

T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Montivipera wagneri ve *M. raddei* ENGEREK TÜRLERİNİN
ZEHİRLERİNDEN L-AMİNO ASİT OKSİDAZ ENZİMİNİN
KISMİ SAFLAŞTIRILMASI

Tezi Hazırlayan
Meryem İrem DURĞUN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Naşit İĞCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2024
Nevşehir

T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Montivipera wagneri ve *M. raddei* ENGEREK TÜRLERİNİN
ZEHİRLERİNDEN L-AMİNO ASİT OKSİDAZ ENZİMİNİN
KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI

Tezi Hazırlayan
Meryem İrem DURĞUN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Naşit İĞCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Naşit İĞCİ danışmanlığında Meryem İrem DURĞUN tarafından hazırlanan “*Montivipera wagneri* ve *M. raddei* Engerek Türlerinin Zehirlerinden L-Amino Asit Oksidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

14/06/2024

JÜRİ

Başkan : Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

Üye : Doç. Dr. Naşit İĞCİ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Enver Ersoy ANDEDEN

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

... / ... / 2024

Prof. Dr. Cemal ÇARBOĞA
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Meryem İrem DURĞUN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince engin bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda rol modelim olarak da bana çok şey katan danışmanım Sayın Doç. Dr. Naşit İĞCI'ye,

Maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini hissettiren değerli AİLEME,

Zehir örneklerinin teminindeki arazi çalışmalarından bazılarına katılarak destek vermiş olan Prof. Dr. Mehmet Zülfü YILDIZ (Adıyaman Üniversitesi Biyoloji Bölümü), Dr. Öğr. Üyesi Bahadır AKMAN (İğdır Üniversitesi Teknik Bilimler MYO), Dr. Konrad MEBERT (İsviçre) ve merhum Prof. Dr. Bayram GÖÇMEN'e,

Yüksek basınçlı sıvı kromatografi analizleri için laboratuvar imkanlarından faydalandığımız Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne,

Bu çalışmayı TEZ22F10 nolu projeye destekleyen Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

***Montivipera wagneri* ve *M. raddei* ENGEREK TÜRLERİNİN ZEHİRLERİNDEN
L-AMİNO ASİT OKSİDAZ ENZİMİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Meryem İrem DURĞUN

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

Temmuz 2024

ÖZET

Yılan zehrinin bir bileşeni olan L-amino asit oksidaz (LAAO), L-amino asidin α -keto aside oksidatif deaminasyonunu katalize ederek hidrojen peroksit (H_2O_2) üreten bir flavoenzimdir. L-amino asit oksidaz, apoptoz indüksiyonu, trombosit agregasyonu, kanama, hemostaz ile etkileşim, ödem oluşumu, antitümör, antiparazit, antienflamatuvar, antimikrobiyal, anti-HIV, antilayşmanyaz ve zehirlenme toksisitesi gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu aktiviteleri, kanser ve AIDS gibi bazı hastalıklarda terapötik ajan olarak kullanılma potansiyeline gündeme getirmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmada *Montivipera wagneri* ve *M. raddei* zehirlerinden LAAO enziminin kısmi saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla jel filtrasyon kromatografisi ile fraksiyonlama yapılmıştır. Her bir fraksiyonun enzim aktivitesi substrat olarak L-lösin kullanılarak gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçüm ile test edilmiş ve LAAO enziminin aktif olduğu fraksiyon belirlenmiştir. Ayrıca SDS-PAGE yöntemi ile iki tür için LAAO enzim aktivitesi belirlenen fraksiyonlardaki proteinlerin indirgenmiş ve indirgenmemiş olarak molekül ağırlıkları belirlenmiştir.

Sonuç olarak *M. wagneri* ve *M. raddei* türlerinin zehrinde belirgin aktiviteye sahip LAAO enzimi bulunduğu tespit edilmiş, kısmi saflaştırılması gerçekleştirilerek enzimin yapısı ve aktivitesi hakkında bilgi edinilmiştir. Mevcut tez bu amaçla gerçekleştirilmiş ilk çalışmadır. Bu çalışma ile *M. raddei* ve endemik tür olan *M. wagneri* zehirlerinden LAAO saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılarak enzimin biyoteknolojik açıdan değerlendirilmesi için önemli bir adım atılmıştır.

Anahtar kelimeler: Montivipera wagneri, Montivipera raddei, Yılan zehri, L-amino asit oksidaz, Saflaştırma

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Naşit İĞCİ

Sayfa Adeti: 45

**PARTIAL PURIFICATION of L-AMINO ACID OXIDASE ENZYME FROM
THE VENOMS OF VIPERS *Montivipera wagneri* and *M. raddei***

(MSc Thesis)

Meryem İrem DURĞUN

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCE**

July 2024

ABSTRACT

L-amino acid oxidase (LAAO), a component of snake venom, is a flavoenzyme that catalyzes the oxidative deamination of L-amino acid to α -keto acid, producing hydrogen peroxide (H₂O₂). L-amino acid oxidase has a wide range of biological activities such as induction of apoptosis, platelet aggregation, hemorrhage, interference with hemostasis, edema formation, anti-tumor, anti-parasitic, anti-inflammatory, anti-microbial, anti-HIV, leishmanicidal and contribution to the toxicity. These activities have raised their potential to be used as therapeutic agents in some diseases such as cancer and AIDS.

In this thesis, partial purification of LAAO enzyme from *Montivipera wagneri* and *M. raddei* venoms was carried out. For this aim, fractionation was performed by gel filtration chromatography. The enzyme activities of each fraction were tested by spectrophotometric measurement using L-leucine as substrate and the fractions with the LAAO enzyme activity have been determined. In addition, the reduced and unreduced molecular weights of the proteins in the active fractions of each species were determined by the SDS-PAGE method.

As a result, it was determined that the venom of *M. wagneri* and *M. raddei* species contained LAAO enzyme with significant activity, and information about the structure and activity of the enzyme was obtained by partial purification. The present thesis is the first study carried out for this purpose. With this study, an important step has been taken for the biotechnological evaluation of the LAAO enzyme found in the venoms of *M. raddei* and the endemic species *M. wagneri* by its purification and characterization from these venoms.

Keywords: *Montivipera wagneri*, *Montivipera raddei*, Snake venom, L-amino acid oxidase, Purification

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Naşit İĞCİ

Page Number: 45

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. BÖLÜM.....	1
GİRİŞ	1
1.1 Amaç ve Tez Kapsamı	2
2. BÖLÜM.....	3
KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Yılan Zehirleri	3
2.2 Yılan Zehri L-Amino Asit Oksidazları	4
2.2.1 Yapısal ve fizikokimyasal özellikleri.....	5
2.2.2 Antitümör etkileri.....	9
2.2.3 Platelet agregasyonu üzerindeki etkileri	10
2.2.4 Bakterisidal etkileri	10
2.2.5 Antiviral aktiviteleri.....	11
2.2.6 Antilayşmanyaz aktiviteleri	12
2.3 Montivipera wagneri (Vagner Engereği)'nin Taksonomisi, Biyoekolojik Özellikleri ve Dağılışı	13
2.4 Montivipera raddei (Radde Dağ Engereği)'nin Taksonomisi, Biyoekolojik Özellikleri ve Dağılışı	14

2.5	M. wagneri ve M. raddei Zehirleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	15
3.	BÖLÜM.....	18
	MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1	Kullanılan Cihaz ve Materyaller	18
3.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
3.3	Zehir Örneklerinin Çalışmalar İçin Hazırlanması	20
3.4	Protein Miktar Tayini	21
3.5	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Zehir Proteinlerinin Fraksiyonlanması	22
3.6	L-Amino Asit Oksidaz Enzim Aktivite Tayini	22
3.7	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	24
4.	BÖLÜM.....	26
	BULGULAR.....	26
4.1	Ham Zehirlerin Protein Miktar Tayinleri	26
4.2	M. wagneri ve M. raddei Ham Zehirlerinin HPLC ile Fraksiyonlanması.....	27
4.3	Fraksiyonların L-Amino Asit Oksidaz Aktivite Tayini	30
4.4	SDS-PAGE Bulguları.....	32
4.4.1	SDS-PAGE için fraksiyonlarda protein miktar tayini.....	32
4.4.2	SDS-PAGE.....	33
5.	BÖLÜM.....	36
	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	36
	KAYNAKLAR	39
	ÖZGEÇMİŞ	45

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Çeşitli yılan zehirlerinden saflaştırılan LAAO enzimlerinin yapıları ve substrat spesifikliği.....	7
Tablo 3.1. Kullanılan cihaz ve kolonlara ait bilgiler.....	18
Tablo 3.2. Kullanılan kimyasallar	20
Tablo 3.3. Bradford yönteminin uygulanmasında hazırlanan tüplerin içerikleri	21
Tablo 3.4. Metot optimizasyonunda kullanılan farklı tamponlar ve yükleme miktarları.....	22
Tablo 3.5. L-amino asit oksidaz enzim aktivite ölçümü için tüplerin hazırlanışı.....	23
Tablo 3.6. SDS-PAGE jellerinin hazırlanışı	24
Tablo 4.1. BSA standartlarının OD değerleri ve ortalamaları	26
Tablo 4.2. <i>M. wagneri</i> ve <i>M. raddei</i> ham zehir OD değerleri ile hesaplanan konsantrasyon ve yüzde değerleri	27
Tablo 4.3. Fraksiyonların enzim aktiviteleri	31
Tablo 4.4. Aktif fraksiyonların protein miktar tayininde kullanılan BSA standartlarına ait OD değerleri.....	32
Tablo 4.5. Fraksiyonların protein miktar tayini sonuçları	33
Tablo 4.6. SDS-PAGE jel görüntüsüne göre 2. ve 6. kuyucuklara (indirgenmemiş fraksiyonlara) ait bantların yaklaşık moleküler ağırlıkları.....	35
Tablo 4.7. SDS-PAGE jel görüntüsüne göre 4. ve 8. kuyucuklara (indirgenmiş fraksiyonlara) ait bantların yaklaşık moleküler ağırlıkları.....	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. LAAO reaksiyon mekanizması.....	4
Şekil 2.2. <i>Calloselesma rhodostoma</i> 'dan izole edilen LAAO'nun 3 boyutlu yapısı.....	6
Şekil 2.3. <i>Montivipera wagneri</i> (Vagner Engereği) (Fotoğraf: Naşit İĞCİ)	14
Şekil 2.4. <i>Montivipera raddei</i> (Radde Dağ Engereği) (Fotoğraf: Naşit İĞCİ)	15
Şekil 4.1. BSA dilüsyonları ile oluşturulan standart eğri grafiği	27
Şekil 4.2. Deneme-1 0.1M PB + 0.1 M NaCl, 0.5 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon..	28
Şekil 4.3. Deneme-2 0.1M PB, 0.5 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon	28
Şekil 4.4. Deneme-3 0.1M PB + 0.1 M Na ₂ SO ₄ , 0.5 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon	28
Şekil 4.5. Deneme-4 0.1M PB + 0.1M NaCl, 0.5 mL/dk akış hızı, 15 µL enjeksiyon...	28
Şekil 4.6. Deneme-5 0.1M PB + 0.1 M Na ₂ SO ₄ , 0.7 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon	29
Şekil 4.7. Deneme-6 0.1M PB + 0.05M Na ₂ SO ₄ , 0.5 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon	29
Şekil 4.8. <i>M. wagneri</i> ham zehrinin fraksiyonlanmasına ait 280 nm dalga boyunda elde edilmiş kromatogram görüntüsü	29
Şekil 4.9. <i>M. raddei</i> ham zehrinin fraksiyonlanmasına ait 280 nm dalga boyunda elde edilmiş kromatogram görüntüsü	30
Şekil 4.10. LAAO enzim aktivitesi tayini.....	31
Şekil 4.11. Aktif fraksiyonların protein miktar tayininde kullanılan BSA standartlarına ait kalibrasyon grafiği	33
Şekil 4.12. Ham zehir ve fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü	34

SİMGELER VE KISALTMALAR

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
2D-PAGE	İki boyutlu poliakrilamit jel elektroforezi
ADP	Adenozin difosfat
APS	Amonyum persülfat
BSA	Sığır serum albümini
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
DTT	Ditiyotritol
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FMN	Flavin mononükleotid
Fr	Fraksiyon
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HRP	Yaban turpu peroksidazı
kDa	Kilodalton
LAAO	L-Amino asit oksidaz

M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Mora	<i>Montivipera raddei</i>
Mowa	<i>Montivipera wagneri</i>
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
ORT	Ortalama
PB	Fosfat tamponu
pH	Hidrojen potansiyeli
pI	İzoelektrik nokta
PRP	Plateletten zengin plazma
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
SvLAAO	Yılan zehri L-amino asit oksidaz enzimi
TEMED	Tetrametiletildiamin

U	Ünite
UV/VIS	Görülebilir ultraviyole
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim



1. BÖLÜM

GİRİŞ

Her yıl dünya çapında yaklaşık olarak 5 milyondan fazla insan yılan ısırığına maruz kalmaktadır. Bunun 2 milyondan fazlası zehirlenme vakasıdır ve yaklaşık 137.000'i ölümlerle sonuçlanmaktadır. Bunun yanı sıra her yıl giderek artan amputasyon ve diğer kalıcı hasarlar meydana gelmektedir (WHO 2024). Yılan ısırığı klinik belirtileri, toksisite derecesi ve zerk edilen zehrin miktarına bağlıdır. Yılan ısırığı sonucu birçok belirti ve semptom gelişir (felç, sistemik miyozis, böbrek hasarı ve yetmezliği, kardiyotoksisite ve lokal doku hasarı) (Koh ve ark. 2006). Sonuç olarak dünya genelinde yılan zehirleriyle ilgili çalışmalar artmakta ve antiserumlar geliştirilmektedir. Bunun dışında, araştırmacılar yılan zehirlerinin etki mekanizmalarını araştırarak onların terapötik ve diyagnostik ajan olarak geliştirilmesi üzerine de çalışmalar yapmaktadırlar.

Bothrops jararaca zehrinden izole edilen brakidinin güçlendirici peptitten yola çıkılıp sınıfının ilk antihipertansif ilacı olarak anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörü kaptopril geliştirilmiştir (Averin ve Utkin 2021). *Echis carinatus* zehrinden izole edilen bir disintegrin olan echistatin molekülü modifiye edilerek, antiplatelet tedavisinde kullanılan öncü ilaç Tirofiban geliştirilmiştir (Lazarovici ve ark. 2019). Bir diğer antiplatelet ajan olarak geliştirilen disintegrin ailesi proteini barbourinden elde edilen, siklik peptit olan Eptifibatid (*Sistrurus miliarius barbouri* zehrinden), GBIIb/IIIa reseptörünün spesifik bir inhibitörüdür (Tonin ve Klen 2023).

Nitekim yılanların zehirleri dışında diğer zehirli canlılara ait zehir bileşenlerinin de terapötik potansiyelleri olup sentetik olarak geliştirilip kullanılan örnekler mevcuttur. Ziconotide, *Conus magus* zehrinde bulunan ω -konotoksin MVIIA'nın sentetiği olan, N tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanallarını (Cav2.2) bloke eden 25 amino asitten oluşan bir peptit model alınarak geliştirilmiş olup, analjezik olarak kullanılmaktadır (Bordon ve ark. 2020; Mcgovern 2007) bunun yanı sıra koni salyangozunun zehrine ait bileşenler ile ilgili devam eden klinik çalışmalar mevcuttur. Gila canavarı *Heloderma suspectum* zehrinde bulunan exendin-4'ün sentetiği olan Exenatide, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan glukagon benzeri peptit-1 analogudur ve sonrasında modifiye edilip yarılama ömrü uzatılarak Lixisenatide geliştirilmiştir ve tip 2 diyabette kullanılmaktadır (Bordon ve ark.

2020). Yılan zehirlerinin ve diğer zehirli hayvanlardan alınan zehirlerin terapötik olarak kullanılmalarının yanı sıra tanı amaçlı, kozmetikte veya alternatif tedavi yöntemi olarak da kullanımları bulunmaktadır (Bordon ve ark. 2020).

1.1 Amaç ve Tez Kapsamı

Yılan zehirlerinde bulunan protein sınıflarından biri de L-amino asit oksidaz (LAAO) enzimidir. Yılan zehirlerinde görece daha az miktarda bulunmakla birlikte önemli biyolojik aktiviteleri vardır. Bu tez çalışmasının amacı Türkiye’de yayılış gösteren *Montivipera raddei* ve endemik tür olan *Montivipera wagneri* engerek türlerine ait zehirlerden LAAO enziminin kısmi saflaştırmasını gerçekleştirmektir. Bu amaca uygun olarak tez kapsamında jel filtrasyon kromatografisi tekniğiyle fraksiyonlama yapılması, elde edilen fraksiyonlarda L-amino asit oksidaz enziminin aktivitesinin tespit edilerek aktif fraksiyonun belirlenmesi, bu fraksiyonun SDS-PAGE jel elektroforezi ile moleküler ağırlığının ve yapısının değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Sanz ve ark. (2008) ve Nalbantsoy ve ark. (2017)’nin yapmış oldukları çalışmada *M. raddei* zehrinde L-amino asit oksidaz enzimi tanımlanmıştır ancak tam olarak saflaştırılması gerçekleştirilmemiştir. Literatürde, *M. raddei* zehri ile ilgili kısıtlı da olsa birkaç çalışma bulunmakla birlikte *M. wagneri* zehrinin protein içeriği ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasıyla *M. wagneri* ve *M. raddei* zehirlerinden LAAO saflaştırmasına yönelik bir çalışma gerçekleştirilmiş olup, elde edilen veriler bilimsel literatüre katkı sağlayacaktır ve enzimlerin biyolojik aktivitelerinin değerlendirebileceği sonraki çalışmaları mümkün kılacaktır.

2. BÖLÜM

KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Yılan Zehirleri

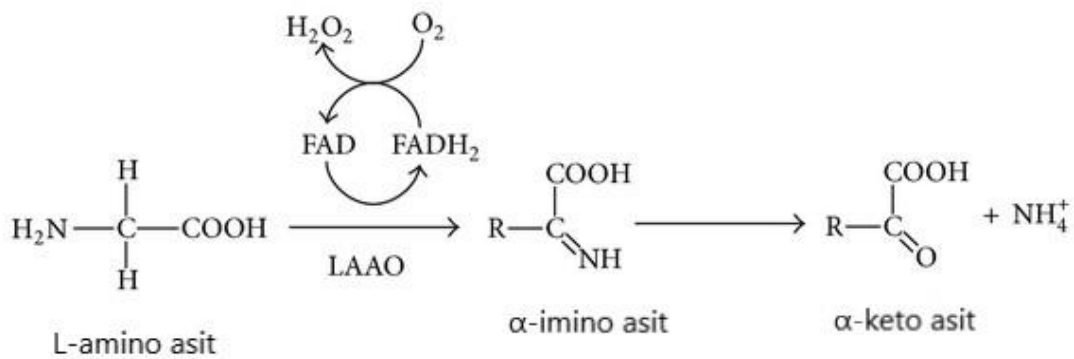
Araştırmacılar zehir bileşenlerinin özelliklerini gözlemlemeye yirminci yüzyılın ortalarından başlayarak terapötik potansiyellerini keşfedecek çalışmalar (enzimleri izole etme, aktivitelerini belirleme) yapmışlardır. Yılan zehirleri başlıca peptit ve proteinler olmak üzere birçok biyoaktif bileşene sahiptir ve bunun yanı sıra izoformlarını da barındırmaktadırlar. Proteinler ve izoformları arasında işlevsel olarak farklılık gözlemlenebilmektedir (Oliveira ve ark. 2022).

Yılan zehri bileşenleri türler arası değişkenlik gösterirken yaşa, cinsiyete ve besinlerine göre de farklılık gösterebilmektedir. Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae ve Colubridae familyalarına ait türler zehirli olarak sınıflandırılmaktadır (Bocian ve Hus 2020). Elapid zehirleri genellikle nörotoksik, sitotoksik ve kardiyotoksik bulgulara yol açarken; engerekler tarafından ısırılma vakalarındaki bulgular ise miyotoksisite ve hemotoksisitedir (Oliveira ve ark. 2022). Yılan zehirleri temelde protein yapısındaki çeşitli bileşenlerin karışımından oluşur. Bu bileşenlerin başlıcaları metalloproteinazlar, serin proteinazlar, fosfolipaz A₂ (PLA₂), L-amino asit oksidaz (LAAO), hyaluronidaz, fosfodiesteraz, kunitz tipi proteaz inhibitörleri, C-tipi lektin benzeri proteinler (CLP), disintegrinler, vasküler endotelyal (VEGF) ve sinir büyüme faktörleri (NGF), vazoaktif peptitler, üç parmak toksinler (3Ftx) ve sistein bakımından zengin proteinler (CRISP), küçük organik bileşenler (karbonhidrat, serotonin, histamin, sitrat, nükleozit) ve inorganik iyonlardır (kalsiyum, kobalt, magnezyum, bakır, demir, potasyum) (Izidoro ve ark. 2014; Jafari ve ark. 2023). Bu bileşenler sinerjik olarak etki edebilmektedir (Oliveira ve ark. 2022). Yılan zehirleri proteinleri genel olarak iki gruba ayrılırlar: toksisiteye etkisi az olan proteinler ve farmakolojik etkileri iyi bilinen, toksisiteye asıl sebep olan toksinler. Enzimler genel olarak moleküler ağırlıkları yüksek olan proteinlerdir. Enzimlerin toksisiteye olan etkileri miktarı ve özellikle de zehrin zerk edildiği canlıdaki aktivite süresine bağlıdır. Yılan zehirlerinin sahip oldukları enzimler özellikleri bakımından farklılık göstermektedir. Genel olarak kan pıhtılaşma mekanizmasını bozarak veya kompleman aktivasyonunu ile, doku ve hücrelerin parçalanması veya etkili oldukları

metabolizmayı hızlandırarak etki ederler. Vipéridae familyası enzimler yönünden zengin zehirlere sahiplerdir. Yılan zehirlerinde bulunan protein ve peptitlerin sahip olduğu çok çeşitli farmakolojik özellikler önemli tıbbi uygulamalar ve ilaç geliştirme açısından değerlendirilmelerine olanak sağlar (Guo ve ark. 2012; Jafari ve ark. 2023). Bu aktivitelerden bazıları apoptoz indüksiyonu, trombosit agregasyonu inhibisyonu, hemoraji, hemostaz, ödem, antikoagülan/prokoagülan etki, antitümör, antiparazitik, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal etkilerdir (Guo ve ark. 2012). Yılan ısırığı vakalarının patofizyolojisini bileşenlerin kombinasyonları ve oranı etkiler (Oliveira ve ark. 2022).

2.2 Yılan Zehri L-Amino Asit Oksidazları

Yılan zehirleri birçok hastalığın tedavisinde umut vadeden bileşenler içermektedir. Bu bileşenlerden biri de L-amino asit oksidaz (LAAO) enzimidir (Mukherjee ve ark. 2015). Yılan zehri L-amino asit oksidazları (svLAAO, E.C 1.4.3.2), diğer canlılardakine benzer şekilde bir L-amino asidi oksidatif stres yoluyla α -keto aside ve amonyağa dönüştürürken, yan ürün olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturur. LAAO yılan zehirlerinde diğer ana bileşenlere göre biraz daha düşük miktarda olmakla birlikte yaygın olarak bulunur ve toksisiteye etki ettikleri bilinmektedir (Ullah 2020).



Şekil 2.1. LAAO reaksiyon mekanizması (Izidoro ve ark. 2014)

Şekil 2.1’de görüldüğü gibi L-amino asit oksidaz indirgenme yarı reaksiyonunda substratı ortamdaki flavin adenin dinükleotit (FAD) aracılığıyla α -imino aside, ardından α -keto aside dönüştürür ve reaksiyon sonucunda amonyak oluşur. Ortamdaki FAD’ın indirgenmesi ile oluşan FADH₂ oksitlenerek H₂O₂ üretir (Izidoro e ark. 2014).

1990’lardan önce svLAAO’larıyla ilgili reaksiyon mekanizması ve pH değişiklikleri veya donma ile inaktivasyon gibi enzimatik ve fizikokimyasal özellikleri üzerine odaklı çalışmalar mevcuttu ve genellikle amino asitlerin optik izomerlerinin tanımlanmasında ve α -keto asitlerin hazırlanmasında kullanılmaktaydı. Gelişen teknoloji ile *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar svLAAO’ların tıbbi ve farmakolojik özelliklerinin ortaya çıkarılarak, öneminin anlaşılmasını sağlamıştır (Guo ve ark. 2012; Izidoro ve ark. 2014; Rodrigues ve ark. 2009; Stábeli ve ark. 2004).

SvLAAO’lar;

- apoptozis indükleyici, platelet agregasyonunu inhibe edici veya indükleyici (Soares ve ark. 2020; Stábeli ve ark. 2007; Tönismägi ve ark. 2006),
- antimikrobiyal (Guo ve ark. 2012; Soares ve ark. 2020; Tönismägi ve ark. 2006; Toyama ve ark. 2006),
- antilayşmanyaz (Barbosa ve ark. 2021; de Freitas ve ark. 2023),
- anti-HIV (Zhang ve ark. 2003)

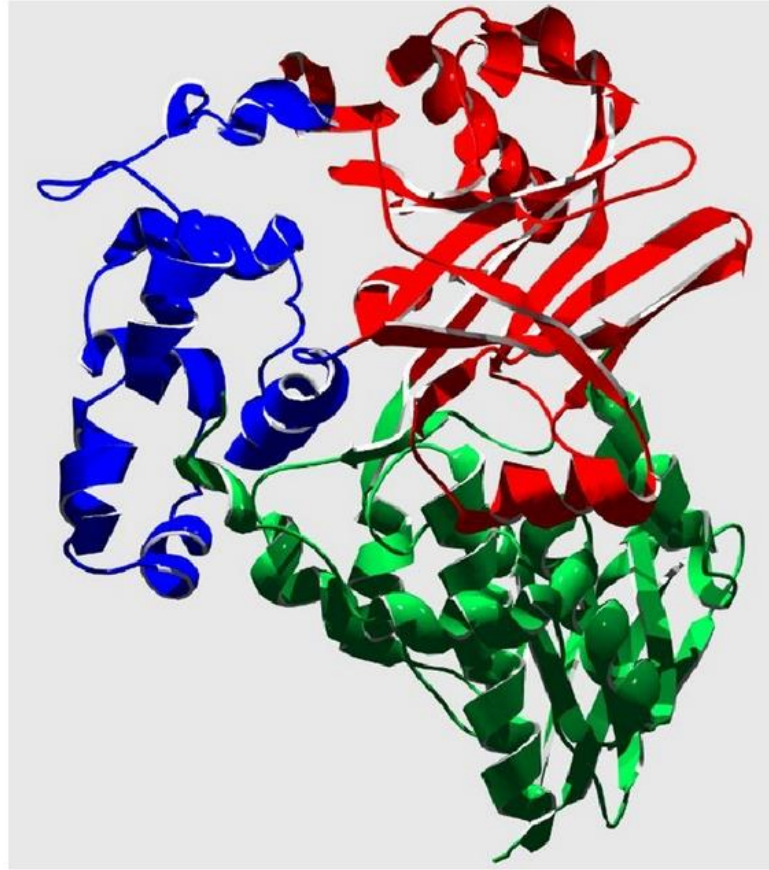
olmak üzere çeşitli biyolojik aktivite göstermektedirler. Yapılan çalışmalar ışığında LAAO’nun enzimatik olmayan yolla ürettiği H₂O₂’den kaynaklandığı düşünülen bu aktivitelerin, H₂O₂ tutucu katalazın ortama eklendiğinde inhibe edilmesi bu görüşü desteklemektedir (Zhang ve ark. 2003).

2.2.1 Yapısal ve fizikokimyasal özellikleri

Yılan zehri LAAO enzimleri yapısal olarak üç farklı domainden oluşur: FAD bağlanma bölgesi, substrat bağlanma bölgesi ve sarmal alan (Ullah 2020). SvLAAO’lar insan monoamin oksidaz, bakteri ve mantar LAAO’ları FAD bağlanma bölgesinde sekans benzerliği göstermektedir (Jin ve ark. 2007) ve bu proteinler fare interlökin 4 ile indüklenen Fig1 proteini ile %30’dan fazla benzerlik paylaşmaktadır (Zhang ve ark.

2003). Viperidae, Crotalidae ve Elapidae türlerine ait zehirlerde genellikle FAD veya flavin mononükleotit (FMN) bağlayıcı glikoproteinler bakımından zengindirler. Yılan zehirlerinin sarı renkte olmasından sorumlu olan bu enzim ürettiği H_2O_2 'den oluşan oksidatif stres yoluyla ısırılma sonrası venomik toksisiteye (envenomasyon) katkıda bulunur (Guo ve ark. 2012). LAAO'lar hidrofobik ve aromatik amino asitlere karşı katalitik özgülük gösterirler. Optimum pH, sıcaklık, moleküler ağırlıkları, yapıları ve izoelektrik noktaları farklı türlerde oldukça değişkendir (Izidoro ve ark. 2014).

LAAO'ların aktivitesi pH, sıcaklık, şelatlama ajanları ve inhibitörler gibi koşullara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Yüksek veya düşük sıcaklıklarda inaktive olup uygun koşullar sağlandığında tekrar aktif olabilirler (Tan ve ark. 2018).



Şekil 2.2. Calloselasma rhodostoma'dan izole edilen LAAO'nun 3 boyutlu yapısı. α -helikal domain (mavi renk), FAD bağlayıcı domain (yeşil renk), substrat bağlayıcı domain (kırmızı renk) (Izidoro ve ark. 2014)

Tablo 2.1.'de görüldüğü üzere çeşitli yılan türlerinden izole edilen LAAO'lar çoğunlukta homodimer yapıdadırlar. Enzim doğal formda 100-140 kDa, alt birimlerine ayrılmış formları veya monomerik yapıda (Rey-Suárez vd., 2018; Wei vd., 2009; More vd., 2010; Jin vd., 2007) olanlar ise 50-70 kDa ağırlığında gözükmektedir. Önceki literatür bilgisine göre hazırlanmış tablodaki verilere bakarak LAAO'ların hidrofobik ve aromatik amino asitlere seçicilik gösterdiği söylenebilir.

Tablo 2.1. Çeşitli yılan zehirlerinden saflaştırılan LAAO enzimlerinin yapıları ve substrat spesifikliği

Yılan Türü	Enzim Adı	Moleküler Ağırlık ve Multimerik Yapı	Multimerik Yapı	pI	Substrat Spesifikliği	Kaynak
<i>Bothrops alternatus</i>	Balt-LAAO-I	123 kDa (jel filtrasyon), 66 kDa (SDS-PAGE)	Homodimer	~5.37	L-Phe, L-Tyr, L-Met, L-Leu	(Stábeli ve ark. 2004)
<i>Agkistrodon acutus</i>	ACTX-6	49-97 kDa (SDS-PAGE), 100 kDa (boyut dışarılama), 96 kDa (MALDI-TOF)	Homodimer	-	L-Met, L-Leu, L-Trp, L-Phe, L-Arg	(Zhang ve ark. 2008)
<i>Bothrops moojeni</i>	BmooLAAO-I	130-64 kDa (kütle spektrometresi) 66 kDa (SDS-PAGE)	Homodimer	-	L-Phe, L-Try, L-Trp, L-Leu	(Stábeli ve ark. 2007)
<i>Ophiophagus hannah</i>	Oh-LAAO	64-67 kDa (SDS-PAGE)	Monomer	-	L-Met, L-Leu, L-His, L-Lys, L-Ile	(Jin ve ark. 2007)
<i>Bungarus caeruleus</i>	LAO	55+-1 kDa (SDS-PAGE)	Monomer	-	L-Leu, L-Met, L-Glu, L-Ile, L-Phe, L-Arg	(More ve ark. 2010)
<i>Bungarus fasciatus</i>	BF-LAAO	55 kDa (SDS-PAGE)	Monomer	-	L-Tyr, L-Asp, L-Phe, L-Glu, L-Trp	(Wei ve ark. 2009)

Tablo 2.1. Devamı

<i>B. pauloensis</i>	Bp-LAAO	65 kDa (SDS-PAGE)	Homodimer	6.3	L-Met, L-Leu, L-Phe	(Rodrigues ve ark. 2009)
<i>Vipera berus berus</i>	LAAO	59 kDa (SDS-PAGE), 126 kDa (jel filtrasyon)	Homodimer	~4.8	L-Met, L-Leu, L-Phe, L-Ile, L-Arg, L-His	(Samel ve ark. 2006)
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	CollinLAAO-I	63.1 kDa (SDS-PAGE, indirgenmiş)	-	-	L-Leu, L-Arg	(Freitas ve ark. 2023)
<i>Vipera lebetina</i>	LAAO	66 kDa (SDS-PAGE), 140 kDa (boyut dışarılama)	Homodimer	-	L-Met, L-Trp, L-Leu	(Tönismägi ve ark. 2006)
<i>Micrurus lemniscatus</i>	ML-LAAO	70 kDa (SDS-PAGE)	Homodimer	~6.3-8.9	L-Tyr, L-Trp, L-Leu, L-Phe, L-Met, L-Thr	(Soares ve ark. 2020)
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	Casca LAO	115-125 kDa (moleküler dışarılama HPLC) 68 kDa (2D-PAGE)	Homodimer	5.4	L-Asp L-Glu	(Toyama ve ark. 2006)
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	MPV-LAAO	132 kDa (jel filtrasyon), 66 kDa SDS-PAGE	Homodimer	4.4	L-Phe, L-Try, L-Leu	(Ponnudurai ve ark. 1994)
<i>Micrurus mipartitus</i>	MipLAAO	~57 kDa	Monomer	8.85-8.93	L-Trp, L-Tyr, L-Leu	(Rey-Suárez ve ark. 2018)

2.2.2 Antitümör etkileri

Apoptoz, yani programlanmış hücre ölümü, hücrelerin gelişimi sürecinde rol alan fizyolojik bir süreçtir. Geri dönüşümü olmayan hasarlı hücrelerin yok edilmesini sağlayan mekanizmadır. Bu mekanizma içsel ve dışsal yolaklarla gerçekleşir ve kaspazlar tarafından aktive edilir (Tavares ve ark. 2016). Literatürdeki bilgiler ışığında svLAAO'ların bu aktiviteyi tetikleyerek kanser hücreleri üzerinde ölümcül etki sağladığı görülmektedir. Apoptozun indüklenmesi ve anjiyogenezin inhibisyonu yoluyla memeli kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eden LAAO'lar, yılan zehrinin iyi çalışılmış, önemli bir bileşenidir ve antikanser ilaç geliştirme için öncü bir bileşik olarak potansiyelini göstermektedir (Mukherjee ve ark. 2015). *Vipera berus berus* türünden izole edilen LAAO'nun insan epitelyoid karsinom (HeLa) ve insan kronik miyeloid lösemi (K562) hücrelerinde düşük konsantrasyonlarda apoptozu indüklediği; yüksek konsantrasyonlarda ise nekrozu indüklediği rapor edilmiştir (Samel ve ark. 2006). *Ophiophagus hannah* türünden saflaştırılan Oh-LAAO için yapılan sitotoksikite çalışmasında, insan kanser hücre hatları (MCF-7, A549) üzerinde etkisinin yüksek olduğu; kontrol gruplarında ise (NL-20 ve 184B5 karşılık gelen kanser olmayan hücre hatları) etkisinin doza ve zamana bağlı olarak az olduğunu, apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Li Lee ve ark. 2014). Bir başka çalışmada *Calloselasma rhodostoma* zehrinden izole edilen LAAO'nun (CR-LAAO), HL-60 (insan promiyelositik lösemi) ve HepG2 (insan karaciğer karsinomu) tümör hücre hatları üzerinde 24 saatlik uygulamadan sonra apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir. Ayrıca HL-60 ve HepG2 hücre hatlarında apoptozun içsel ve dışsal yolakların aktive edilmesiyle gerçekleştiği, HepG2 hücrelerinde içsel yolağın aktivasyonunun daha belirgin olduğu bildirilmiştir (Costa ve ark. 2017). *Crotalus adamanteus* zehri LAAO'sunun insan yumurtalık kanseri hücre hatları (CAOV3 ve OCVAR3) üzerinde zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik etkisinin arttığı, enzimin farklı konsantrasyonlarında CAOV3 ve OCVAR3 kanser hücrelerinde hücre canlılığının doza bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir. *Crotalus adamanteus* LAAO enziminin *in vivo* antitümör etkisi immünokompetan dişi fareler üzerinde araştırılmış olup enzimin farklı konsantrasyonları ile tedavi edilen yumurtalık kanseri taşıyan farelerde kontrol grubuna kıyasla (tümör taşıyan enzim ile tedavi edilmemiş) ince bağırsak yüzeyindeki veziküller şişliklerin azaldığı veya ortadan kalktığını rapor etmişlerdir (Xiong ve ark. 2022). Bunlara

benzer diğer çalışmalarda da genel olarak svLAAO'ların anti-kanser etkileri olduğu ortaya koyulmuştur.

2.2.3 Platelet agregasyonu üzerindeki etkileri

Yılan zehirlerinden saflaştırılan LAAO'ların platelet agregasyonu üzerinde de etki ettiği yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur. Örneđin; *Crotalus durissus cascavella* alt türünden izole edilen LAAO enziminin platelet agregasyonunu indüklediği, enzimin katalaz ile inkübe edildikten sonra aktivitenin sonlandığı rapor edilmiştir (Toyama ve ark. 2006). *Bothrops alternatus* zehrinden saflaştırılmış olan ve Balt-LAAO-I olarak isimlendirilen enzimin platelet agregasyonunu doza bağlı olarak indüklediği bildirilmiştir (Stábeli ve ark. 2004). Jin ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada *O. hannah* zehrinden LAAO (Oh-LAAO) izole edilip trombosit agregasyonu inhibe veya indükleme etkisi kontrol edildiğinde adenzin difosfat (ADP) tarafından indüklenen trombosit agregasyonunu ve tromboksan A₂ mimetiği olan U46619 tarafından indüklenen trombosit agregasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. *Bungarus caeruleus* LAAO enzimi plateletten zengin plazma (PRP) ile pre-inkübasyona bırakılıp ardından ADP tarafından indüklenen trombosit agregasyonu ile etkileştirildiğinde aktiviteyi inhibe ettiği bildirilmiştir (More ve ark. 2010). *Vipera berus berus* zehrinden izole edilen LAAO enzimi normal PRP ile ön inkübasyona bırakıldıktan sonra ADP ile indüklenen trombosit agregasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir (Samel ve ark. 2006). LAAO'nun trombosit agregasyonu aktivitesinin bu çalışmaların hepsinde katalaz ile inhibe edildiği rapor edilmiştir ve aktivitede H₂O₂'nin bu süreçteki rolüne işaret etmektedir.

2.2.4 Bakterisidal etkileri

Bakterilerin antibiyotiklere direnç göstermesi, günümüzün önemli problemlerinden biridir. Bu sorun bakteriyel enfeksiyon kaynaklı ölüm nedenlerinin başında gelmektedir ve küresel olarak insan sağlığını etkileyen tehditlerden biri olarak görölmektedir (Bocian ve Hus 2020). Yılan zehri LAAO'ları antimikrobiyal özellikleriyle bu konuda ön plana çıkmaktadır ve yapılmış bazı önemli çalışmalara aşağıda değinilmiştir.

Balt-LAAO-I Gram pozitif (*S. aureus*) ve Gram negatif (*E. coli*) bakterileri üzerinde antibakteriyel etki göstermiştir (Stábely ve ark. 2004). *Micrurus lemniscatus*'tan izole edilen LAAO (ML-LAAO) ile Gram pozitif (*S. aureus*) ve Gram negatif (*E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginos*) suşları üzerinde yapılan çalışmada Gram pozitif bakteri suşunda daha etkili olduğu ve antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Soares ve ark. 2020). Toyama ve ark. (2006)'nın raporuna göre CascaLAAO Gram pozitif (*Staphylococcus mutans*) suşlara karşı daha etkili bir aktivite sergilemiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise *Bothrops jararacacussu* ve *B. jararaca* zehirleri önce *S. aureus* suşlarında test edilerek bakterisidal aktivitesi belirlenmiş ardından bu iki zehir çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakteri suşlarına karşı incelenmiştir. Çalışma zehirlerin bu bakteriler üzerinde büyümeyi engellediğini göstermiştir (*E. faecalis* ve *E. coli*'nin zehirlere karşı dirençli olduğu bildirilmiştir). Bu sonuçlar ışığında *B. jararaca* zehrinin fraksiyonlaması yapılarak anti-*S. aureus* aktivitesinin LAAO enziminden kaynaklandığı tespit edilmiştir ve katalaz ile aktivite inhibe edilmiştir. (Ciscotto ve ark. 2009).

2.2.5 Antiviral aktiviteleri

SvLAAO'ların ilk antiviral aktivite raporu *Trimeresurus stejnegeri* (Çin yeşil ağaç engereği) zehrinden izole edilen ve TRV-LAO olarak isimlendirilen enzim ile bildirilmiştir. Bu çalışmada TSV-LAO'nun HIV-1 enfektivitesi üzerinde sinsityum oluşumuna olan etkisi araştırılmış olup, enzimin doza bağlı olarak sinsityum oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Katalaz varlığında bu aktivite tam olarak engellenememiş ancak 5 kat düştüğü bildirilmiştir (Zhang ve ark. 2003). *Bothrops jararaca* zehrinden izole edilen LAAO (BjarLAAO-I), Dengue virüsü tip 3 (DENV-3) ile enfekte edilen hücreler, BjarLAAO-I ile muamele edildikten sonra kontrol grubuna kıyasla viral titrede azalma gösterdiği bildirilmiştir (Sant'Ana ve ark. 2008).

Bu çalışmalara bakıldığında svLAAO'ların antiviral potansiyeli olabileceği de görülmektedir.

2.2.6 Antilayşmanyaz aktiviteleri

Leishmania cinsine ait hücre içi parazitlerinin sebep olduğu layşmanyaz (*Leishmaniasis*), visseral, kutanöz ve mukokütanöz klinik formlarında hastalık oluşturur ve hastalığın en şiddetli formu mukokütanöz, *L. braziliensis* türü tarafından oluşur. *Leishmaniasis*, tropikal ve subtropikal ülkelerde ihmal edilen endemik bir hastalıktır. Bu hastalığın tedavisinde kullanılan çeşitli ilaçlar mevcuttur fakat ilaçlar toksik ve hastalarda yan etkilere sebep olmaktadır (Barbosa ve ark. 2021). Daha az toksik ve doğal ürünlerin geliştirilmesi ve ilaç olabilme potansiyeline sahip bileşenlerin araştırılması önem arz etmektedir. SvLAAO'ların bu potansiyeli yapılan çalışmalarla birlikte ortaya konulmuştur. Bu konuda yapılmış bazı çalışmalara aşağıda değinilmiştir.

Micrurus lemniscatus ML-LAAO'nun *L. chagasi* ve *L. amazonensis* promastigotlarında doza bağlı olarak parazitlerin ölümünü indüklediği ve *L. chagasi* türünde daha etkili olduğu bildirilmiştir (Soares ve ark. 2020). Barbosa ve ark. (2021), *Bothrops jararacussu* (BjussuLAAO-II) ve *B. moojeni* (BmooLAAO-II) türlerinin zehirlerinden izole ettikleri LAAO'ları *L. amazonensis* ve *L. braziliensis* türlerinin promastigot formları üzerinde test ederek BmooLAAO-II her iki parazit türünde de %70'den fazlasını öldürdüğü; BjussuLAAO-II *L. amazonensis* promastigot formlarında %70'inden fazlasının, *L. braziliensis* promastigot formlarında ise daha fazla etki göstererek %90 kadar canlı promastigot formların ölümüne neden olduğu bildirilmiştir ve katalaz bu aktiviteyi tamamen durdurarak aktivitenin H₂O₂ tarafından gerçekleştirildiğini göstermiştir. Ayrıca bu toksinlerin her iki *Leishmania* türleri üzerinde hücre büyümesine olan etkileri araştırılarak antiproliferatif etki ortaya konulmuştur ve türlerin toksinlerle muamelesinden 24 saat sonrasında hücre çoğalmasını tamamen baskıladığı bildirilmiştir (Barbosa ve ark. 2021). Burada yapılan çalışmalarda katalaz ile oluşan aktivitenin durdurulduğu ve H₂O₂'in aktivitedeki rolü gösterilmiştir.

2.3 *Montivipera wagneri* (Vagner Engereği)'nin Taksonomisi, Biyoekolojik Özellikleri ve Dağılışı

Türkiye'ye özgü endemik bir dağ engereği olan *Montivipera wagneri* (Nilson & Andrén, 1984), Türkiye'nin doğusunda dağılım göstermektedir ve Kars, Ağrı, Muş, Erzurum, Bingöl, Elazığ ve Tunceli illerinde lokaliteleri bildirilmiştir (Mebert ve ark. 2020). Uzunlukları 90 cm kadar olabilen, boyunları ince, göz bebeği dikey, başın üst kısmında bulunan pullar küçük pullar da dahil olmakla birlikte sırt bölgesindeki pullar da karinalıdır. Sırt bölgesi kahverengi bej veya gri renkte olup sırttaki zikzak şeklinde düzenlenen lekelerin kenarları koyu, iç kısımları kırmızımsı veya sarımsı kahverengine sahip olabilmektedir. Desenler ayrı veya bitişik, kuyruğa doğru bant yapısı, başın yanlarında koyu şeritler ve gövde yanlarında ise leke sıraları görülmektedir. Karın bölgesi ise açık gri ve dağınık koyu desenleri vardır. Endemik tür olan *M. wagneri* seyrek bitkili, taşlı ve kayalı dağ yamaçlarında yaşar ve bu bölgelerdeki akarsulara yakın yerlerde görülürler. Kemirici, kertenkele ve kuşlarla beslenirler.

Uluslararası evcil hayvan ticareti için toplanması, baraj yapımı vb. nedenlerle habitat kaybı gibi faktörler popülasyonunda önemli düşüşlere sebep olduğundan Dünya Doğayı ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği (IUCN) tarafından Kritik Tehlike Altında (CR) olarak listelenmiştir (IUCN 2024a). Türün taksonomik gruplandırması aşağıda yazılmıştır.

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Reptilia

Takım: Squamata

Aile: Viperidae

Alt aile: Viperinae

Cins *Montivipera*

Tür: *Montivipera wagneri* (Nilson & Andrén, 1984)



Şekil 2.3. *Montivipera wagneri* (Vagner Engereği) (Fotoğraf: Naşit İGÇİ)

2.4 *Montivipera raddei* (Radde Dağ Engereği)'nin Taksonomisi, Biyoeolojik Özellikleri ve Dağılışı

Montivipera raddei (Boettger, 1890) (Radde dağ engereği), Türkiye, İran, Ermenistan, Azerbaycan ve muhtemel Irak'ta bulunur. Türkiye'de Kars, Ağrı, Iğdır, Van, Hakkari illerinden bilinmektedir. İlk olarak Boettger tarafından 1890 yılında Tuzluca, Iğdır'dan toplanan numunelere dayanılarak tanımlanmıştır. Uzunlukları 60-80 cm arasında değişmektedir (100 cm kadar olabilir) ve nispeten kalın yapılı olup boynu incedir. Vücudun sırt tarafı grimsi kahverengi olup üzerinde turuncumsu zikzak bant veya köşeli lekeler bulunur. Dağlık bölgelere adapte olmuş bir türdür, daha çok ormansız taşlık kısımlarda bulunur. *M. raddei*'nin doğadaki biyolojileri hakkında geniş bir bilgi yoktur. Avları başlıca küçük kemirgenler olmak üzere, kertenkele ve küçük kuşlarla da beslenebilirler. Yavrularını canlı olarak doğurur. *Montivipera raddei* 2008 yılında IUCN Tehdit Altındaki Türlerin Kırmızı Listesi için değerlendirilmiş olup Tehdide Yakın (NT) olarak listelenmiştir (IUCN 2024b). Türün taksonomik gruplandırması aşağıdaki gibidir.

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Reptilia

Takım: Squamata

Aile: Viperidae

Alt aile: Viperinae

Cins: *Montivipera*

Tür: *Montivipera raddei* (Boettger,
1890)



Şekil 2.4. *Montivipera raddei* (Radde Dağ Engereği) (Fotoğraf: Naşit İĞCİ)

2.5 *M. wagneri* ve *M. raddei* Zehirleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

M. wagneri türünün zehri ile yapılmış çalışmalar çok kısıtlıdır. Göçmen ve ark. (2008)'in yapmış oldukları Türkiye'de bulunan colubrid, viperid ve elapid türlerine ait yılanların zehir proteinlerinin elektroforetik profillerini belirleyerek taksonların filogenileriyle ilişkisini değerlendirdikleri çalışmada, *M. wagneri* türüyle ilgili bilgilere de ulaşılabilmektedir. *M. wagneri*'nin (10 bant) diğer yedi viperid türüne ait (*Vipera kaznakovi*, *Macrovipera lebetinus*, *Vipera ammodytes*, *Vipera (renardi) eriwanensis*,

Vipera (berus) barani ve *Montivipera xanthina*; 12-14 bant) yılan zehirlerine kıyasla en az proteine sahip olduğu ve bu türler arasında niteliksel farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir.

Nalbantsoy ve ark. (2016), *M. wagneri* ham zehrinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren çalışmalarında, zehrin A549 (insan akciğer adenokarsinomu), HeLa (insan kolorektal adenokarsinomu), U87MG (insan glioblastoma astrositomu), PC-3 (insan prostat adenokarsinomu), Mpanc96 (insan pankreas adenokarsinomu) ve MCF-7 (insan meme adenokarsinomu) kanser hücrelerinde anti-proliferatif aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir.

M. wagneri ve *M. raddei* türlerine ait zehirler ile yapılmış bir başka çalışma zehirlerin güçlü antikoagülan etki gösterdiğini ve bu etkinin FXa'nın inhibe edilmesiyle gerçekleştiğini bildirmiştir (Chowdhury ve ark. 2021).

M. raddei zehrinin proteomik analizi Nalbantsoy ve ark. (2017) tarafından rapor edilmiştir ve çalışmalarının sonucunda PLA₂, VEGF-F, CRISP, serin proteaz (SVSP), metalloproteinaz tanımlanmıştır ancak LAAO tanımlanmamıştır. Bu çalışmada ayrıca *M. raddei* ham zehrinin ve fraksiyonlarının CaCo-2, MCF-7, U87MG, HeLa, MPanc-96, A549 ve PC3 kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisine de bakılmıştır. Kanser hücre hatlarının ham zehir ile 48 saat inkübasyonunun ardından hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre *M. raddei* ham zehrinin en yüksek sitotoksik aktiviteyi CaCo-2 hücre hattı üzerinde sergilediği, onu takiben U87MG hücre hattının etkilendiği rapor edilmiştir.

Sanz ve ark. (2008), *M. raddei* zehrinin proteomik karakterizasyon amacıyla fraksiyonlanmasını, SDS-PAGE ile ayrılmış protein bantlarından seçilen peptit iyonlarının kütle spektrometresi ve N-terminal sekanslaması ile protein tanımlamalarını gerçekleştirmişlerdir ve LAAO enziminin varlığını göstermişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucu *M. raddei* LAAO enzimi indirgenmiş ve indirgenmemiş SDS-PAGE jelinde yaklaşık 56 kDa ağırlığındaki banttan tanımlanmıştır.

Kurtovic ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada *M. raddei* zehrinin fare ve sıçanlarda letal ve hemorajik aktivitesini test ederek zehrin öldürücü toksisite ve güçlü hemorajik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Zagreb antiserumunun *M. raddei* üzerindeki etkisini ölçerek zehrin öldürücülüğünü güçlü bir şekilde ortadan kaldırdığını rapor etmişlerdir. Zagreb antiserumunun *M. raddei* zehrinin hemorajik aktivitesini nötralize etme potansiyeline sıçanlar üzerinde bakılan bu çalışmada *V. a. ammodytes* zehrine kıyasla daha düşük derecede de olsa nötralizasyon potansiyeli sergilediğini bildirmişlerdir. *In vitro* nötralizasyon deneylerinde ise *M. raddei* zehrinin azokazein üzerindeki proteolitik aktivitesinin Pefabloc (serin proteaz inhibitörü) ve Na₂EDTA (Zn²⁺ bağımlı metalloproteinaz inhibitörü) tarafından inhibe edici etkisi araştırılarak, Pefabloc molekülünün bir etkisinin olmadığı, Na₂EDTA molekülünün tek başına ya da Pefabloc ile birlikte azokazein üzerindeki aktivitenin tamamen inhibe edildiği bildirilmiştir. Bu bulgu sonucunda *M. raddei* zehrinin azokazeinolitik aktivitesinin metalloproteinazlar tarafından gerçekleşmiş olabileceğini rapor etmişlerdir (Kurtović ve ark. 2014).

M. raddei ile yapılmış olan bir diğer çalışmada ise (*in vitro*) K⁺ iyonları ortamında sıçanların beyin lipitlerinden elde edilen lipit çift katmanlı membranların (BLM) elektrik iletkenliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda *M. raddei* zehrinin önemli aktivite sergilediği ve membran-peptit etkileşimi sırasında yüzey aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacıların yapmış olduğu *in vivo* deneyler için *M. raddei* zehrinin kısa süreli kas içi enjeksiyonunun ardından sıçanların karaciğer, kalp, beyin ve kas dokularından elde edilen doğal lipit karışımlarının çözeltilerinden BLM'ler hazırlanmıştır. Zehrin organizmada bulunması, karaciğer ve kas lipitlerinden elde edilen BLM'lerin elektrik direncinin yaklaşık bir sıra ile artmasına yol açarken, beyin lipitlerinden elde edilen BML'lerde kontrole kıyasla önemli farklılıklar elde edilmediği bildirilmiştir (Ayvazyan ve ark. 2012).

3. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihaz ve Materyaller

Tez çalışmalarının gerçekleştirebilmesi için Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarından ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanımı için Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi imkanlarından faydalanılmıştır. Kullanılan cihazlar Tablo 3.1.'de verilmektedir.

Tablo 3.1. Kullanılan cihaz ve kolonlara ait bilgiler

Cihaz Adı	Markası	Kullanım Amacı
Spektrofotometre	PG Instruments	Deneylerde kullanılan örneklerin protein miktar tayini ve enzim aktivitesi tayini
HPLC	Agilent	Çalışma için kullanılan zehir örneği bileşenlerinin moleküler ağırlıklarına göre ayırımında
Koruyucu (Guard) kolon	TSK-Gel SW, Tosoh	Partiküllerin ana kolona girmesini önlemek ve sabit faza yüksek afinitesi olan kimyasal kirleticileri yakalamak, filtre görevi
Jel filtrasyon ayırma kolonu	TSK-Gel SW, Tosoh	Mobil faz içerisindeki bileşenlerin sabit faz üzerinde moleküler büyüklüklerine göre farklı zamanlarda çıkışı sağlayarak bileşenlerin birbirinden ayrılması
Elektroforez cihazı	Bio-Rad	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde örneklerin moleküler ağırlıklarına göre ayırımının gerçekleştirilmesi

Tablo 3.1 Devamı

-20°C/+4°C Buzdolabı	Arçelik	Deneylerde kullanılacak örnek, reaktif ve solüsyonların saklanması
-80°C Dondurucu	Thermo Scientific	Deneylerde kullanılan örneklerin saklanması
Hassas terazi	Bel Engineering	Deneylerde kullanılan kimyasalların tartımı
Manyetik karıştırıcı	Shin Saeng	Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması
pH metre	Hanna	Deneylerde kullanılan çözeltilerin pH değerinin ölçülmesi
Çalkalayıcı	Biosan	Jellerin yıkanması ve boyanması
Mini santrifüj cihazı	Fisherbrand	Deneyde kullanılan örneklerin filtrasyonu
Vorteks	Biosan	Deneyde kullanılan kimyasalların karıştırılması
Ultra saf su cihazı	MP Minipure	Çalışmalarda kullanılan saf su eldesi
Vakumlu filtre cihazı	Isolab	Çalışmalarda kullanılan su ve çözeltilerin filtre edilmesi

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar moleküler biyoloji çalışmaları için kullanıma uygundur ve Tablo 3.2.'de liste şeklinde verilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma
Bradford reaktifi	Sigma-Aldrich
BSA	Copricorn
Amonyum persülfat	Applichem
TEMED	BioFroxx
Akrilamit/Bisakrilamit (%40)	Bioshop
Trizma base	Sigma-Aldrich
Glisin	Isolab
Sodyum dodesil sülfat	Sigma-Aldrich
o-dianisidin dihidroklorür	Sigma-Aldrich
L-amino asit (L-lösin)	Sigma-Aldrich
Sodyum fosfat dibazik	Sigma-Aldrich
Sodyum fosfat monobazik	Sigma-Aldrich
Yaban turbu peroksidazı (HRP)	Sigma-Aldrich
DTT	Molekula
2-Propanol	Isolab
Metanol	Sigma-Aldrich
orto-Fosforik asit (%85)	Merck

3.3 Zehir Örneklerinin Çalışmalar İçin Hazırlanması

Çalışmada daha önce Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış bireylerden elde edilip dondurarak kurutma yöntemiyle toz haline getirildikten sonra soğukta saklanan örnekler

kullanılmıştır. Seçilmiş olan liyofilize ham zehir stokları birleştirilerek ultra saf su ile çözdürülüp, 0.45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra 20 mg/mL konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Zehirleri kullanılan *M. raddei* bireyleri Kağızman (Kars), *M. wagneri* bireyleri ise Karakurt (Kars) ve Malazgirt (Muş) illerinden toplanan ergin yılanlardan elde edilmiştir.

3.4 Protein Miktar Tayini

Bradford yöntemi ile zehir stoklarındaki proteinlerin miktar tayini yapılmıştır. 20 mg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltiler 1:20 oranında seyreltilmiştir. Sığır serum albümini (BSA) standart olarak 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Boya/örnek oranı 1:49 (v/v) olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.3. Bradford yönteminin uygulanmasında hazırlanan tüplerin içerikleri

	BSA Stokları (200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL)	Bradford Reaktifi	Saf su	Seyreltilmiş Zehir Stoğu
Blank	-	980 µL	20 µL	-
Standart	20 µL	980 µL	-	-
Örnek	-	980 µL	-	20 µL

Yukarıdaki tabloda (Tablo 3.3.) belirtilen değerlerde tüpler hazırlanmış, standart ve örneklerin Bradford reaktifi ile bağlanması için vorteks ile 1-2 saniye karıştırılıp ~20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. UV/VIS spektrofotometre cihazında 595 nm dalga boyunda optik yoğunluk (OD) değerli alınmıştır. Standart ve örnekler için üç teknik tekrar yapılmış olup değerlerin ortalamaları alınarak standart eğri grafiği oluşturulmuştur. Ayrıca zehir örneklerinin konsantrasyonları ve yüzdeleri (%) hesaplanmıştır.

3.5 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Zehir Proteinlerinin Fraksiyonlanması

Bu çalışmada 7.5 mm I.D x 7.5 cm çap ve uzunluğunda, 10 µm partikül büyüklüğüne sahip koruyucu kolon (TSKgel SW) ve TSKgel 7.5 mm I.D x 60 cm çap ve uzunluğunda, 10 µm partikül büyüklüğüne sahip jel filtrasyon ayırma kolonu (G2000SW) kullanılarak HPLC ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Fraksiyonlar el ile çıkış zamanlarına göre toplanmıştır.

Metot optimizasyonu yapılarak saflaştırmada kullanılacak tampon çözelti, akış hızı ve yüklenecek örnek miktarı belirlenmiştir (Tablo 3.4). Optimizasyonun ardından çalışmada 0.1 M fosfat tamponu (pH 6,8) kullanılmış olup izokratik olarak 0.5 mL/dk akış hızı uygulanmıştır. Ayırım 280 nm ve 215 nm dalga boylarında “diode array dedector” (DAD) ile takip edilmiştir.

Tablo 3.4. Metot optimizasyonunda kullanılan farklı tamponlar ve yükleme miktarları

Tampon	Akış Hızı (mL/dk)	Zehir Konsantrasyonu (mg/mL)	Yükleme Miktarı (µL)
0.1 M PB+0.1 M NaCl	0.5	10	10
0.1 M PB pH 6,8	0.5	10	10
0.1 M PB+0.1 M Na ₂ SO ₄	0.5	10	10
0.1 M PB+0.1 M NaCl	0.5	10	15
0.1 M PB+0.1 M Na ₂ SO ₄	0.7	10	10
0.1 M PB+0.05 M Na ₂ SO ₄	0.5	10	10

3.6 L-Amino Asit Oksidaz Enzim Aktivite Tayini

L-amino asit oksidaz aktivitesinin ölçülmesinde More ve ark. (2010) tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntem, bazı modifikasyonlar ile kullanılmıştır. LAO enzim aktivite tayininde zamana karşı enzimin substrat ile etkileşmesi esas alınmıştır.

LAAO enzimi kofaktör olan FAD'a bağlanarak substratı oksidatif deaminasyonu yoluyla (L-lösin) imino aside dönüştürürken bağlanmış olduğu FAD'ı FADH₂'ye indirger ve FADH₂ O₂ varlığında FAD'a yükseltgenirken H₂O₂ yan ürünü oluşturur. HRP H₂O₂ varlığında peroksidaz substratı olan *o*-dianisidin dihidroklorürü oksitleyerek sarı-turuncu renk oluşumuna neden olur.

Çalışma için kullanılmış olan kimyasallar 0.1 M fosfat tamponu (pH 6,8) ile çözdürülmüştür. 10 mg/mL *o*-dianisidin dihidroklorür, 10 mg/mL HRP ve 100 mM L-lösin hazırlanmıştır.

Bu çalışma için jel filtrasyon kromatografisi ile bileşenlerine ayrılan zehir örneklerinden birer saflaştırma seçilmiş olup her bir fraksiyonun ve karşılaştırmalı olarak ham zehirdeki enzim aktivitesine bakılmıştır. L-amino asit oksidaz enzim aktivite tayini için kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 3.5.'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. L-amino asit oksidaz enzim aktivite ölçümü için tüplerin hazırlanışı

Kimyasal	Örnek Tüpler	Ham Zehir	Negatif Kontrol	Blank
<i>o</i>-Dianisidin dihidroklorür	20 µL	20 µL	20 µL	-
L-amino asit (L-lösin)	100 µL	100 µL	100 µL	-
HRP	20 µL	20 µL	20 µL	-
Fraksiyonlar	860 µL	-	-	-
Ham Zehir	-	50 µL	-	-
0.1 M PB pH 6,8	-	810 µL	860 µL	800 µL
Saf Su	-	-	-	200 µL

Tüpler hazırlandıktan sonra 5 dk boyunca her dakikada ölçüm alınmıştır. Bunun sonucunda OD değerlerinin farkları alınarak enzimin dakikada gerçekleşen aktivitesi belirlenmiştir. Ortalama fark değerine göre, 0.01 OD artışı 1 birim (U) olarak karşılaştırma amacıyla hesaplanmıştır.

3.7 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

LAAO aktivitesi tespit edilen fraksiyon için yapılacak SDS-PAGE çalışmasından önce içerisindeki protein miktarının belirlenmesi için Bradford yöntemi uygulanmıştır. Standart olarak BSA 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Boya/örnek oranı 1:10 (v/v) belirlenip çalışma iki teknik tekrar olarak uygulanmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra spektrofotometre cihazında ölçümleri yapıp OD değerlerinin ortalamaları alınmıştır ve standart eğri grafiği oluşturulmuştur. Ardından fraksiyonlar 3 kDa cut-off değerine sahip mini ultrafiltrasyon tüplerine aktarılmış, 12.500 rpm'de santrifüj ile konsantre edilmiştir.

SDS-PAGE jel elektrofrez için %12'lik koşturma ve %4'lük yığma jeli hazırlanmıştır. Jellerin hazırlanışı Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. SDS-PAGE jellerinin hazırlanışı

Kimyasallar	%12'lik Koşturma Jeli	%4'lük Yığma Jeli
Deiyonize su	4.36 mL	3.15 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8,8	2.5 mL	-
0.5 M Tris-HCl pH 6,8	-	1.25 mL
%40'lık akrilamid/bis-akrilamid	3 mL	500 µL
%10 SDS	100 µL	50 µL
%10 APS	50 µL	25 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Jeller hazır hale geldikten sonra örnekler hazırlanmıştır. Protein miktar tayininden sonra örneklerden yüklenecek miktar belirlenmiş olup, karşılaştırma amacıyla indirgenmemiş ve indirgenmiş olarak hazırlanıp yüklendi. İndirgenmemiş örneklerde 4x yükleme boyası ve saf su bulunurken, indirgenmiş örneklerde ek olarak indirgeyici ajan 2 M Dithiothreitol (DTT) kullanılmıştır. LAAO enzim aktivitesi belirlenmiş fraksiyonlar ve ham zehirler karşılaştırmalı şekilde jele yüklenmiştir. Hazırlanan örneklerin boya ile bağlanması için 5 dk sıcak su banyosunda inkübe edilmiştir.

Proteinler jelde ~ 2 saat koşturulduktan sonra distile su ile 3 kez (her seferinde su dökülerek) 5'er dakika çalkalayıcıda 70 rpm'de yıkanmıştır. Ardından fiksatifin (%100'lük metanol, %85'lik orto-Fosforik asit, distile su) içinde 30 dakika çalkalayıcıda (70 rpm) bekletilmiştir. Fiksatif dökülüp jel Coomassie boya çözeltisinde (%0,12 (w/v) Coomassie G-250, %10 (w/v) amonyum sülfat, %10 (v/v) orto-Fosforik asit, %20 (v/v) metanol) 16 saat, çalkalayıcıda (70 rpm) bırakılarak boyama işlemi yapılmıştır. Gece boyu boya ile muamele edilen jel, 3 kez 10 'ar dakika yıkanmıştır. Daha sonra 1 saat x 3 kez olacak şekilde ve her seferinde su yenilenerek destain edilmiştir.



4. BÖLÜM

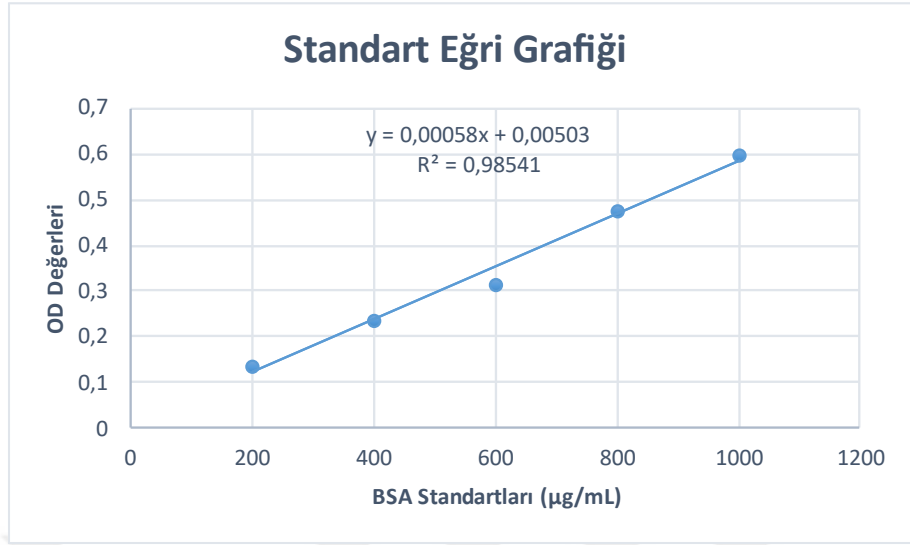
BULGULAR

4.1 Ham Zehirlerin Protein Miktar Tayinleri

Montivipera wagneri ve *M. raddei* türlerine ait ham zehirlerinin protein miktar tayininde Bradford yöntemi kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan BSA proteininin spektrofotometrik ölçüm ile alınan OD değerlerinin ortalamaları hesaplanarak (Tablo 4.1) standart eğri grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.1). Standart eğri grafiğindeki denklem ile ham zehirlerin protein konsantrasyonları (mg/mL) ve yüzdeleri (%) hesaplanmıştır (Tablo 4.2). Buna göre, HPLC saflaştırması için yükleme yapılacak protein miktarının belirlenmesini sağlayacak konsantrasyon değerleri elde edilmiş olup ham zehir kuru ağırlığına göre *M. wagneri*'nin %75,16'sının, *M. raddei*'nin ise %82,69'unun proteinden oluştuğu hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. BSA standartlarının OD değerleri ve ortalamaları

BSA konsantrasyonu (µg/mL)	OD			
	I.Tekrar	II. Tekrar	III. Tekrar	ORT
200	0,142	0,15	0,124	0,138
400	0,284	0,211	0,217	0,237
600	0,351	0,291	0,305	0,315
800	0,511	0,46	0,464	0,478
1000	0,607	0,606	0,586	0,599



Şekil 4.1. BSA dilüsyonları ile oluşturulan standart eğri grafiği

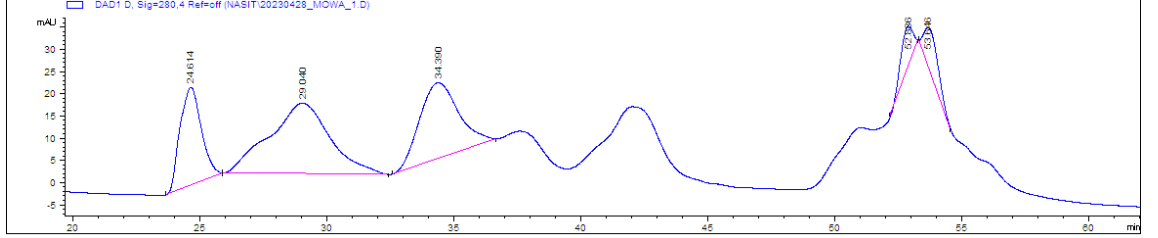
Tablo 4.2. *M. wagneri* ve *M. raddei* ham zehir OD değerleri ile hesaplanan konsantrasyon ve yüzde değerleri

Örnek	OD				Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Protein Yüzdesi (%)
	I.Tekrar	II. Tekrar	III.Tekrar	ORT		
<i>M. wagneri</i>	0,442	0,446	0,435	0,441	15,033	75,167
<i>M. raddei</i>	0,478	0,489	0,487	0,484	16,539	82,695

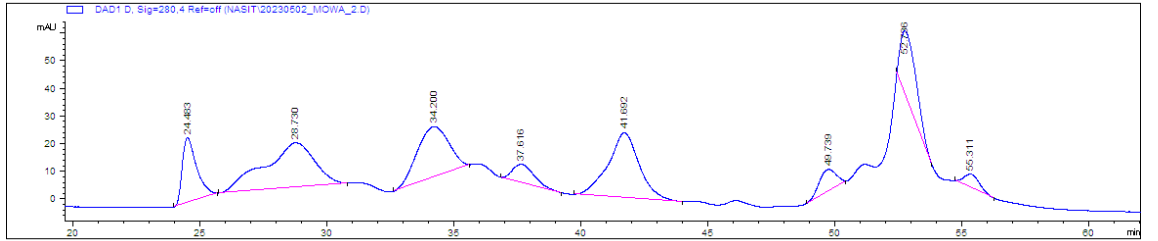
4.2 *M. wagneri* ve *M. raddei* Ham Zehirlerinin HPLC ile Fraksiyonlanması

M. wagneri ve *M. raddei* türlerine ait ham zehirlerin saflaştırılması yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle Materyal ve Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde farklı hareketli faz tamponları, akış hızı ve yükleme miktarları ile metot optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına ait kromatogramlar Şekil 4.2-4.7 arasında verilmiştir. Optimizasyon çalışmasında 0.1 (soydum) fosfat tamponu (PB) hareketli fazda baz olarak

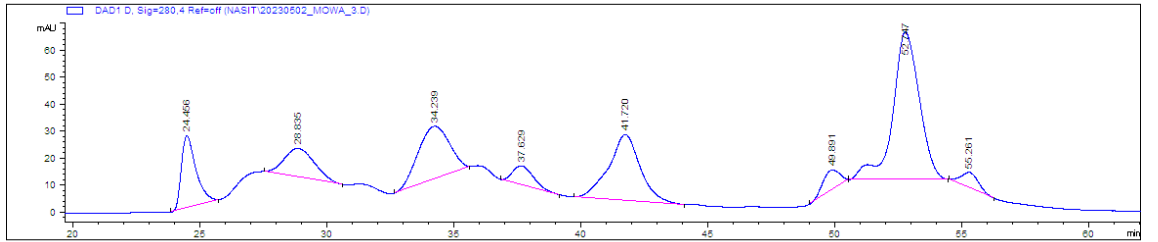
kullanılmış olup, sodyum klorür ve sodyum sülfat eklemeleri yapılmıştır. Sonuçlara göre tuz eklemesinin sonuçları iyi yönde etkilemediği görülmüştür. Ayrıca 0.5 mL/dk akış hızı 0.7 mL/dk hızına göre daha iyi sonuç vermiştir.



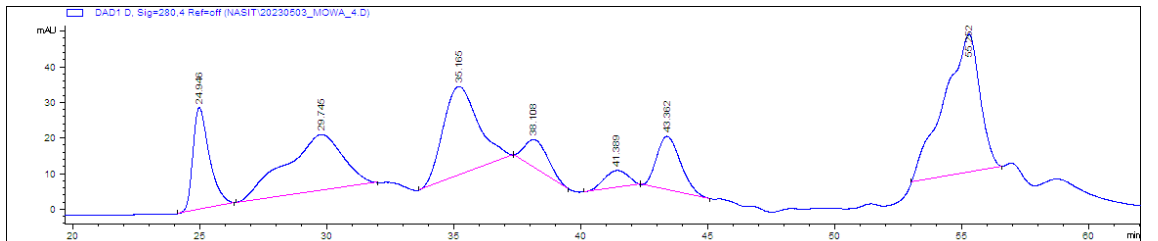
Şekil 4.2. Deneme-1 0.1M PB + 0.1 M NaCl, 0.5 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon



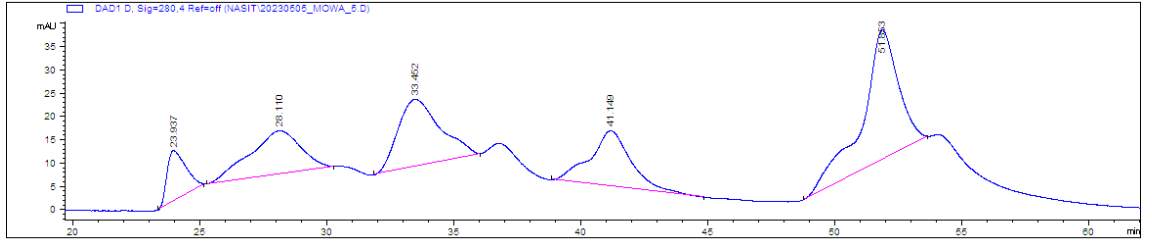
Şekil 4.3. Deneme-2 0.1M PB, 0.5 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon



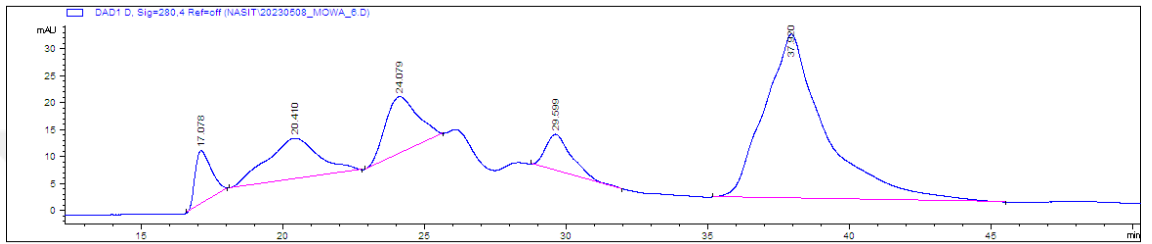
Şekil 4.4. Deneme-3 0.1M PB + 0.1 M Na₂SO₄, 0.5 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon



Şekil 4.5. Deneme-4 0.1M PB + 0.1M NaCl, 0.5 mL/dk akış hızı, 15 µL enjeksiyon

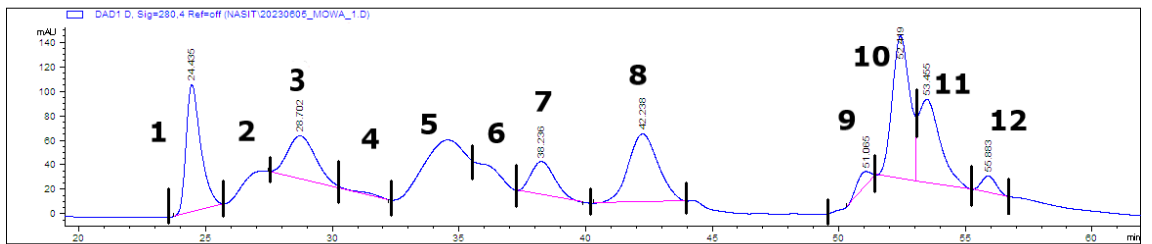


Şekil 4.6. Deneme-5 0.1M PB + 0.1 M Na₂SO₄, 0.7 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon

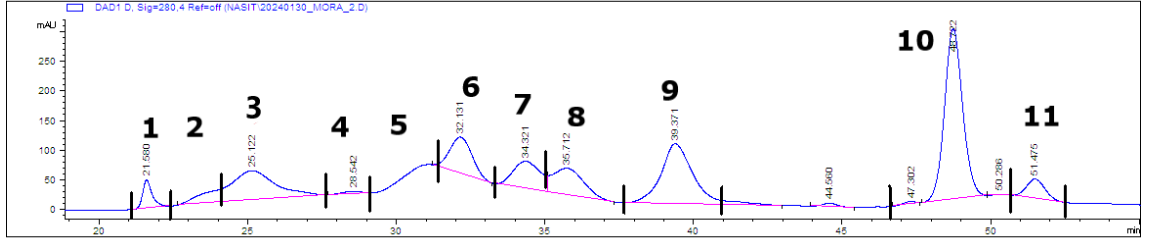


Şekil 4.7. Deneme-6 0.1M PB + 0.05M Na₂SO₄, 0.5 mL/dk akış hızı, 10 µL enjeksiyon

Optimizasyonun ardından yapılan çalışmada 0.1 M fosfat tamponu kullanılmasına karar verilmiş olup 0.5 mL/dk akış hızı uygulanmıştır. Çalışma boyunca 10 mg/mL veya 20 mg/mL stok zehirler kullanılarak 10-20 µL arası yükleme yapılmıştır. Fraksiyonlama için pikler Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'da gösterildiği gibi numaralandırılıp tüplere ayrılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.8. *M. wagneri* ham zehrinin fraksiyonlanmasına ait 280 nm dalga boyunda elde edilmiş kromatogram görüntüsü

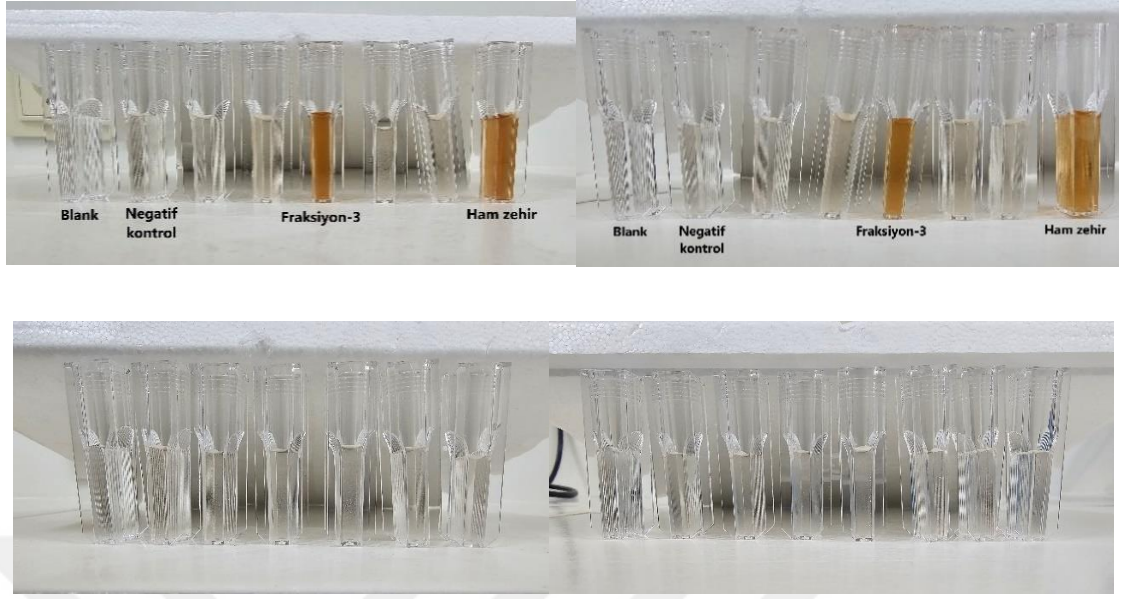


Şekil 4.9. *M. raddei* ham zehrinin fraksiyonlanmasına ait 280 nm dalga boyunda elde edilmiş kromatogram görüntüsü

Her iki türün zehrinde bulunan proteinler jel filtrasyon kolonu ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır. Alınan sonuçlara göre *M. wagneri* zehrinde 12, *M. raddei*'de ise 11 fraksiyon belirlenmiştir. Genel profil benzemekle birlikte, bazı kalitatif ve kantitatif farklılıklar da görülmektedir. Özellikle 50. dakika sonrasında görülen düşük moleküler ağırlıklı proteinlerde *M. wagneri*'de daha fazla pik vermiştir.

4.3 Fraksiyonların L-Amino Asit Oksidaz Aktivite Tayini

LAAO aktivite tayininde spektrofotometrik ölçüm metodu kullanılmıştır. Aktivite tayini için hazırlanan küvetler (Şekil 4.10) cihaza yerleştirilip 436 nm dalga boyunda ölçülmüş olup 0. dakikadan 5. dakikaya kadar her dakika başında alınan OD değerleri ile tablo oluşturulmuştur. Bu değerler negatif kontrolden çıkartılmıştır. Ardından enzimin aktivitesinin hesaplanması için değerler birbirinden çıkartılıp ortalamaları alınmıştır. Elde edilen veriler dakikada 0.01 OD artışına sebep olan aktivitenin 1 birim olarak ifade edilmesiyle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.10. LAAO enzim aktivitesi tayini. (Solda ve altta) *M. wagneri* fraksiyonlara ait küvetler; (sağda ve altta) *M. raddei* fraksiyonlarına ait küvetler

Enzim aktivitesi ölçülürken küvetlere HRP'nin eklenmesiyle her iki türe ait 3. fraksiyonların bulunduğu küvetlerde renk değişimi ham zehirlerin bulunduğu küvetlerle doğru orantılı olarak hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.10). Spektrofotometreden alınan OD değerleriyle yapılan hesaplamalar doğrultusunda 3. fraksiyonların dışındaki fraksiyonların aktiviteleri eksi (-) veya çok düşük değerde olup 3. fraksiyonlarda aktivite yüksek çıkmıştır ve bu veriler LAAO enzimine sahip olduğunu kanıtlamıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Fraksiyonların enzim aktiviteleri

<i>M. wagneri</i>	Ünite	<i>M. raddei</i>	Ünite
Fr-1	-	Fr-1	-
Fr-2	-	Fr-2	-
Fr-3	6,5	Fr-3	8,3
Fr-5	-	Fr-4	-
Fr-6	-	Fr-5	-
Ham zehir	20,9	Ham zehir	8,7
Fr-7	-	Fr-6	-

Tablo 4.3. Devamı

Fr-8	-	Fr-7	-
Fr-10	-	Fr-8	-
Fr-11	-	Fr-9	-
Fr-12	-	Fr-10	-

Aktivitenin karşılaştırılması için dakikada 0.01 OD değişimi 1 birim olarak tanımlanmıştır. *M. wagneri* ham zehri ilk 2 dakika içinde çok fazla aktivite gösterdiği ve OD değeri 1'i geçtiği için bu zaman dilimlerine göre hesaplanmıştır.

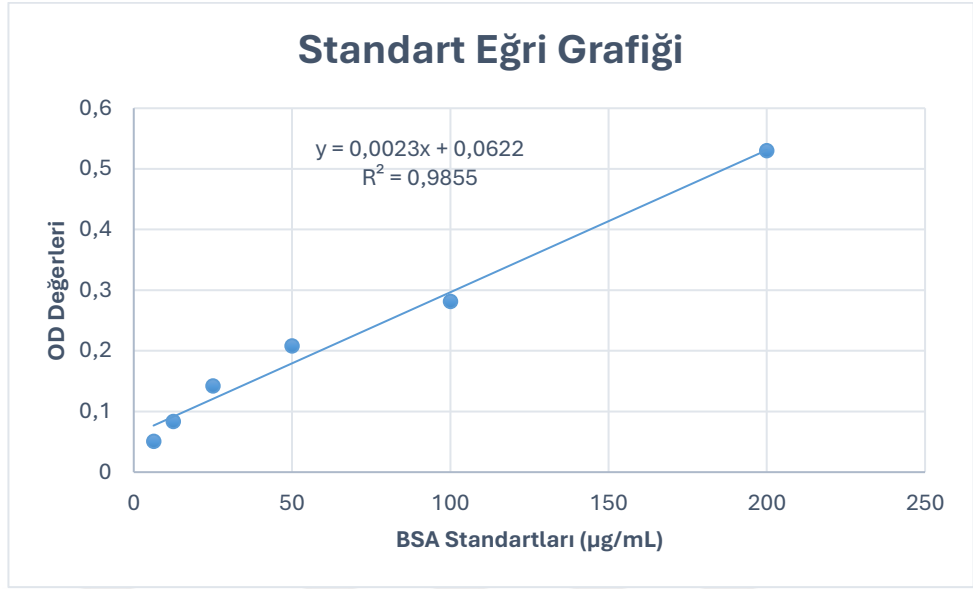
4.4 SDS-PAGE Bulguları

4.4.1 SDS-PAGE için fraksiyonlarda protein miktar tayini

Bu çalışma için LAAO aktivitesi belirlenmiş fraksiyonların protein miktar tayini Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Standart olarak BSA'nın farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Spektrofotometre cihazında 595 nm dalga boyunda ölçüm alınıp değerlerin ortalamaları ile tablo oluşturulmuştur (Tablo 4.4). Tablodaki verilerle bir standart eğri grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.11.) ve fraksiyonların protein konsantrasyonları grafikten elde edilen denklem ile hesaplanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.4. Aktif fraksiyonların protein miktar tayininde kullanılan BSA standartlarına ait OD değerleri

BSA Konsantrasyonları (µg/mL)	I. Tekrar	II. Tekrar	ORT
200	0,511	0,549	0,530
100	0,260	0,303	0,281
50	0,202	0,214	0,208
25	0,144	0,140	0,142
12,5	0,080	0,087	0,083
6,25	0,054	0,048	0,051



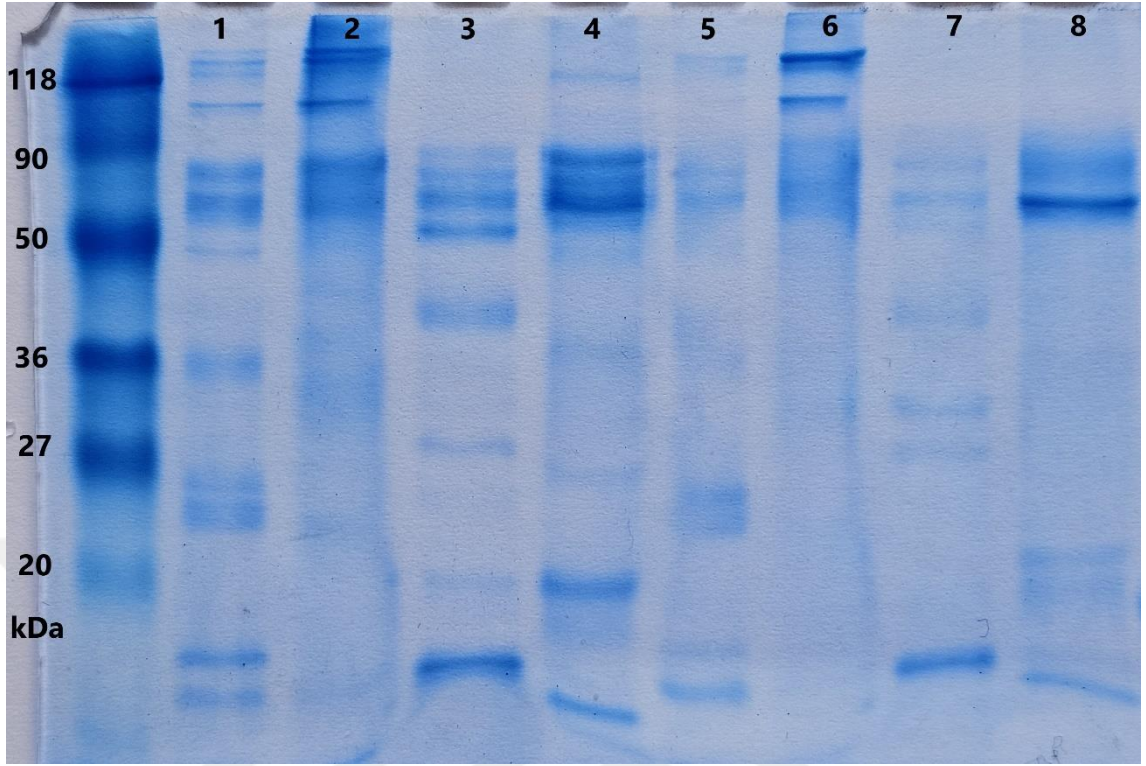
Şekil 4.11. Aktif fraksiyonların protein miktar tayininde kullanılan BSA standartlarına ait kalibrasyon grafiği

Tablo 4.5. Fraksiyonların protein miktar tayini sonuçları

Örnek	OD			Konsantrasyon (µg/ml)
	I. Tekrar	II. Tekrar	ORT	
Mowa Fr-3	0,139	0,129	0,134	31,217
Mora Fr-3	0,278	0,326	0,302	104,260

4.4.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE yöntemi ile LAAO aktivitesi belirlenmiş fraksiyonlardaki (3 numaralı fraksiyonlar) proteinler ayrılarak moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak belirlenmiştir. Karşılaştırma amacıyla ham zehirler de kullanılmıştır. SDS-PAGE jelinin görüntüsü Şekil 4.12.'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Ham zehir ve fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü. Marker (en solda), (1) *M. wagneri* ham zehri indirgenmemiş, (2) *M. wagneri* fr-3 indirgenmemiş, (3) *M. wagneri* ham zehri indirgenmiş, (4) *M. wagneri* fr-3 indirgenmiş, (5) *M. raddei* ham zehri indirgenmemiş, (6) *M. raddei* fr-3 indirgenmemiş, (7) *M. raddei* ham zehri indirgenmiş, (8) *M. raddei* fr-3 indirgenmiş

Sonuçlara bakıldığında, *M. wagneri*'ye ait fraksiyon 3'ün doğal (indirgenmemiş) halde 5 protein bandı, *M. raddei*'nin ise benzer şekilde 5 protein bandı oluşturduğu görülmüştür (50-90 kDa arasındaki bantlar biraz daha belirsizdir) (Tablo 4.6). Her iki türün fraksiyonunda da 90-118 kDa arasındaki bant ve 118 kDa üzerindeki iki protein bandı DTT eklenmesiyle elde edilen indirgenmiş örneklerde kaybolmuştur (Tablo 4.7). Benzer durum ham zehirlerde de görülmektedir. İndirgenmiş fraksiyonlarda *M. wagneri* ve *M. raddei* için sırasıyla 9 ve 6 bant görülmüştür.

Tablo 4.6. SDS-PAGE jel görüntüsüne göre 2. ve 6. kuyucuklara (indirgenmemiş fraksiyonlara) ait bantların yaklaşık moleküler ağırlıkları

Bant No.	Mowa İndirgenmemiş	Mora İndirgenmemiş
1	>118 kDa	>118 kDa
2	>118 kDa	>118 kDa
3	118-90 kDa	118-90 kDa
4	90-50kDa	90-50kDa
5	90-50 kDa	90-50kDa

Tablo 4.7. SDS-PAGE jel görüntüsüne göre 4. ve 8. kuyucuklara (indirgenmiş fraksiyonlara) ait bantların yaklaşık moleküler ağırlıkları

Bant No.	Mowa İndirgenmiş	Mora İndirgenmiş
1	~118 kDa	90-50 kDa
2	90-50 kDa	90-50 kDa
3	90-50 kDa	27-20 kDa
4	90-50 kDa	~20 kDa
5	90-50 kDa	<20kDa
6	~36 kDa	<20kDa
7	27-20 kDa	-
8	~20 kDa	-
9	<20kDa	-

5. BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Türkiye’de bulunan *Montivipera wagneri* ve *Montivipera raddei* engerek türlerine ait zehirlerin jel filtrasyon kromatografisi ile kısmi saflaştırması yapılmış olup LAAO enzimini içeren fraksiyon, 3 numaralı fraksiyon olarak belirlenmiştir. Şekil 4.10’da görüldüğü gibi 3. fraksiyon dışında diğer fraksiyonların hiçbirinde belirgin renk değişimi gözlemlenmemiş olup spektrofotometrede 436 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonrasında elde edilen OD değerleri de diğer fraksiyonların enzim aktivitesine sahip olmadığını doğrulamıştır. Bu veriler sonrasında yapılan *M. wagneri* ve *M. raddei* 3. fraksiyonlarına ait SDS-PAGE çalışmasının sonuçlarına bakıldığında *M. wagneri* ve *M. raddei*’nin doğal (indirgenmemiş) halde birbirlerine benzer moleküler ağırlıklarda 5 protein bandı içermesi, 90-118 kDa arasındaki bir bant ve 118 kDa üzerindeki iki protein bandın indirgenmiş örneklerde kaybolması fraksiyonda bulunan proteinler hakkında fikir vermektedir. Bu sonuçlar aktif (LAAO içeren) fraksiyonlarda multimerik yapılu proteinler olduğunu göstermektedir. Ancak indirgenmemiş fraksiyonlarda bulunan birden fazla bant, jel filtrasyon kromatografisi ile yapılan ayrıştırmada fraksiyonda birden fazla protein bulunduğuna dolayısıyla LAAO enziminin tek basamakta tam olarak saf elde edilmediğine işaret etmektedir. Jel filtrasyon kromatografisi yılan zehirlerinden proteinlerin saflaştırılması için genellikle ilk basamak olarak kullanılmakta olup, çoğunlukla ek kromatografi basamakları tam saflaştırma için gerekli olmaktadır. Nitekim Tonismagi ve ark. (2006) da *Macrovipera lebetinus* zehrinden LAAO enziminin saflaştırması çalışmasında zehrin sahip olduğu proteazların jel filtrasyon fraksiyonunda LAAO ile etkileşime girebileceğini ve LAAO enzimleri ile aynı moleküler ağırlığa ve izoelektrik noktaya sahip olabilecek proteaz enzimleri olabileceğini belirtmiştir. Buradan yola çıkarak *M. wagneri* ve *M. raddei* 3 numaralı fraksiyonlarında Şekil 4.12’de görülen yüksek moleküler ağırlıktaki bantların proteaz enzimlerine ait olabileceği düşünülmüştür.

SvLAAO’lar genel olarak 110-150 kDa moleküler ağırlığa sahip homodimerik yapıda olan enzimlerdir (More ve ark. 2010). *M. wagneri* zehrinin saflaştırılıp LAAO enzimi tanımlaması veya genel proteomik karakterizasyonu daha önce yapılmamıştır. Ancak

yakın türler ile yapılmış çalışmalara bakarak bilgi edinilebilir. *M. raddei* zehri için de LAAO saflaştırmaya ve aktivitesini belirlemeye yönelik bir çalışma bulunmamakla birlikte literatürdeki bilgilere bakıldığında zaman Sanz ve ark. (2008) *M. raddei* zehrinde kısmi sekanslama tabanlı venomik yaklaşımı ile tanımladıkları LAAO enziminin SDS-PAGE ile indüklenmiş ve indüklenmemiş koşullar altında 56 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı cinse ait *Montivipera bulgardaghica* zehrinden de benzer yaklaşımla LAAO enzimi 109 kDa olarak tanımlanmıştır (Nalbantsoy ve ark. 2017). Jafari ve ark. (2023) *M. raddei* zehrinin kısmi saflaştırmasını yaparak SDS-PAGE ve 2D-PAGE çalışmaları ile LAAO enziminin monomerik formunun 58 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise her iki türün zehrinde de indirgenmemiş durumda Tablo 4.6.'da belirtilen moleküler ağırlıklarda bantlar gözükmemektedir. Literatürde şimdiye kadar saflaştırılmış svLAAO'lara ait bulgular incelendiğinde (Tablo 2.1.), bu çalışmada görülen yaklaşık 118-90 kDa aralığındaki bantların dimerik LAAO'lardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Fraksiyonlarda DTT ile indirgendikten sonra 55-60 kDa civarında bir bantın yoğun olarak görülmesi de bu bulguyu desteklemektedir. Ancak Sanz ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada LAAO enziminin *M. raddei* zehrinden hem indirgenmiş hem de indirgenmemiş örneklerde yaklaşık 56 kDa moleküler ağırlığa sahip banttan tanımlanmış olması, bu zehirde monomerik bir LAAO bulunabileceğine de işaret etmektedir. Nitekim genel olarak svLAAO'lar homodimerik yapıda olsa da bazı türlerde monomerik yapılı enzimler bulunabileceği de rapor edilmiştir (Jin ve ark. 2007; Wei ve ark. 2009; Rey-Suárez ve ark. 2018). Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, enzimin kesin olarak karakterize edilebilmesi için tam olarak saflaştırılması ve ondan sonra SDS-PAGE ve kütle spektrometresi gibi yöntemlerle moleküler ağırlığı ve multimerik yapısının kesin olarak ortaya koyulması gerekmektedir.

Literatür özetleri kısmında verilen Tablo 2.1.'de de görüldüğü gibi yılan zehirlerinin diğer bileşenlerinde olduğu üzere LAAO enzimleri de türden türe yapısal ve enzimatik olarak değişiklik göstermektedir. Ayrıca yılan zehirleri yaşa, cinse, avlandığı canlılara göre de değişiklik gösterebilmektedir (Bocian ve Hus 2020). Tez kapsamında ise ham zehirle yapılan çalışmaya bakıldığında *M. wagneri*'nin LAAO aktivitesi *M. raddei*'ye göre daha fazla çıkmıştır. Bu iki tür her ne kadar aynı cinse ait olsa da filogenetik olarak ayrı kladlar oluşturan iki farklı tür grubunun üyeleri olarak değerlendirilmektedir (Stümpel ve ark. 2016). Bu anlamda enzim aktivitelerinde de farklılık görülmesi beklenebilir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında *M. wagneri* ve *M. raddei* zehirlerinden LAAO saflaştırılmasına odaklanan çalışmalar ilk kez gerçekleştirilmiştir. Özellikle endemik *M. wagneri* zehrinin protein içeriği ve biyoaktiviteleri hakkındaki bilgilerimiz çok kısıtlıdır. Bu çalışmada her iki türün zehrinden de LAAO içeren aktif jel filtrasyon fraksiyonu belirlenmiş ve saflaştırılmıştır. İlgili fraksiyon birden fazla protein içerdiğinden kısmi saflaştırma olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar, iyon değişim, ters faz gibi sonraki kromatografik basamaklar ile tekrar ayrıştırılarak LAAO enziminin tam olarak saflaştırılması gelecek çalışmalar ile mümkün olabilecektir. Bu sayede enzimin tam karakterizasyonu yapıp biyolojik aktiviteleri belirlenerek zehirlenme patogenezindeki rolü ve biyoteknolojik açıdan kullanımı değerlendirilebilecektir.

KAYNAKLAR

Averin AS, Utkin YN (2021) Cardiovascular Effects of Snake Toxins: Cardiotoxicity and Cardioprotection. *Acta Naturae*, 13:4-14.

Ayvazyan NM, Zaqaryan NA, Ghazaryan NA (2012) Molecular events associated with *Macrovipera lebetina obtusa* and *Montivipera raddei* venom intoxication and condition of biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1818:1359-1364.

Barbosa LG, Costa TR, Borges IP, Costa MS, Carneiro AC, Borges BC, Silva MJB, Amorim FG, Quinton L, Yoneyama KAG, de Melo Rodrigues V, Sampaio SV, Rodrigues RS (2021) A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjussuLAAO-II and BmoolLAAO-II isolated from Brazilian *Bothrops* snake venoms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167:267-278.

Bocian A, Hus KK (2020) Antibacterial properties of snake venom components. *Springer* 74:407-419.

Bordon KCF, Cologna CT, Fornari-Baldo EC, Pinheiro-Júnior EL, Cerni FA, Amorim FG, Anjolette FAP, Cordeiro FA, Wiezel GA, Cardoso IA, Ferreira IG, Oliveira IS, Boldrini-França J, Pucca MB, Baldo MA, Arantes EC (2020) From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology* 11:1132.

Chowdhury A, Zdenek CN, Lewin MR, Carter R, Jagar T, Ostanek E, Harjen H, Aldridge M, Soria R, Haw G, Fry BG (2021) Venom-Induced Blood Disturbances by Palearctic Viperid Snakes, and Their Relative Neutralization by Antivenoms and Enzyme-Inhibitors. *Front Immunol* 12:688802.

Ciscotto P, Machado de Avila RA, Coelho EAF, Oliveira J, Diniz CG, Farías LM, de Carvalho MAR, Maria WS, Sanchez EF, Borges A, Chávez-Olórtegui C (2009)

Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 53:330-341.

Costa TR, Menaldo DL, Zoccal KF, Burin SM, Aissa AF, Castro FAD, Faccioli LH, Greggi Antunes LM, Sampaio SV (2017) CR-LAAO, an L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* venom, as a potential tool for developing novel immunotherapeutic strategies against cancer. *Scientific Reports* 7:42673.

de Freitas V, Costa TR, Nogueira AR, Polloni L, Alves de Melo Fernandes T, Correia LIV, Borges BC, Teixeira SC, Silva MJB, Amorim FG, Quinton L, Saraiva AL, Espindola FS, Iwai LK, Rodrigues RS, Yoneyama KAG, de Melo Rodrigues Ávila V (2023) Biochemical characterization and assessment of leishmanicidal effects of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom (CollinLA AO-I). *Toxicon* 230:107156.

Göçmen B, Kumlutaş Y, Keskin NA (2008) Electrophoretic characterisation of the venom samples obtained from various Anatolian snakes (Serpentes: Colubridae, Viperidae, Elapidae). *Article in North-Western Journal of Zoology* 4:16-28

Guo C, Liu S, Yao Y, Zhang Q, Sun MZ (2012) Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon* 60:302-311.

IUCN (International Union for the Conservation) (2024a) of Nature “Wagner’s Viper” <https://www.iucnredlist.org/species/22998/9406944>.

IUCN (International Union for the Conservation) (2024b) “Armenian Viper” <https://www.iucnredlist.org/species/22993/9406370>.

Izidoro LFM, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, Da Silva SL, Zanchi FB, Zuliani JP, Fernandes CFC, Calderon LA, Stábeli RG, Soares AM (2014) Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed Research International* 2014:196754.

Jafari Z, Bandehpour M, Kaboli M, Kazemi B (2023) Partial proteomics of *Montivipera raddei* venom. *Trends Pept. Protein Sci* 8:1-5.

Jin Y, Lee WH, Zeng L, Zhang Y (2007) Molecular characterization of L-amino acid oxidase from king cobra venom. *Toxicon* 50:479-489.

Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:3030-3041.

Kurtović T, Lang Balija M, Ayvazyan N, Halassy B (2014) Paraspecificity of *Vipera a. ammodytes*-specific antivenom towards *Montivipera raddei* and *Macrovipera lebetina obtusa* venoms. *Toxicon* 78:103-112.

Lazarovici P, Marcinkiewicz C, Lelkes PI (2019) From snake venom's disintegrins and C-type lectins to anti-platelet drugs. *Toxins* 11:303.

Li Lee M, Chung I, Yee Fung S, Kanthimathi MS, Hong Tan N (2014) Antiproliferative Activity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom L-Amino Acid Oxidase. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 114:336-343.

Mcgovern JG (2007) Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 3:69-85.

Mebert K, Göçmen B, İğci N, Karış M, Oğuz MA, Yıldız MZ, Teynie A, Stümpel N, Ursenbacher S (2020) Mountain Vipers in Central-eastern turkey: Huge range extensions for four taxa reshape decades of misleading perspectives. *Herpetological Conservation and Biology* 15:169-187.

More SS, Kiran KM, Veena SM, Gadag JR (2010) Purification of an L-amino acid oxidase from *Bungarus caeruleus* (Indian krait) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16:60-76.

Mukherjee AK, Saviola AJ, Burns PD, Mackessy SP (2015) Apoptosis induction in human breast cancer (MCF-7) cells by a novel venom L-amino acid oxidase (Rusvinoxidase) is independent of its enzymatic activity and is accompanied by caspase-7 activation and reactive oxygen species production. *Apoptosis* 20:1358-1372.

Nalbantsoy A, Hempel BF, Petras D, Heiss P, Göçmen B, İğci N, Yıldız MZ, Süßmuth RD (2017) Combined venom profiling and cytotoxicity screening of the

Radde's mountain viper (*Montivipera raddei*) and Mount Bulgar Viper (*Montivipera bulgardaghica*) with potent cytotoxicity against human A549 lung carcinoma cells. *Toxicon*, 135:71-83.

Nalbantsoy A, İğci N, Göçmen B, Mebert K (2016) Cytotoxic potential of Wagner's Viper, *Montivipera wagneri*, venom. *North-Western Journal of Zoology* 12: 286-291.

Oliveira AL, Viegas MF, da Silva SL, Soares AM, Ramos MJ, Fernandes PA (2022) The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nat Rev Chem* 6:451-469.

Ponnudurai G, Chung MCM, Tan NH (1994) Purification and Properties of the L-Amino Acid Oxidase from Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*) Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 313:373-378.

Rey-Suárez P, Acosta C, Torres U, Saldarriaga-Córdoba M, Lomonte B, Núñez V (2018) MipLAAO, a new L-amino acid oxidase from the redtail coral snake *Micrurus mipartitus*. *PeerJ* 6:e4924.

Rodrigues RS, da Silva JF, Boldrini França J, Fonseca FPP, Otaviano AR, Henrique Silva F, Hamaguchi A, Magro AJ, Braz ASK, dos Santos JI, Homs-Brandeburgo MI, Fontes MRM, Fuly AL, Soares AM, Rodrigues VM (2009) Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie* 91:490-501.

Samel M, Vija H, Rönnholm G, Siigur J, Kalkkinen N, Siigur E (2006) Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochimica et Biophysica Acta- Proteins and Proteomics* 1764:707-714.

Sant'Ana CD, Menaldo DL, Costa TR, Godoy H, Muller VDM, Aquino VH, Albuquerque S, Sampaio SV, Monteiro MC, Stábeli RG, Soares AM (2008) RETRACTED: Antiviral and antiparasite properties of an L-amino acid oxidase from the Snake *Bothrops jararaca*: Cloning and identification of a complete cDNA sequence. *Biochemical Pharmacology* 76:279-288.

Sanz L, Ayvazyan N, Calvete JJ (2008) Snake venomomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei*. *Journal of Proteomics* 71:198-209.

Soares TG, Santos JLD, Alvarenga VG, Santos JSC, Leclercq SY, Faria CD, Oliveira MAA, Bemquerer MP, Sanchez EOF, de Lima ME, Figueiredo SG, Borges MH (2020) Biochemical and functional properties of a new L-amino acid oxidase (LAAO) from *Micrurus lemniscatus* snake venom. *International Journal of Biological Macromolecules* 154:1517-1527.

Stábeli RG, Marcussi S, Carlos GB, Pietro RCLR, Selistre-De-Araújo HS, Giglio JR, Oliveira EB, Soares AM (2004) Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12:2881-2886.

Stábeli RG, Sant'Ana CD, Ribeiro PH, Costa TR, Tícli FK, Pires MG, Nomizo A, Albuquerque S, Malta-Neto NR, Marins M, Sampaio SV, Soares AM (2007) Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 41:132-140.

Stümpel N, Rajabizadeh M, Avci A, Wüster W, Joger U (2016) Phylogeny and diversification of mountain vipers (*Montivipera*, Nilson et al., 2001) triggered by multiple Plio-Pleistocene refugia and high-mountain topography in the Near and Middle East. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 101:336-351.

Tan KK, Bay BH, Gopalakrishnakone P (2018) L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. *Toxicon* 144:7-13.

Tavares C, Maciel T, Burin S, Ambrósio L, Ghisla S, Sampaio S, Castro F (2016) L-Amino acid oxidase isolated from *Calloselasma rhodostoma* snake venom induces cytotoxicity and apoptosis in JAK2V617F-positive cell lines. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 38:128-134.

Tonin G, Klen J (2023) Eptifibatide, an Older Therapeutic Peptide with New Indications: From Clinical Pharmacology to Everyday Clinical Practice. *International Journal of Molecular Sciences* 24:5446.

Tõnismägi K, Samel M, Trummal K, Rönholm G, Siigur J, Kalkkinen N, Siigur E (2006) L-Amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: Isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. *Toxicon* 48:227-237.

Toyama MH, Toyama DDO, Passero LFD, Laurenti MD, Corbett CE, Tomokane TY, Fonseca FV, Antunes E, Joazeiro PP, Beriam LOS, Martins MAC, Monteiro HSA, Fonteles MC (2006) Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 47:47-57.

Ullah A (2020) Structure–Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. *Frontiers in Pharmacology* 11:110.

Wei JF, Yang HW, Wei XL, Qiao LY, Wang WY, He SH (2009) Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. *Toxicon* 54:262-271.

WHO (World Health Organization) (2024) “Snakebite Envenoming” <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>.

Xiong Y, He Q, Yu X, Li B, Song Z (2022) The anti-ovarian carcinoma activity of L-amino acid oxidase from *Crotalus adamanteus* venom in vivo and in vitro. *Medical Oncology* 39:112.

Zhang L, Wu WT, Zhangyz L (2008) Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. *Natural Product Research* 22:554-563.

Zhang YJ, Wang JH, Lee WH, Wang Q, Liu H, Zheng YT, Zhang Y (2003) Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309:598-604.