ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANDROCTONUS CRASSİCAUDA AKREP VENOMUNUN PROTEİN İÇERİK MİKTARININ BELİRLENMESİNDE NANODROP VE BRADFORD YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

KÜBRA KARABAY

BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

ÇANKIRI
2019

Her hakkı saklıdır

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "*Androctonus crassicauda* akrep venomunun protein içerik miktarının belirlenmesinde NanoDrop ve Bradford yöntemlerinin karşılaştırılması" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı'yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (21/06/2019).

Kübra KARABAY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANDROCTONUS CRASSİCAUDA AKREP VENOMUNUN PROTEİN İÇERİK MİKTARININ BELİRLENMESİNDE NANODROP VE BRADFORD YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Kübra KARABAY

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özcan ÖZKAN

Akrepler besin temin etmek ve kendilerini savunmak için venom üretebilirler. Akrep sokmaları insanlarda ciddi bir zehirlenmeye neden olabilir. Bu nedenle, zehirlenmeler Dünya'nın tropik ve subtropikal bölgelerinde önemli bir halk sağlığı problemidir. Venom küçük peptitler, nörotoksinler, hemotoksinler ve sitotoksinler gibi biyolojik açıdan aktif moleküller için zengin bir kaynaktır. Böylece, araştırmacılar özellikle ilaç endüstrisinde farklı hastalıkları iyileştirmek için yeni etken maddeler bulmaya çalışmaktadır. Bu çalışmada, *Androctonus crassicauda* akrep venomunun protein içerik miktarının belirlenmesinde NanoDrop ve Bradford yöntemlerinin analiz sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2019, 35 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Androctonus crassicauda, venom, protein, Bradford, NanoDrop*

ABSTRACT

Master's Thesis

COMPARISON OF NANODROP AND BRADFORD METHODS FOR THE DETERMINATION OF PROTEIN CONTENT OF *ANDROCTONUS CRASSİCAUDA* SCORPION VENOMA

Kübra KARABAY

Çankırı Karatekin University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology Sciences

Supervisors: Prof. Dr. Özcan ÖZKAN

Scorpions can produce venom to provide food and defend themselves. Stings of scorpion cause a serious envenomation to animals. Therefore envenomations are a major public health problem in tropical and subtropical regions of the World. Since ancient times, venom of animals were used for therapeutic purposes in tradional medicine. The venom is a rich source for biologically active molecules such as small peptides, neurotoxins, hemotoxic, cytotoxic compounds. This is aimsed to compare the results of NanoDrop and Bradford methods in determination of protein content of *Androctonus crassicauda* scorpion venoma.

2019, 35 pages

Key Words: *Androctonus crassicauda, venom, protein, Bradford, NanoDrop*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

“Androctonus crassicauda akrep venomunun protein içerik miktarının belirlenmesinde NanoDrop ve Bradford yöntemlerinin analiz sonuçlarının karşılaştırılması” adlı bu çalışma 2017-2019 yılları arasında hazırlanarak Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne “Yüksek Lisans Tezi” olarak sunulmuştur. Bu araştırmanın amacı NanoDrop ve Bradford yöntemlerinin analiz sonuçlarının karşılaştırılması araştırmaktır.

Çalışmanın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, çalışmanın yapılmasından gerçekleşmesine kadar yol gösteren,danışman hocam sayın Prof. Dr. Özcan ÖZKAN’ a teşekkür ederim.

Çalışmamın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile bana manevi destek veren hocam sayın Prof. Dr. Figen ERKOÇ’a teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, sevgili babam, annem, kardeşlerime hayatımda olup bana her zaman destek oldukları için ve adını burada sayamadığım, katkısı olan değerli arkadaşlarıma şükranlarımı sunuyorum.

Kübra KARABAY

Çankırı, Haziran 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET …… iii

ABSTRACT …….. ….. iv

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR..... v

SİMGELER DİZİNİ..... viii

ŞEKİLLER DİZİNİ..... ix

ÇİZELGELER DİZİNİ..... x

1. GİRİŞ ……..……..... 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ…..…… 3

2.1 Akrep…….... 3

2.1.1 Morfolojisi…….. 3

2.2 Türkiye Akrepleri..…….……... 5

2.2.1 Türkiye'de Akrep Sokmaları…..……..……. 6

2.3 Androctonus crassicauda……... 8

2.3.1 Sınıflandırmadaki Yeri……... 8

2.3.2 Genel özellikleri……...……. 8

2.3.3 Dünyada Yayılışı……..…….. 10

2.3.4 Türkiye'deki Yayılışı ……..……..... 11

2.4 Akrep Venomu……..……... 12

2.5 Akrep Venom Protein İçeriği Belirlenmesi……... 13

2.5.1 Bradford Yöntemi…….…….. 15

2.5.2 Nanodrop Yöntemi……..... 15

3. MATERYAL VE YÖNTEM ……..…….. 16

3.1 Materyal……..……. 16

3.2 Akrepler……..……...……..... 16

3.2.1 Akreplerin Arazide Yakalanması..... 16

3.2.2 Akreplerin Bakım ve Beslenmesi……..…… 17

3.3 Akreplerin Tanımlaması…….……. 17

3.4 Venom Sağımı ve Saklanması…… 18
3.5 Venom Protein Konsantrasyonu Tayini……..…….. 19
3.5.1 Bradford Yöntemi ……. 19
3.5.2 Nanodrop Yöntemi……...…… 21
3.5.3 İtatistik Analiz…… 22
4. BULGULAR …….…. 23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ……. 25
KAYNAKLAR..... 30
ÖZGEÇMİŞ..... 36

SİMGELER DİZİNİ

g …….……..Gram

kg…….……..…Kilogram

L ……..……..Litre

Mg……..……...Miligram

ml……..……Mililitre

nm……...…...Nanometre

OD…….....Optik yoğunluk

SDS-PAGE……Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez

µl…….Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Akrebin genel morfolojisi …… 4

Şekil 2.2. *Androctonus crassicauda* akrebine ait telsonun genel görünümü ve zehir bezi…… 5

Şekil 2.3. Türkiye'de skorpionizm risk değerlendirme haritası …… 7

Şekil 2.4. *Androctonus crassicauda* …….. 10

Şekil 2.5 *Androctonus crassicauda'*nın dünyada ki yayılışı…….. 11

Şekil 2.6 *A. crassicauda'*nın Türkiye'de ki yayılışı ……. 12

Şekil 2.7 Venom …….……... 14

Şekil 2.8 Coomassie Brillant Blue G-250'nin proteinlerin pozitif yüklere bağlanması …… 15

Şekil 3.1 Plastik teraryum ve *Androctonus crassicauda*……... 17

Şekil 3.2 15-50V'luk elektriksel uyarım veren bir güç kaynağıyla telsondan zehir alınması. 18

Şekil 3.3 Standart eğri grafiği için protein solüsyonu hazırlanması…….. 20

Şekil 3.4 Bradford yöntemi ile protein miktar analizi……. 21

Şekil 3.5 NanoDrop yöntemi ile protein miktar analizi……. 21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Türkiye akrep faunasında tespit edilen türler ve coğrafik dağılımları…. 6
Çizelge 4.1. Bradford protein tayin grafiği……. 23
Çizelge 4.2. Bradford ve NanoDrop protein miktar analiz sonuçları……. 24
Çizelge 5.1. Zihirli hayvanlarda kullanılan protein test sonuçları ve kullanım sıklıkları ……. 27
Çizelge 5.2. Bradford ve Nanodrop avantaj ve dezavantajları…… 28

1.GİRİŞ

Akrep, arı, ateş karıncası, çıyan, örümcek ve yılan gibi hayvanların beslenme ve savunma amaçlı ürettikleri zehirli salgı "venom" olarak tanımlanmıştır. Venom; biyolojik yönden etkin birçok protein, peptid ve bileşiklerden oluşan etkili bir salgıdır.

Son 400 milyon yıldır morfolojileri çok az değiştirdiğinden yaşayan fosiller olarak bilinen akrepler, yeryüzünün bilinen en eski karasal hayvanlarından biridir (Özkan ve Karaer 2004). Akrepler, hastalık etkeni taşımazlar ancak ürettikleri venom bakımından tıbbi önemi olan artropodlardır. Günümüze kadar yaklaşık 2500 akrep türü tanımlanmıştır. Bu türlerden 50 kadarının venomu insan hayatını tehdit edecek düzeyde tehlikeli olduğu bildirilmektedir. Bu türler içerisinde eski dünya akreplerinden *Leiurus quinquestratus* ve *Androctonus crassicauda* yeni dünya akreplerinden de *Tityus serrulatus* ve *Centruriodes spp.* oldukça zehirli bilinen akreplerdir.

Zehirli hayvanlar, genellikle kendilerini dış tehtidlere karşı savunmak ve korumak amacıyla zehirlerini kullanırlar, çoğunlukla kaza sonucu insan ve hayvanları sokarak zehirlenmeye neden olabilirler. Zehirli hayvan ısırması veya sokmasına bağlı gelişen zehirlenmeler dünyada ve Türkiye'de güncelliğini koruyan önemli bir halk sağlığı problemi olarak görülmeye devam etmektedir.

Hayvan tür ısırma ve sokmalara bağlı gelişen zehirlenme olgularında venoma karşı antivenom tedavisi uygulanmaktadır. Tek bir akrep türü içerisinde venom bileşiminde büyük farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tüm tür içi değişkenliği kapsayan ulusal referans venomların hazırlanması ve kullanılmasını önerilmektedir.

Venomun elde edilmesinde hayvanların; ismi, coğrafi (toplama alanı) kökeni, sayısı ve venomun toplanma tarihine ek olarak biyokimyasal ve biyolojik bilgileri olmalıdır. Bu anlamda venomların toksikolojik özelliğinin karakterize edilmesi için medyan ölümcül doz (LD_{50}) yöntemleri kullanılmaktadır. Venomun memeliler üzerine akut toksisitesinin belirlenmesinde yaygın olarak laboratuvar hayvanlarından fare ve rat model olarak kullanılmaktadır.

Bu da laboratuvar hayvanlarında tek dozla alınacak cevap ilişkisi değerlendirilmektedir. Bunun içinde LD_{50} ya da öldürücü konsantrasyon doz (LC_{50}) testleriyle yapılmaktadır. Bu değerlerinde, venomun içerdiği protein miktarına uygun olarak belirlenmektedir. Belirlenen bu referans değerlere uygun olarak antivenom üretim protokolleri hazırlanmakta ve antivenomun etkinlik testleri de bu değerler üzerinden belirlenmektedir. Bu nedenle venomların protein içeriklerinin doğru ve güvenilir olarak belirlenmesi oldukça kritik bir noktadır.

Bu amaçla, *Androctonus crassicauda* akrep venomunun protein içerik miktarının belirlenmesinde NanoDrop ve Bradford yöntemlerinin analiz sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

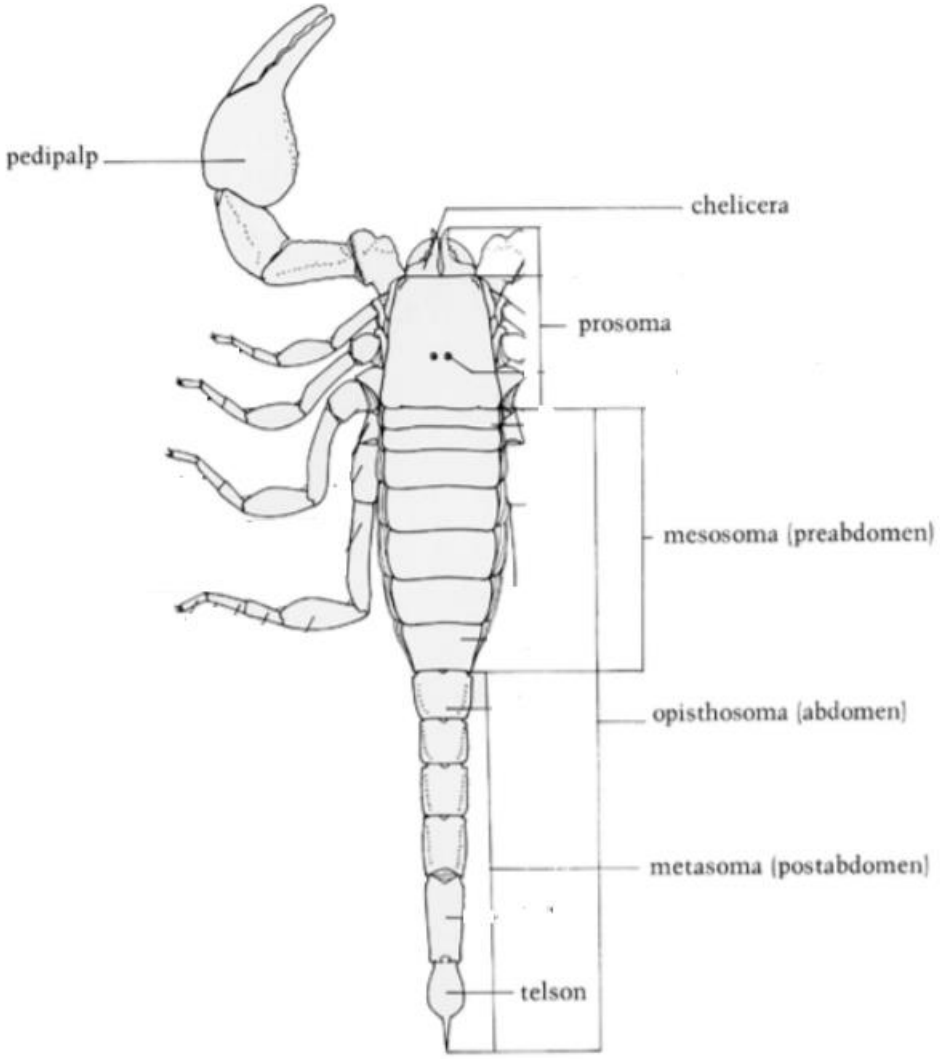
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Akrep

Yaşam alanı olarak rutubetli ve ılık yerlerde bulunan akrepler, morfolojik yapılarından dolayı kolay tanınan artropodlardır. Dış yüzeyleri büyük, güçlü ve kalın bir kitin tabakası ile örtülüdür. Çoğunlukla bulundukları ortamın renginde olup dorso-ventral basık ve uzun bir vücut yapıları vardır (Özkan ve Karaer 2004).

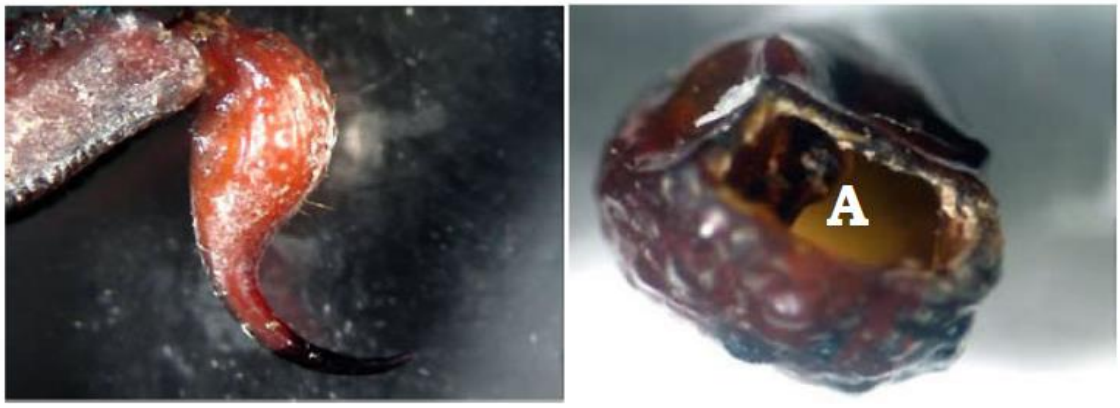
2.1.1 Morfolojisi

Akreplerin dış anatomik yapısı cephalothorax ve abdomen olmak üzere iki temel bölüme ayrılır. Cephalothorax (prosoma), birbiri ile kaynaşmış gibi görünen baş ve göğüsten oluşur. Abdomen (opisthosoma) ince uzun yapılı segmentlerden meydana gelir. Abdomen kendi içerisinde preabdomen (mesosom) ve postabdomen (metasom) olarak iki bölümden oluşmaktadır. Preabdomen; uzunluğundan daha geniş olan yedi segmentden oluşur. Preabdomende bir çift cheliser, pedipalpler ve dört çift yürüme bacağı bulunur. Diğer taraftan akrebin son kısmı olan postabdomen de kuyruk" biçimde olup beş silindirik segmentten meydana gelir. Postabdomenin son segmenti armut şeklinde zehir kesesi (telson) içerisinde bir çift zehir bezi ve bu beze bağlı ortası delik, kıvrık ve sivri bir iğnesi vardır (Özkan ve Karaer 2004) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Akrebin genel morfolojisi (Özkan ve Karaer 2004)

Zehir kesenin içerisinde akrebi tıbbi bakımdan önemli kılan ve zehir salgısının üretildiği birbirinden tamamen ayrı iki zehir bezi ve birer kanalla iğneye açılan iki tane zehir bezi bulunur (Özkan ve Karaer 2004) Zehir kesesi aşağı yöne hariç tüm yönlere doğru hareket edebilir. Zehir kesesinin ucundaki iğnenin çıkış yeri (terminal, subterminal gibi) türlere göre değişebilmektedir (Oytun, 1969; Merdivenci, 1981; Yaman, 1996) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 *Androctonus crassicauda* akrebine ait telsonun genel görünümü ve zehir bezi (A) (Ozkan et al. 2006)

2.2 Türkiye Akrepleri

Son 14 yıl içinde yapılan çalışmalar ile Türkiye akrep faunasında ciddi bir artış meydana gelmiştir. 2002 yılında Türkiye'den sadece 13 tür (*Androctonus crassicauda, Compsobuthus matthiesseni, Leiurus quinquestriatus Mesobuthus eupeus, M. gibbosus, M. caucasicus, Iurus dufoureius asiaticus, Calchas nordmanni, Euscorpius mingrelicus, E. italicus, E. carpathicus, E. tergestinus, Scorpio maurus fuscus*) iken bu sayı günümüzde 40'a yükselmiştir.

Bu türlerden *Leiurus quinquestriatus*'un Türkiye popülasyonunun yeni bir tür olduğu anlaşılmış, *Iurus dufoureius asiaticus, S.m. fuscus, E. phrygius, E. uludagensis, E. ciliciensis* de tür seviyesine çıkarılmıştır. *Protoiurus kraepelini* sinonimden çıkarılarak geçerli tür haline getirilmiştir. *Buthacus macrocentrus, C. schmiedeknechti, M. phillipsii, Hottentotta saulcyi, Orthochirus zagrosensis* türleri yeni kayıt olarak faunaya eklenmiştir.

Protoiurus ve Neocalchas cinsleri ile *L. abdullahbayrami, C. birulai, C. kosswigi, Calchas anlasi, Neocalchas gruberi, I. kinzelbachi, P. kadleci, P. kumlutasi, E. arikani, E. avcii, E. rahsenae, E. lycius, E. gocmeni, E. eskisehirensis, E. koci, E. sultanensis, E. honazicus, E. alanyaensis, E. hakani, E. aladaglarensis* türleri yeni tür olarak tanımlanmıştır.

Son yıllarda yürütülen çalışmalarla Türkiye akrep faunası 4 familya (Buthidae, Iuridae, Scorpionidae, Euscorpiidae) ve 13 cins (Androctonus, Buthacus, Compsobuthus, Hottentotta, Leiurus, Mesobuthus, Orthochirus, Calchas, Neocalchas, Iurus, Protoiurus, Scorpio, Euscorpius) içinde yer alan 40 türden oluşmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Türkiye akrep faunasında tespit edilen türler ve coğrafik dağılımları.

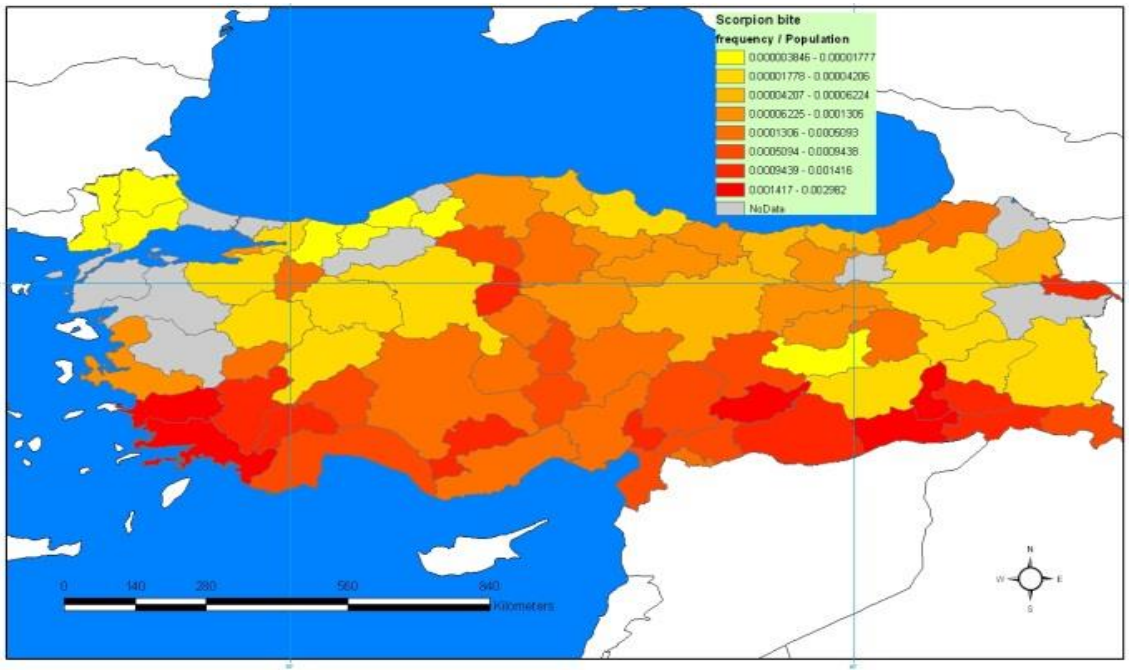
Coğrafi Bölge	Türler
Güneydoğu Anadolu	***Androctonus crassicauda***, *Leiurus abdullahbayrami, Compsobuthus matthiesseni, Buthacus macrocentrus, Hottentotta saulcyi, Mesobuthus phillipsii, Scorpio fuscus, Calchas birulai, C. kosswigi*
Doğu Anadolu	*M. eupeus, M. caucasicus, Orthochirus zagrosensis ve C. Anlasi*
İç Anadolu	*Euscorpius eskisehirensis, E. aladaglarensis, M. gibbosus anatolicus*
Marmara	*E. rahsenae, E. uludagensis*
Doğu Akdeniz	*E. ciliciensis, E. koci, Protoiurus asiaticus, C. schmiedeknechti ve M. nigrocinctus*
Batı Akdeniz	*Protoiurus kraepelini, E. lycius, E. gocmeni, Neocalchas gruberi, Protoiurus kadleci, Protoiurus kraepelini, Protoiurus kumlutasi, E. arikani, E. lycius, E. gocmeni, E. alanyaensis*
Ege	*Iurus kinzelbachi, E.avcii, E. sultanensis, E. honazicus, E. hakani, Mesobuthus gibbosus anatolicus*

2.2.1 Türkiye'de Akrep Sokması

Dünyada ve Türkiye'de özellikle Güneydoğu Anadolu'da akrep sokmasına bağlı zehirlenme (skorpionizm) olgusu önemli bir halk sağlığı sorunudur (Ozkan ve ark 2008) (Şekil 2.3). Özellikle çocuklarda ölüm lere neden olmaktadır.

Skorpionizmin klinik seyri, başlıca; akrebin türü, akrebin beslenme durumu, akrep tarafından zerk edilen zehir miktarı ve zehirin içeriği, sokma sayısı, hastaya bağlı olan faktörler içerisinde; hastanın yaşı, kilosu, sağlık durumu etkili olurken ve bölgenin iklimi gibi faktörlere bağlı olarak değişik klinik tabloların oluşabileceği bildirilmiştir (Ozkan ve Kat 2004, Ozkan ve ark 2006).

Son yıllarda belirlenen ve belirlenecek akrep türlerinin tıbbi önemleri bilinmemesine karşın Türkiye'de zehirlenmelerden Buthidae ailesinden *Androctonus, Leiurus, Hottentotta* ve *Mesobuthus* cinsine ait olan akrep türleri sorumlu tutulmuştur (Soker, ve Haspolat 2000, Suzek ve ark 2004, Karakurt ve Kocak, 2007; Ozkan ve ark 2008) (Şekil 1).



Şekil 2.3. Türkiye'de skorpionizm risk değerlendirme haritası (Ozkan ve ark 2008).

Skorpionizm olgularında tedavi amaçlı olarak semptomatik tedavinin yanı sıra immunserum (antivenom) tedavisi sağaltıcı tek seçenek olarak hala güncelliğini korumaktadır (Soker, ve Haspolat, 2000; Ozkan ve Carhan, 2008; Ozkan ve ark 2008). Türkiye'deki tüm skorpionizm vakalarında kullanılan antivenom Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından üretilmektedir. Antivenom üretiminde de dünyada toksik gücü en yüksek beş akrepten biri olan ve ülkemizde Güneydoğu Anadolu gölgesinde dağılım gösteren *Androctonus crassicauda* akrep türünün venomu antijen olarak kullanılmaktadır.

2.3 *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807)

2.3.1 Sınıflandırmadaki yeri

Âlem Animalia

Anaç Artropoda

Sınıf Arachnoidea

Takım Scorpiones

Family Buthidae C. L. Koch, 1837

Soy Androctonus (Hemprich & Ehrenberg, 1829)

Tür *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807)

2.3.2 Genel Özellikleri

Androctonus crassicauda, Orta Doğu'da "adam öldüren kalın kuyruk" olarak bir üne sahiptir. Adı da bu ünden gelmektedir. Şöyle ki; Yunanca *andras* (άνδρας), "adam" anlamında ve *kteinein* (κτείνειν) ise "öldüren" anlamında olup *Androctonus* ismi "Adam öldüren" olarak, Latince de *crassus* "kalın" "*cauda* ise "kuyruk" anlamında olup *crassicauda* (crassi-cauda) "kalın kuyruk" anlamında, yani "adam öldüren kalın kuyruk" şeklinde tanımlanmıştır (Ozkan 2009).

Androctonus crassicauda 80 ile 100 mm uzunluğunda genelde siyah veya koyu kahverengi, kıskaçları çok tıknaz ve postabdomen oldukça kıvrıktır. Bütün metasomal segmentleri dorsalden posteriora doğru yüksekliği artar ve kalınlık III. ve IV. kuyruk segmentlede en fazladır. Telson, diğer metasomal segmentlere göre küçük olup iğne kısmı yarı oranında siyah, uç kısmı kırmızımsı, siyah renktedir (Şekil 2.4). Dişilerde

tarak diş sayısı 24–29 arasında iken erkeklerde bu sayı 31–35 arasındadır (Yağmur, 2005; Ozkan et al. 2006).

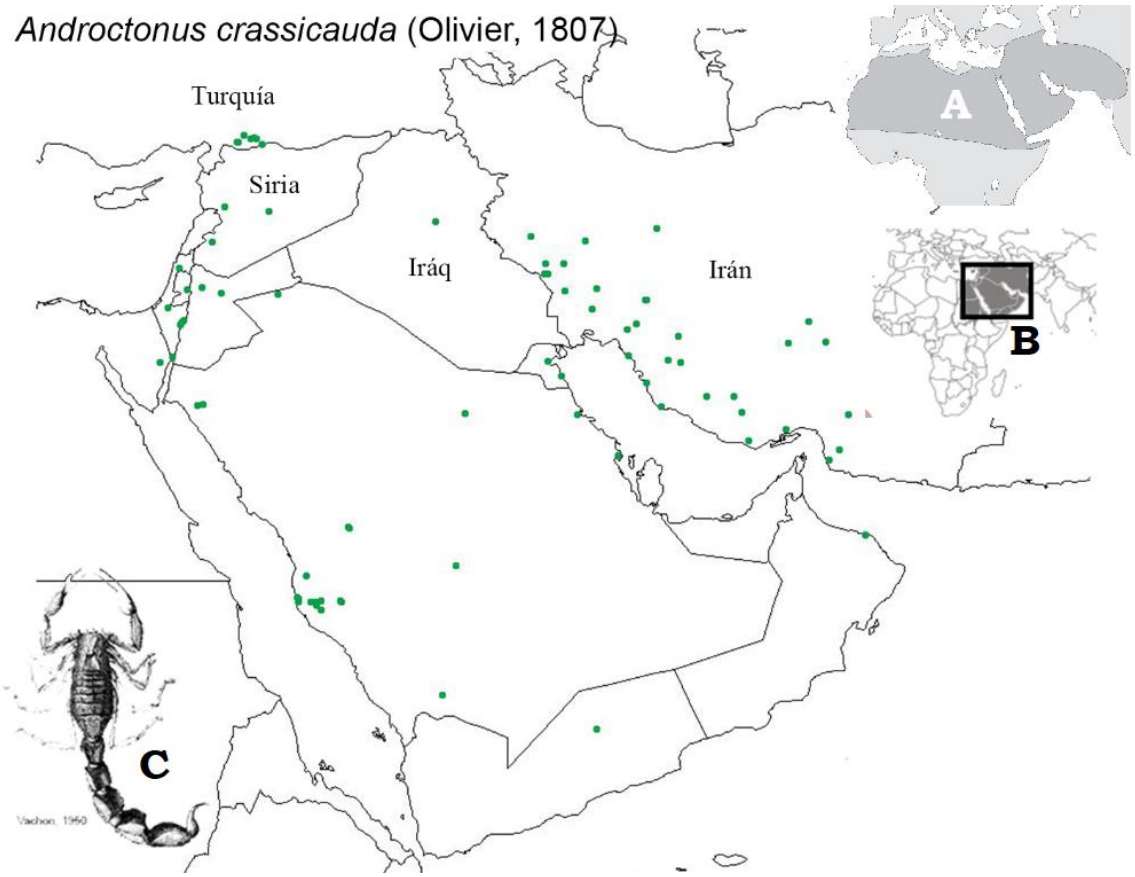


Şekil 2.4. *Androctonus crassicauda* (Ozkan 2009)

A. crassicauda, kurağı seven olup (kserofilik) bu nedenle yağış almayan ve kurak bir iklime sahip coğrafyada bulunur. Ayrıca bu tür, insanların yaşadığı alanlara (antropotolerant olduğu) yerleşebilmektedir (Yağmur, 2005).

2.3.3 Dünyada Yayılışı

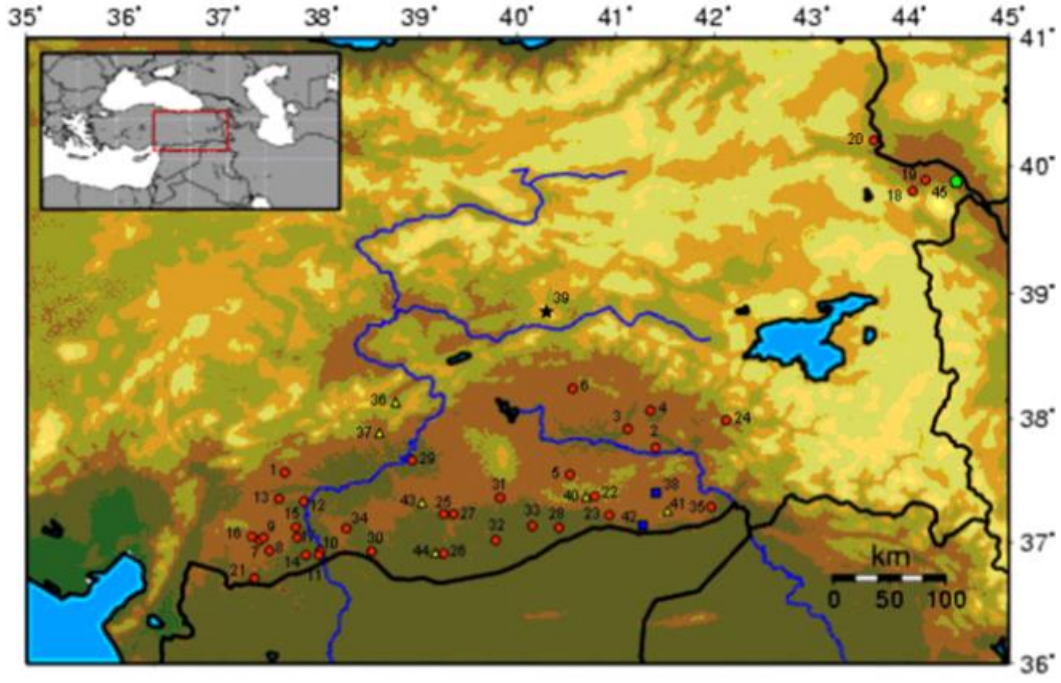
Androctonus crassicauda; Türkiye, Irak, İran, İsrail, Kuveyt, Mısır (Sina çölü), Suriye, Birleşik Arap Emirlikleri, Bahreyn, Suudi Arabistan, Umman, Ürdün ve Yemen'de (Vachon, 1952a; 1952b; Zuhair, 1988; Mullen ve Stockwell, 2002) dağılım göstermektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 *Androctonus crassicauda*'nın dünyada ki yayılışı (2019).

2.3.4 Türkiye'de Yayılışı

Türkiye'de daha çok Güney Doğu Anadolu olmak üzere kısmen de Doğu Anadolu bölgesinin bazı illerinde yayılmıştır (Şekil 2.6). Bu bölgelerin Elazığ, Diyarbakır, Şanlıurfa, Mardin, Gaziantep, Batman, Kilis, Kars, Igdır, Siirt, Şırnak, illerinde dağılım göstermektedir (Yağmur et al. 2008). Dünyanın en zehirli beş akrebinden biri olarak kabul edilen *A. crassicauda*, Türkiye'de de tıbbi ve halk sağlığı yönünden en önemli türdür (Radmanesh, 1990).



Şekil 2.6 *A. crassicauda'*nın Türkiye'de ki yayılışı (Yağmur et al. 2008)

2.4 Akrep Venomu

Akreplerde venomu stok yapma özelliği vardır (Koç ve Arıkan 2018). Akrepler, genelde avlanma ve savunma amaçlı kullandıkları venomu, kurbanlarına her defasında ortalama 0.1-0.6 mg enjekte edebilirler. Su da eriyebilen venomun içeriginde hemolitik toksinler,

kardiyotoksinler, nörotoksinler, nefrotoksinler gibi peptitler, fosfodiesterazlar, fosfolipazlar, hyaluronidazlar, glikozaminglikanlar, histamin, serotonin, triptofan ve sitokin salgılatıcılar bulunabilir. Bu nedenlede, zehirlenme semptomlarını ve prognozu belirlemesi bakımından toksinin yapısındaki aminoasitler belirler ve bu aminoasit farklılıkları ile oluşan immunolojik cevap önemlidir.

Akrep venomu içeriğindeki protein, peptitlerin çeşitliliği nedeniyle antikanser, fizyolojik, farmakolojik çalışmalarda araştırma materyali olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda 30 farklı akrep türünün venomundan Na^+, K^+, Cl^- ve Ca^{2+} iyon kanallarına etkili olan dört farklı toksin ailesi belirlenmiştir. Diğer taraftan venom içerisindeki protein yapılarının moleküler ağırlıkları esas alındığında iki temel sınıfa ayrılmıştır. Bunlardan, 60-70 aminoasit uzunluğuna sahip toksinler uzun zincirli toksinler ile 30–40 aminoasit uzunluğunda olanlarıda kısa zincirli toksinler olarak tanımlanmıştır. Uzun zincirli toksinler, Na^+ iyon kanalına özgü etki eden ve 60–76 aminoasit içeren Na+ toksinleri olarak tanımlanmış 85 farklı peptid belirlenmiştir. Yapısal ve fonksiyonel olarak geniş bir farklılığa sahip olan kısa zincirli toksinler üç ana sınıfa ayrılmıştır. Bunlardan ilki 29–44 amino asite sahip K^+ kanalına özgü toksinlerdir. Yaklaşık 51 farklı peptidi bulunan bu peptidler K^+ toksinleri olarak adlandırılmıştır. İkinci sınıf kısa zincirli toksinler 36 amino grup asit uzunluğunda ve Cl^- kanallarına etkili peptidler olup Cl^- toksinleri olarak isimlendirilmiştir. Kısa zincirli toksinlerin sonuncusu olan Ca^{2+} kanalına etki eden toksinler voltaj duyarlı ve ryanodin duyarlı Ca^{2+} kanal toksinleri olarak ikiye ayrılmıştır.

2.5. Akrep Venom Protein İçeriği Belirlenmesi

Venom (Şekil 2.7) içeriğindeki protein, peptitlerin çeşitliliği nedeniyle fizyolojik, farmakolojik ve antikanser çalışmalarda araştırma kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu temelde içeriğinde bulunan protein miktarının bilinmesi özellikle de venom

karakterizasyonu, antivenom üretim ve potens belirlenmesi aşamalarında oldukça önemlidir.

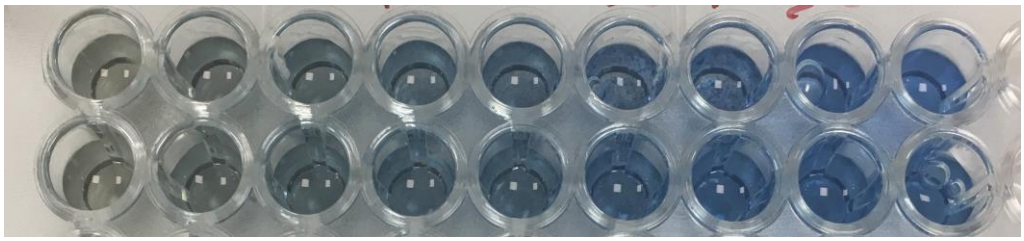


Şekil 2.7 Venom

Proteinlerin yapıtaşı olan aminoasitlerin belirli bir sıra ile aralarında peptit bağı oluşturmasıyla oluşur. Günümüzde protein miktarlarını belirlemek için proteinlerin bazı bileşiklerle verdiği reaksiyonlar temel alınarak geliştirilmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar, proteinlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri ve içeriğindeki toplam azot miktarı temel alınarak üç ana yöntem altında tanımlanmıştır. İncelenecek örnekteki protein miktarını en iyi saptayan ve istenen sonucu veren yöntemin kullanılması oldukça önemlidir. Hayvan kaynaklı venom içeriğinde protein miktarının belirlenmesinde oluşan reaksiyonun hızlı ve rengin stabil olması ile diğer yöntemlere karşın yaygın olarak Bradford yöntemi kullanılmaktadır. Diğer taraftan ölçümün tekrarlana bilirliği, zaman yönetimi, analiz edilen örnek hacminin çok düşük (0.5- 2µL) olmasıyla özellikle türe bağlı olmakla birlikte hayvanlardan elde edilen venom miktarlarının çok düşük olması gibi nedenlerle de NanoDrop yöntemin tercih edilebileceği de göz ardı edilmemelidir.

2.5.1 Bradford Yöntemi

Bu yöntem oldukça fazla kullanılmaktadır ve oldukça hassastır. Yöntem, organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brillant Blue G-250(CBG-250) boyasının kullanıldığı yöntemdir (Pekyardımcı 2019). Proteinlerin boyalarla verdiği reaksiyona dayanan yöntemler içerisinde en çok tercih edilen bu yöntemde yapısında negatif yükler içeren bir boya olan CBG-250 proteinlerin pozitif yüklerine bağlanır (Şekil 2.8). Normalde kırmızı renk olan CBG-250 protein bağlanma sonucunda mavi renge dönüşür. Oluşan renkte 595 nm dalga boyunda absorbans verir. En kısa reaksiyon süresine sahip olan Bradford yöntemi 0,05 – 1,4 mg/mL hassasiyetindedir (Özkan ve Karabay 2018).



Şekil 2.8 Coomassie Brillant Blue G-250'nin proteinlerin pozitif yüklere bağlanması

2.5.2 NanoDrop Yöntemi

Protein analizinde sınırlı hacimde örnek bulunduğunda uygulana bilinen NanoDrop spektrofotometre yöntemi yenilikçi bir teknolojidir. Burada sıvıların yüzey gerilimi özelliğini kullanarak 0,5-2 µl kadar düşük hacimli örneğin analizi yapıla bilinir. Düşük hacimli örnek ölçümü, kullanım kolaylığı, numune hazırlama kolaylığı ve sulandırma olmaması oldukça önemlidir. Bu yöntemle ortalama 1 µl örnek kullanılarak, 15 sn. den daha kısa bir sürede ölçüm yapılmaktadır. Optik kaide silinerek ikinci ölçüm için hazır hale getirilir. Analiz için 0,5 µl- 2,0 µl miktar örnek NanoDrop spektrofotometrenin alt kaidesine pipetle bırakılır. Kol kapanarak iki optik kaide arasında bir kolon oluşur. Böylece örnekle optimum ışık yolu (0,05 mm- 1 mm) oluşur. 260 ve 280 nm absorbans ölçümüyle örnekteki protein miktarı ölçülür (Özkan ve Karabay 2018)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

- Goomessi blue G250
- Fosforik asit
- Etanol
- Mikro pipetler
- Eppendorf tüpleri
- Saf su
- Hassas terazi
- Protein tozu
- Spektrofotometrik ölçüm cihazı
- Plak
- Beher
- Mezür
- Piset
- Nanodrop cihazı
- Mikro pipet
- Mikro pipet ucu
- Akrep zehiri
- İstatistik analiz

3.2. Akrepler

3.2.1 Akreplerin Arazide Yakalanması

Akreplerin bulunması için en uygun dönem Nisan-Eylül ayları arasında arazi çalışması yapıldı. Geceleri aktif olan (nocturnal) akrepler, ultraviyole (U.V) lamba kullanılarak

zedelemeyecek şekilde uzun pens ya da maşa ile postabdomen kısmından tutularak yakalandı. Yakalanan akrepler ayrı ayrı kapağı delikli cam kavanoz içerisine alındı Toplanan akrepler Çankırı Karatekin Üniversitesi (ÇAKÜ) zooloji laboratuvarına nakledilerek bakım kaplarına yerleştirildi.

3.2.2 Akreplerin Bakım ve Beslenmesi

Akrepler, içlerinde toprak ve taş parçası bulunan plastik teraryumlarda doğal ortam koşulları taklit edilerek bakım ve beslenmeleri yapıldı. (Şekil 3.2). Beslenmede 2-3 haftada bir bacakları alınmış çekirge kullanıldı. Gün aşırı suları kontrol edilerek düzenli olarak emdirilmiş pamuk aracılığıyla (Şekil 3.1) su verildi.



Şekil 3.1 Plastik teraryum ve *Androctonus crassicauda*

3.3 Akreplerin Tanımlaması

Çankırı Karatekin Üniversitesi Zooloji laboratuvarında stereo-mikroskop altında örneklerin vücut bölümlerinin incelenerek, Kovařík (1999) tarafından tanımlanan teşhis anahtarına göre tür tanımlanmaları yapıldı.

3.4 Venom Sağımı ve Saklanması

Akreplerden 15-50V'luk enerji kaynağı ile elektrik verilerek telsonun uyarılması sonucu venom sağımı gerçekleştirilecekti. (Özkan ve Filazi, 2004, Desjardins et al, 2009) (Şekil 3.2). Bakım kutularından alınan akrep, kuyruk kısmından tespit edilerek telsondan enerji verilmesiyle istem dışı venom akıtımı sağlandı. Sağım sonucu her bir akrepten elde edilen venom ayrı ayrı 1-1,5 mL'lik tüplere toplandı. Tüplere venomun üzerlerine steril distle su ilave edilerek sulandırıldı. Sulandırılan örnekler 15000 rpm'de ve 4°C'de 20dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant dikkatlice alındı. Analiz de kullanılıncaya kadar -20°C saklandı.



Şekil 3.2 15-50V'luk elektriksel uyarım veren bir güç kaynağıyla telsondan zehir alınması.

3.5. Venom Protein Konsantrasyonu Tayini

3.5.1 Bradford Yöntemi

Absorbans değerlerini ölçebilmek için proteinlerin bağlanması ve görünür hala gelmesi gerekir. Bu nedenle protein bağlayıcı olarak Comessing blue G-250 kullanıldı (Şekil 3.3 A).

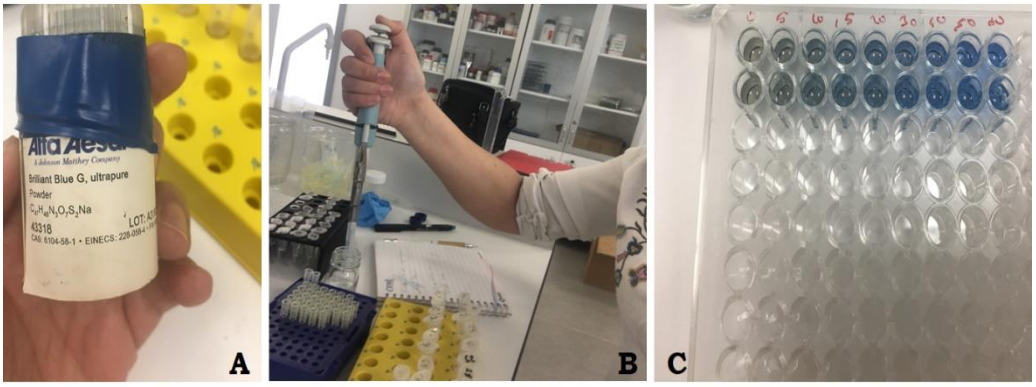
a) Comessing blue G-250 hazırlanması (100ml):

1. Comessing blue G-250'den 10 mg hassas terazi ile tartılarak bir beher içerisine konulur.
2. Behere konulan Comessing blue G-250'nin üzerine 5 ml'lik %95'lik etanol ilave edilir.
3. Bu karışımın üzerine 5 ml'lik %95'lik fosforik asit eklenerek hacim saf su ile 100 ml tamamlanır.

b) Standart eğri grafiği için protein solüsyonu hazırlanması

a) Protein tozu (2 mg) hassas terazi ile tartılıp bir behere konularak üzerine 2 ml saf su ilave edilir.
b) Bu oran 2/2 mg/ml bir çözelti halini alır.
c) Hazırlanan protein çözeltisin den sırası ile spektrofotometre küvetindeki kuyucuklara ikişerli örnekler halinde yerleştirilir.
d) Sırası ile ilk kuyucuğa kör olarak saf su konulmuştur. Diğer kuyucuklara sırası ile 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 µl protein solüsyonu eklendi (Şekil 3.3 B**)**.
e) Üzerine sırası ile 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 0 µl saf su ilave edilerek son hacmi 50 µl'ye tamamlandı.

f) Hazırlanan kuyucukların üzerine hazırlanan Comessing blue G 250'den 200 µl eklendi. Sona hacim 250 µl'ye tamamlandı (Şekil 3.3 C**)**, oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Sonra spektrofotometrede (EPOCH 2 Microlate Reader) 595 nm absorbans değerin de okutulup kaydedildi.



Şekil 3.3 Standart eğri grafiği için protein solüsyonu hazırlanması

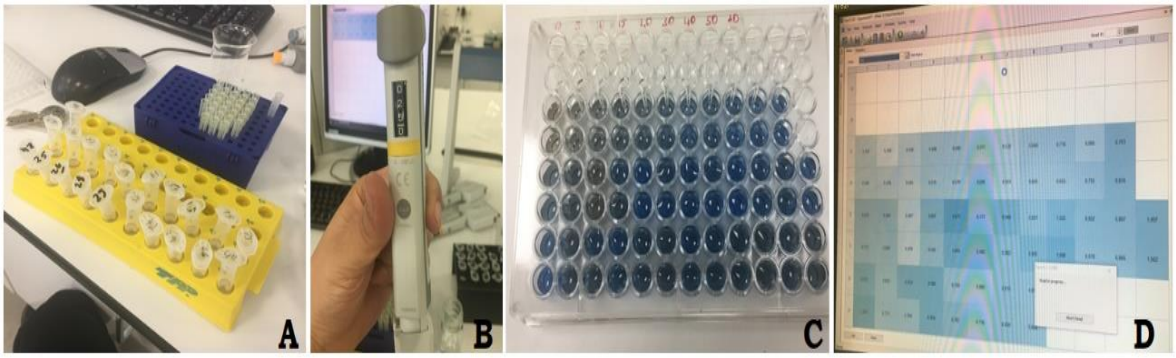
c) Örneklerin seyreltilmesi

Akrep zehir örnekleri yoğunluğundan dolayı her biri için seyreltme işlemi yapıldı.

1. Akrep zehirlerinin bulunduğu eppendorf tüplerindeki sıvılardan 25 µl alınarak boş eppendorf tüplerine aktarıldı.
2. Aktarılan tüplerin üzerine 475 µl saf su eklenerek 500 µl tamamlandı.
3. Örnekler (20 adet) %20'lik çözelti haline getirildi (Şekil 3.4 A**)**.

d) Protein Miktar Analizi

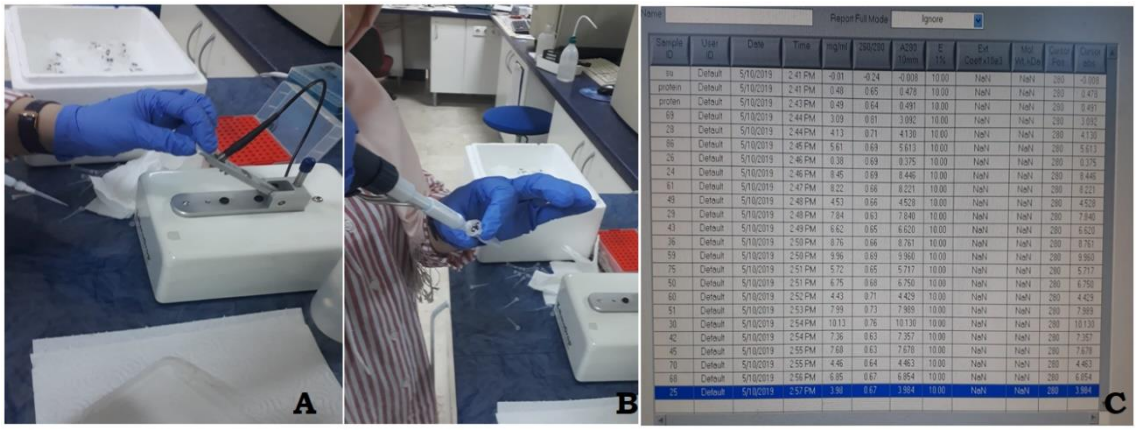
1. Hazırlanan %20 seyreltilmiş çözeltilerden 50 µl alındı.
2. Her bir örnekten spektrofotometre küvetindeki kuyucuklara ikişerli olarak eklendi (Şekil 3.4 C).
3. Örnek kuyucuklarının üzerine 200 µl Comessing blue G-250 eklendi.
4. Oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi.
5. Spektrometrede 595 nm absorbans değerin de okutuldu (Şekil 3.4 D).
6. Çıkan sonuçlar kaydedildi.



Şekil 3.4 Bradford yöntemi ile protein miktar analizi.

3.5.2 NanoDrop Yöntemi

Nanodrop yöntemi (Desjardins et al, 2009) ile akrep zehri örneklerinin her birinden mikro pipet ile 1 µl alındı. Nanodrop cihazında 280 nm de okutuldu ve sonuçlar kayıt edildi. (Şekil 3.5).



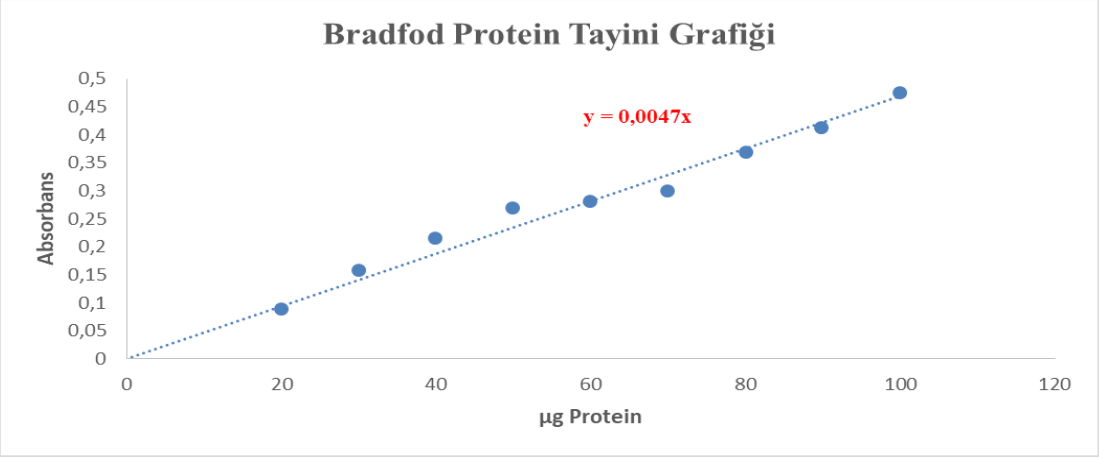
Şekil 3.5 NanoDrop yöntemi ile protein miktar analizi

3.5.3 İstatistik Analiz

Bradford ve NanoDrop yöntemlerinden elde edilen protein içerik verileri istatiksel olarak analiz edildi. İki grup ortalamalarının karşılaştırılmasında bağımsız gruplarda t testi analizi kullanıldı. Analiz sonucunda fark $p<0,001$ düzeyinde olması halinde istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bradford testi protokolüne göre çizilen standart kalibrasyon grafiği Çizelge 4.1'de verilmiştir. Excel tabanlı grafikten yararlanılarak grafiğin eğimini hesaplanmıştır. Hesaplama sonrasında eğim çizgisi eklenmiş, grafik üzerinde y = 0,0047x eşitliği şeklinde belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu eşitlikten yararlanılarak akrep zehir örneğinin konsantrasyonu x (konsantrasyon) örneğin absorbansına (y) göre "mg/ml" cinsinden hesaplanmıştır. bu eğim çizelgesi ile %20'lik seyreltilmiş örneklerimiz seyrelme öncesine göre hesaplanıp 1 mg/ml de ki gerçek değerleri bulunup çizelgeye eklendi (Çizelge 4.2)



Protein (µg)	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Absorbans (OD)	0,0885	0,158	0,214	0,269	0,2805	0,299	0,3675	0,413	0,474

Çizelge 4.1 Bradford protein tayin grafiği

Yirmi adet akrepten ayrı ayrı alına zehir örnekleri %20 oranın da seyrelterek Bradford yöntemi ile 1 mg/ml içerisinde bulunan protein miktarları belirlenmiştir. Nanodrop yöntemi ile yapılan ölçüm 20 adet örneğin sonucunda akrep zehirlerinde bulunan 1 µl'de ki protein miktarları ölçülmüştür (Çizelge 4.2).

Bradford ve NanoDrop yöntemlerinden elde edilen protein içerik verilerindeki fark $p<0,001$ düzeyinde önemli bulundu.

Çizelge 4.2 Bradford ve NanoDrop protein miktar analiz sonuçları

No	Örnek No	Bradford (1 mg/ml)	Nanadrop (A280/10 mm)
1	24	**1,45**	8,44
2	25	**1,35**	3,98
3	26	**0,50**	0,37
4	28	**1,83**	4,31
5	29	**2,99**	7,84
6	36	**2,14**	8,76
7	42	**2,44**	7,35
8	43	**2,23**	6,62
9	45	**3,01**	7,67
10	49	**2,16**	4,52
11	50	**2,05**	6,75
12	51	**2,76**	7,99
13	59	**2,77**	9,96
14	60	**1,56**	4,43
15	61	**2,09**	8,22
16	68	**2,65**	6,85
17	69	**1,84**	3,09
18	70	**1,47**	4,46
19	75	**2,24**	5,72
20	86	**2,04**	5,61

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Varlığı çok eski dönemlerden beri bilinen akrep, eski Mezopotamya toplumlarına ait yazılı ve arkeolojik kaynaklarda akrep sembolünün kullanıldığı bilinmektedir (Florioti 2014). Ayrıca, akrep figürü Anadolu'da halk arasında, akrebin koruyan bir motif olduğuna inanılması nedeniyle halı ve düz dokumada çok işlenen bir motiftir (Deniz 2005).

Diğer taraftan zehirlenmenin tarihine bakıldığında eski çağlarda, insanların daha çok düşmanlarını yok etmek için okların uçlarına hayvan zehri sürdükleri bilinmektedir. Toksikoloji hakkında en eski yazılı kaynaklarından olan Mısır papirüslerinde (M.O. 1552) tedavi amaçlı zehirli birçok maddeden bahsettiği görülmüştür. Özellikle de akrep, yılan gibi hayvanların zehirlerinin kullanıldığı eski çağlardan beri bilinmektedir (Vural 2005).

Bir maddenin toksik olup olmadığında birçok faktör rol oynamakla birlikte 15 yy İsviçreli bilim insanı Paracelsus (1493-1541) "Her madde zehirdir. Zehir olmayan madde yoktur; Ancak deva ile zehri ayıran dozudur" şeklinde açıklaması ile dozun ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur (Vural 2005). Bu nedenle de herhangi bir kimyasal maddenin canlı organizmada toksik etki göstererek onun ölümüne neden olan dozuna öldürücü (letal) doz denilmektedir. Kimyasal maddelerin toksik etkileri, maruz kalma süresine ve sıklığına göre akut, subakut, subkronik veya kronik tipte olmaktadırlar (Vural 2005).

Bir zehrin akut toksisitesinin araştırılmasında testlerde deney hayvanı kullanılabilir. Deney hayvanlarında tek dozla alınacak cevap ilişkisi değerlendirilmektedir. Bunun içinde median letal doz (LD 50) veya öldürücü konsantrasyon doz (LC 50) testleri yapılmaktadır. LD 50 deney hayvanlarına belirli koşullarda ve doğrudan uygulanan toksik maddenin, bu hayvan popülasyonun %50'sini öldüren doza denilmektedir (Vural 2005).

Ekonomik İşbirliği ve Gelişme Kuruluşları (OECD) deney hayvanlarının akut toksiste testlerinde kullanımını bir takım kurallara bağlanmıştır. LD 50 değerinin biyolojik olarak sabit olmadığını bunun, deney hayvanın türü, soyu, yaşı, cinsiyeti, diyeti, aç olması kafesleme koşulları, mevsimsel faktörler, deney prosedürleri gibi birçok faktörden etkilenebileceği bildirilmiştir (Krifi et al 1998, OECD 2001, Ozkan ve Filazi 2004)

Dünya Sağlık Örgütü teknik raporlarına göre venomların karakter yapısının bilinmesi sınıflandırmada önemli yer tutmaktadır. Venomların protein yapısı, miktarı ve dağılımın saptanması için biyokimyasal testlere ihtiyaç vardır (WHO 1981, EMEA 2002);

Venomun biyokimyasal özellikleri

a. Protein konsantrasyonu

b. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinin (SDS-PAGE) taramaları veya resimleri

c. Kromatografik profilleri (örneğin, yüksek performanslı sıvı kromatografisi)

İkinci aşamada zehir türlerine göre LD 50 düzeyinin saptanması ve buna bağlı olarak antivenom düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Memeliler için toksisitesinin belirlenmesinde deney hayvanları üzerinde yapılan LD 50 testi ile venom içeriğindeki protein miktarı, kg göre belirtilmektedir. Ayrıca venoma karşı üretilen antivenomun potensi (gücü) belirlenmesinde de in vivo nötralizasyon testi kullanılmaktadır. Bu testte de temel olarak belirlenen LD 50 öldürücü güce karşılık gelen protein miktarını esas alınmaktadır (WHO 1981, EMEA 2002, Theakston et al 2003). Bu veriler ışığında venomun içerdiği protein miktarının doğru olarak ölçülmesi oldukça önemli krtik bir noktadır. Bu amaçla birçok çalışmada farklı analiz yöntemleri kullanılarak venom içeriği protein miktar analizi yapılmıştır (Çizelge 5.1)

Çizelge 5.1 : Zihirli hayvanlarda kullanılan protein test sonuçları ve kullanım sıklıkları

ZEHİRLİ HAYVANLAR	WARBURG	KJELDAHL	BİÜRET	FOLİN-LOWRY	BCA	BRADFORD	NANODROP
YILAN	1 (a)	1(c)	1(f)	1(m)	3(n)	6(p)	
AKREP	1(b)	1(d)	1(g)		4(o)	3(r)	
ÖRÜMCEK			1(h)			2(s)	
ARI		1(e)	1(k)			2(t)	
KARINCA			1(l)			2(u)	

a ve b: (Oukkache and ark. 2014) c:(Coyle ve ark. 2018) d:(WHO Guidelines for the Production, 2008) e:(Lazaryan ve ark. 2003) f:(Schmidt ve ark.2011) g:(Krıshnan 1953) h:(See ve ark. 2017) k:(Fraenkel ve ark.2017) l: (Butcher ve ark. 1998) m:(Khow ve ark.2011) n:(Nicholson ve ark. 2006)(Bottrall ve ark. 2010)(Kalama ve ark. 2011) o:(Tekooka ve ark. 2012)(Legros ve ark. 2000)(Cecchini 2006)(Clot-Faybesse ve ark.1999) p:(İğci ve Ark.2016)(Iğci and Demiralp 2012)(Vejayan ve ark.2010)(Flight ve ark. 2006)(Dounighi ve ark. 2015)(Sikarwar ve ark. 2012) r:(Ersen ve ark. 2017)(Doğan 2015)(Sial ve ark.2016) s: (Roodt 2017)(Yiğit 2005) t:(Li ve ark. 2009)(Cappelari ve ark. 2009) u:(Egami ve ark. 2009)(Gamboz ve ark. 2010)

Türkiye'de akrep antivenomu, Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü bünyesinde üretilmektedir. Türkiye'de A. crassicauda türünden elde edilen venom, antivenom üretiminde antijen olarak kullanılmaktadır (Ozkan 2008).

Bu çalışmada da A. crassicauda türünden elde edilen venomun protein içeriği miktarı NanoDrop ve Bradford yöntemleri kullanılarak belirlendi. Bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları da bulunmaktadır. (Çizelge 5.2)

Çizelge 5.2. Bradford ve Nanodrop avantaj ve dezavantajları

YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
BRADFORD	Yöntem çok basit ve hızlıdır. Oluşan reaksiyon hızlıdır ve 10 dakika içerisinde tamamlanır. Oluşan renk stabildir. Reaktif hazırlandığı zaman renkli şişelerde uzun süre saklanabilir. Standart eğri uzun süre kullanılır.	Renk şiddeti pH değişimine karşı çok duyarlıdır. Standart eğrinin elde edilişi zordur. Çünkü geniş bir konsantrasyon aralığında lineerlik sağlanamamaktadır. SDS ve Triton X-100 gibi maddeler bu reaksiyon için bozucu faktörlerdir. Boya küvetlerde kalıntı bıraktığı için küvetler tek kullanımlık olmalıdır
NANODROP	Örneklerden az miktarda kullanarak, örnekleri çok sayıda daha fazla ölçümleri almak ve daha iyi kalite kontrolü sağlamak için hızlı ve doğru bir şekilde analiz edilebilir.	Kaide yüzeyleri düzgün bir şekilde temizlenmeli ve en doğru sonuçları elde etmek için klimalı olmalıdır

Nanodrop ile ölçülen 1 µg/ml de ki sonuçları görmekteyiz. Bu sonuçlara göre ölçülen miktarın azlığı ve akrep zehirlerinden alınan miktarlar karşılaştırıldığında az miktar kullanılarak daha doğru sonuçlar elde edilmiştir. Nanodrop yöntemi ile protein miktarlarındaki sonuçlar ile daha net sonuçlar elde edilmiştir.

Bradford yöntemi ile yapılan çalışmada bekleme süresi ve örneklerin yoğunluğundan dolayı ölçümlerin yapılabilmesi için seyreltme işleminin uygulanması gerekmektedir. Akrep zehrinin sağılmasından elde edilen miktarın büyük bir kısmının kullanılması bu tür canlılar için zorluk oluşturmaktadır. Bradford yöntemi ile belirli aralıklarda ki absorbans değerine göre ölçüm yapılmasından dolayı ölçümlerde ki sonuçlar da hata payının bu tür canlı zehirlerin de yüksel olduğu gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlar gösteriyor ki Bradford yöntemi az miktarda ki örnekler için hem kullanışlı değil hem de sonuçlar açısından uygun bir yöntem oluşturmuyor. Araştırmacılar çalışmalalarında nanadrop yöntemini kullanarak çalışmalarında hız kazanmaları ve elde etmesi zor olan örneklerin büyük bir kısmını kaybetme tehlikesi ile karşılaşmadan bu yöntemi kullanmaları daha etkili ve zaman dan tasarruf etmiş olucağını göz önünde bulundurmaları tavsiye edilebilir.

KAYNAKLAR

Anonyöous, 2019 Scorpions- Scorpionism. Toxic Scorpions in Middle East. http://aracnidos.unam.mx/eng/meast.html. Erişim Tarihi: 2019.

Bottrall J.L., Madaras F., Biven C. D., Venning M. G., and Mirtschin P. J., Proteolytic activity of Elapid and Viperid Snake venoms and its implication to digestion Journal Venom Research 2010 Sep 30;1:18-28.

Butcher, B. T. ve Ark. Evaluation of commercial imported fire ant extracts by crossed immunoelectrophoresis and radioallergosorbent test Journal of Allergy and Clinical Immunology Volume 82, Issue 5, Part 1, Pages 770-777 November 1988

Cappelari F.A., Turcatto A. P., Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (Apis mellifera carnica) Genet. Mol. Res. 8 (4): 1245-1249 (2009)

Cecchini A. L., Vasconcelosa F.,Amarab S. G., Roberto J. Eliane G., Arantes C., Effects of Tityus serrulatus scorpion venom and its toxin TsTX-V on neurotransmitter uptake in vitro Toxicology and Applied Pharmacology Volume 217, Issue 2, 1 December 2006, Pages 196-203

Coyle R. Cross L. Eskridge M. Sirisophon A. Stacy P.; Idealized Process for the Production of Snake Antivenom Process Design Report BE 3340 http://lindacross.weebly.com/uploads/2/3/9/8/23986927/finalprocessreport.pdf Erişim Tarihi: 2018

Deniz, B., 2005 Sanat Tarihi Dergisi Sayı/ Number: XIV-1 Nisan/ April 2005, Anadolu-Türk Halı Sanatının Kaynakları s:79-103

Desjardins, P., Hansen, J. B., Allen, M. Microvolume Protein Concentration Determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *J. Vis. Exp*. (33), e1610, doi:10.3791/1610 (2009).

Doğan, T. Protoiurus Kraepelini (Scorpıones: Iurıdae) Zehrinin Peptidomik Karakterizasyonu Ve Biyoaktivite Taraması Hacettepe Üniversitesi Doktora Tezi 2015

Dounighi M., Mehrabi N., Avadi M., Zolfagharian M.R., Rezayat H., Preparation, characterization and stability investigation of chitosan nanoparticles loaded with the Echis carinatus snake venom as a novel delivery system, Archives of Razi Institute, Vol. 70, No. 4 (2015) 269-277

Egami I. Iiyama K. Zhang P. Chieda Y. Ino N. Hasegawa K. Lee J. M. Kusakabe T. Yasunaga-Aoki J. Shimizu S.; Insecticidal bacterium isolated from an ant lion larva from Munakata, Japan; Journal of Applied Entomology Volume133, Issue2 Pages 117-124, March 2009

EMEA. The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on production and quality control

of animal immunoglobulins and immunosera for human use. CPMP/BWP/3354/99. London, 2002, 14

Ersen, Y. ve Ark. Neutralization Capacity of Monovalant Antivenom Against Existing Lethal Scorpions in the Turkish Scorpiofauna Iran J Pharm Res. Spring; 16(2): 653–660. 2017

Flight S., Mirtschin P., Masci P. P., Comparison of Active Venom Components between Eastern Brown Snakes Collected from South Australia and Queensland, Ecotoxicology March 2006, Volume 15, Issue 2, pp 133–141

Florioti Duymuş, H., Tarih Okulu Dergisi (TOD) Journal of History School (JOHS) Eylül 2014 September 2014 Yıl 7, Sayı XIX, ss. 347-370. Year 7, Issue XIX, pp.347-370.

Fraenkel G. Utılızatıon And Dıgestıon Of Carbohydrates By The Adult Blowfly 1939 http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.542.5501&rep=rep1&type=pdf Erişim Tarihi : 2017

Gamboz N. Zamarian S. Cavallero C. Age-Related Differences in the Attention Network Test (ANT), Experimental Aging Research An International Journal Devoted to the Scientific Study of the Aging Process Volume 36, Pages 287-305, 2010

Iğci, N. ve Ark. Screening of cytotoxic, anti-angiogenic, anti-tumorogenic and antimicrobial activities of Anatolian Vipera ammodytes (Nose-horned viper) venom Turkish Journal of Biochemistry, Volume 41, Issue 6, Pages 483–491, 2016

Iğci. N. and Demiralp D. Ö. A preliminary investigation into the venom proteome of Macrovipera lebetina obtusa (Dwigubsky, 1832) from Southeastern Anatolia by MALDI-TOF mass spectrometry and comparison of venom protein profiles with Macrovipera lebetina lebetina (Linnaeus, 1758) from Cyprus by 2D-PAGE Archives of Toxicology, Volume 86, Issue 3, pp 441–451 March 2012

Kalama Y., Isbisterabc G. K., Mirtschind P., Hodgsona W. J., Konstantakopoulos N. Validation of a cell-based assay to differentiate between the cytotoxic effects of elapid snake venoms; Journal of Pharmacological and Toxicological Methods Volume 63, Issue 2, March–April 2011, Pages 137-142

Karakurt C., Kocak G. 2007 “Toxic myocarditis after scorpion envenomation’’: Case Report Journal of Inonu University Medical Faculty. 14(1), 61–63.

Khow O., Chulasugandha P., Pakmanee N., Venom protein of the haematotoxic snakes Cryptelytrops albolabris, Calloselasma rhodostoma, and Daboia russelii siamensis, Science Asia 37 (2011): 377–381

Krifi MN., Marrakchi N., El Ayeb M., Dellagi K. Effect of some variables on the in vivo determination of scorpion and viper venom toxicities. Biologicals,1998, 26, 277-88

Krıshnan G., On the Cuticle of the Scorpion Palamneus swammerdami ; Journal of Cell Science s3-94: 11-22; 1953

Koç, H, Arıkan, H. (2018). Mesobuthus gibbosus (Brullé, 1832) (Scorpiones: Buthidae) Üzerinde Biyolojik ve Ekolojik Gözlemler. Commagene Journal of Biology, 2 (1), 34-38. DOI: 10.31594/commagene.406174

Kovarik, F. 1999. ‘’Review of European scorpions, with a key to species’’. Sekret, 6: 38-44.

Lazaryan D. S. Standardızatıon Of Bee Brood Homogenate; Composıtıon Pharmaceutical Chemistry Journal Vol. 37, No. 11, 2003

Legros C., Pollmann V., Knaus H., Farrell A. M., Darbon H., Bougisi P. E., Eauclairei M. F. M., and Pongs O., Generating a High Affinity Scorpion Toxin Receptor in KcsA-Kv1.3 Chimeric Potassium Channels The Journal Of Bıologıcal Chemıstry Vol. 275, No. 22, Issue of June 2, pp. 16918–16924, 2000

Li F., Yuan Q., or Rashid F. Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from Crataegus pinnatifida Bge. Carbohydrate Polymers Volume 78, Issue 1, 4, Pages 80-88, August 2009

Merdivenci, A. (1981). Medikal entomoloji, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları Rektörlük No:2811 Dekanlık No.74; 285–289.

Nicholson J., Mirtschin P., Madaras F., Venning M., Kokkinn M., Digestive properties of the venom of the Australian Coastal Taipan, Oxyuranus scutellatus (Peters, 1867) Toxicon Volume 48, Issue 4, 15 September 2006, Pages 422-428

OECD Guideline for Testing of Chemicals. 2001. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. OECD/OCDE 423.

Oukkache, N. and ark. Evaluation of the Lethal Potency of Scorpion and Snake Venoms and Comparison between Intraperitoneal and Intravenous Injection Routes, 6, 1873-1881; doi:10.3390/toxins6061873 Toxins 2014

Oytun, H.Ş. (1969). Tıbbi Entomoloji. A.Ü Tıp Fak. Yayınlarından Sayı: 218, Ankara,

Ozkan O, Filazi, A. 2004. “The determination of acute lethal dose–50 (LD50) levels of venom in mice, obtained by different methods from scorpions, Androctonus crassicauda (Oliver 1807)”. Acta Parasitologica Turcica, 28 (1), 50–3.

Ozkan O, I Kat I. 2005. ‘’*Mesobuthus eupeus* scorpionism in Sanliurfa region of Turkey’’. J. Venom. Anim. Toxins., 11 (4): 479-491.

Ozkan, O., Adiguzel, S., Yakistiran, S., Cesaretli, Y., Orman, M., Karaer, K.Z., 2006. ‘’*Androctonus crassicauda* (Olivier 1807) Scorpionism in the Sanliurfa Provinces of Turkey’’. Acta Parasitologica Turcica, 30 (3), 239–245.

Ozkan, O., Uzun, R., Adıgüzel, S., Cesaretli, Y., Ertek, M. 2008. "Evaluation of scorpion sting incidence in Turkey". J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., 14(1), 128-140.

Ozkan O., Carhan A. 2008. "The neutralizing capacity of Androctonus crassicauda antivenom against Mesobuthus eupeus scorpion venom". Toxicon. 52(2), 375-379.

Ozkan O. Akrep antivenom üretimi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 65 (2): 97-108 2008

Pekyardımcı, Ş. Protein Tayin Yöntemleri: Lowry, Bradford, Biüre, Kolloidal altın yöntemi, Bikinkoninik asit yöntemi, florimetrik ve spektrofotometrik yöntemler. https://studylibtr.com/doc/1021317/2.-hafta--protein-tayin-y%C3%B6ntemleri--lowry--bradford--bi%C3%BCr...# Erişim Tarihi: 2019

Radmanesh, M. (1990). Androctonus crassicauda sting and its clinical study in Iran, J. Trop Med Hyg., 93, 323- 326.

Roodt, A.R. Lethality and histopathological alterations caused by Phoneutria nigriventer spider venom from Argentina: Neutralization of lethality by experimental and therapeutic antivenoms Toxicon 125 , 24e31 2017

Schmidt E., Lange R. R. Paulillo A. C. ; Determination of snake-necked turtle Hydromedusa tectifera (Cope, 1870) (Testudines: Chelidae) plasma protein concentrations by refractometry and the biuret method; Comparative Clinical Pathology Volume 20, Issue 5, pp 487–489 October 2011

See G. L. L, Deliman Y. C. Arce F. V. and Ilano A.; Cytotoxic and Genotoxic Studies on the Mucus of Indian Volute Melo broderipii (Gmelin 1758) and Spider Conch Lambis lambis (Linn 1758), Journal of oJ Pharmacognosy & Natural Products urnal of Pharmacognosy & Natura https://www.researchgate.net/profile/Gerard_Lee_See/publication/307952193_Cytotoxic_and_Genotoxic_Studies_on_the_Mucus_of_Indian_Volute_Melo_broderipii_Gmelin_1758_and_Spider_Conch_Lambis_lambis_Linn_1758/links/58ae379d92851cf7ae85b585/Cytotoxic-and-Genotoxic-Studies-on-the-Mucus-of-Indian-Volute-Melo-broderipii-Gmelin-1758-and-Spider-Conch-Lambis-lambis-Linn-1758.pdf Erişim tarihi: 2017

Sial N. and ark. Molecular Weıght And Potency Of Venom Produced By Scorpıon Specıes (Androctonus Australlıus And Heterometerus Indus) World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutıcal Scıences Volume 4,, Issue 07,, 236-247 2016

Sikarwar A.S., Ambu S., Wong T.H., Evaluation of Newly Developed Dot-ELISA Test for Identification of Naja-naja sumantrana and Calloselasma rhodostoma Venom Antigens, World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering Vol:6, No:8, 2012

Soker, M., Haspolat, K., 2000. ‘’Güneydoğu ve Anadolu bölgesinde çocuklarda akrep sokması: 64 vakanın değerlendirilmesi’’. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 43, 43–50.

Suzek H., Evren H., Yapar S. 2004 ‘’Mugla Devlet Hastanesi acil servisine başvuran akrep ve yılan sokma vakalarının incelenmesi’’. *International Journal of Human Sciences*, 1(1), 1-4.

Tekooka M. A., Fabritzbc L., Kirchhofbc P., Königd S., Müllera F. U., Schmitza W., Tale T., Zlotkine E., Kirchhefer U., Gene construction, expression and functional testing of an inotropic peptide from the venom of the black scorpion Hottentotta judaicus, Toxicon Volume 60, Issue 8, 15 December 2012, Pages 1415-1427

Theakston RD., Warrell DA., Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. Toxicon. 2003; 41, 541-557.

Vejayan J, Shin Yee L, Ponnudurai G, Ambu S, Ibrahim I, Protein profile analysis of Malaysian snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis; The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases ISSN 1678-9199 Volume 16 issue 4, pages 623-630, 2010

Vural, N. “Toksikoloji. Kitabı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73 s:610-622, , 1-30

WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins These Guidelines were adopted by the WHO Expert Committee on Biological Standardization at its 59th meeting which took place in Geneva from 13 to 17 October 2008 and will be published in the WHO Technical Report Series

World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva: WHO offset Publication; 1981. p. 58.

World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms Geneva: WHO;1981. WHO Offset Publications No. 58. Available from: http:// whqlibdoc.who.int/offset/WHO_OFFSET_58. pdf.

World Health Organization (WHO) 2010. WHO Guidelines for the production, control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguide/en/ Erişim tarihi:2018

Yaman, N. (1996). Akrepler ve tibbi önemleri, A.Ü Sağlık Bilimleri Enst. Parazitoloji Anabilimdalı Entomoloji ve Protozooloji Bilim Dalı Seminer.

Yağmur, E.A., Yalçın, M., Çalışır, G. 2008. Distribution of Androctonus *crassicauda* (Olivier, 1807) and *Buthacus macrocentrus* (Ehrenberg, 1828) (Scorpiones: Buthidae) in Turkey. Serket. 11(1): 13-18.

Yiğit. N. The Comparatıve Proteın Profıles Of Venom And Venom Gland Extracts Of Agelena Labyrınthıca (Araneae: Agelenıdae), G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi 18(4): 555-561 (2005)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : KÜBRA KARABAY

Doğum Yeri : KAYSERİ

Doğum Tarihi : 23/07/1990

Medeni Hali : BEKAR

Yabancı Dili : ORTA

Adres : Sağlık mahallesi Çatyok Sokak No:2 BÜNYAN/KAYSERİ

Tel : 0506 535 42 45

E-posta : karabaykubra@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Şehit Piyade Teğmen Bekir Öztürk Çok Programlı Lise

Lisans : Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programı, 2011-2016.

Yüksek Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Ünstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Tez Başlığı; Androctonus crassicauda akrep venomunun protein içerik miktarının belirlenmesinde NanoDrop ve Bradford yöntemlerinin analiz sonuçlarının karşılaştırılması 2016- 2019.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Şehit Piyade Teğmen Bekir Öztürk Çok Programlı Anadolu Lisesi 2016-2017

Makale:

Özkan Ö. Karabay K. Venomlarda Protein İçeriği Tayin Testleri :Türk Farmakope Dergisi , 3 (1):127-140 2018

Poster Sunum:

2. Intenational Congress of Forensic Toxicology Konu: Effect of Some Beverages on the *Drosophila melanogaster* Survival Percentage 2016