klinik Tıp Pediatri Dergisi*, 12(3), 133-139 s.
- Zasloff, M., 1987.** Magainins, 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(15), 5449-5453 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Zasloff, M.,2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-395 pp.

Zhang, L., Rozek, A., & Hancock, R. E., 2001. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35714-35722 pp.

Zug, G. R., 1993. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic press 626 p.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca akademik bilgisiyle ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Dinçer AYAZ'a, tez çalışmalarım süresince bilgi ve desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Yusuf KUMLUTAŞ ve Prof. Dr. Kerim Çiçek'e yine tez çalışmalarım boyunca laboratuvar imkanlarını ve bilgilerini benden esirgemeyen Prof. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN, Prof. Dr. Ebru GÖNCÜ, Prof. Dr. Savaş İZZETOĞLU ve Doç .Dr. Gamze TUTGAY İZZETOĞLU'na, akademik bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen Dr. Araş. Gör. Melodi YENMİŞ ve Dr. Araş. Gör. Yusuf BAYRAKÇI' a, laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımı benden esirgemeyen Yiğit TERZİ'ye , arazi çalışmalarımızda yardımcı olan arkadaşlarım Elnaz NAJAFİ-MAJD, Gizem UNUTKAN, Seçkin ŞENKAYA, Ahmet KAYA ve Burak AKDAĞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez projemizi maddi olarak destekleyen, proje numarası FDK-2020-21881 olan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı ile ekonomik destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı' na (BİDEB) teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi, manevi desteğini benden esirgemeyen yeri geldiğinde bana anne- baba olan ablam Saniye TANRIVERDİ O 'ya, varlık sebebim olan emeklerini hiç ödeyemeyeceğim şu an hayatta olmayan rahmetli anem Safiye TANRIVERDİ O ve rahmetli babam Ünsan TANRIVERDİ O' ya teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

İlk, ortaöğretim ve lise eğitimini Erzincan'da tamamlamıştır. 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girmiş ve 2013 yılında Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı'ndan mezun olmuştur. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. 2015 yılında Ege Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nde formasyon eğitimi almıştır. 2018 yılında yine aynı üniversite ve enstitüde doktora eğitimine başlamıştır. Doktora eğitimi sırasında 116Z359 ve 2118Z022 nolu TÜBİTAK projelerinde doktora bursiyeri olarak çalışmıştır. 2020 yılında 2211-C Öncelikli Alanlara ve Sanayiye Yönelik Yurt İçi Doktora Bursu programı kapsamında burs almaya hak kazanmıştır. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)'nde araştırmacı olarak çalışmıştır. Science Citation Index (SCI ve SCI-E) tarafından taranan hakemli dergilerde 1 yayın ulusal kongrelerde 2 sözlü bildirisi vardır.