



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Androctonus crassicauda* ve *Leiurus abdullahbayrami* AKREP
ZEHİRLERİ PEPTİTLERİNİN BAZI HASTANE ENFEKSİYON
ETKENLERİ ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN
İN VİTRO VE İN VİVO ARAŞTIRILMASI**

(Doktora Tezi)

Burak OSKAY

Danışman

Doç. Dr. Kazım ŞAHİN

II. Danışman

Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

RİZE

2024

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında, Doç. Dr. Kazım ŞAHİN danışmanlığında Burak OSKAY tarafından hazırlanan *Androctonus crassicauda* ve *Leiurus abdullahbayrami* Akrep Zehirleri Peptitlerinin Bazı Hastane Enfeksiyon Etkenleri Üzerindeki Antimikrobiyal Etkilerinin *İn vitro* ve *İn Vivo* Araştırılması adlı bu tez çalışması, 23/10/2024 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Juri Üyeleri	Ünvanı, Adı SOYADI	İmza
Başkan	: Doç. Dr. Kazım ŞAHİN	
Üye	: Prof. Dr. Zihni Açar YAZICI	
Üye	: Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE	
Üye	: Prof. Dr. Levent TÜMKAYA	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Bülent DABANLIOĞLU	

ETİK BEYAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “*Androctonus crassicauda* ve *Leiurus abdullahbayrami* Akrep Zehirleri Peptitlerinin Bazı Hastane Enfeksiyon Etkenleri Üzerindeki Antimikrobiyal Etkilerinin İn vitro ve İn Vivo Araştırılması” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

23/10/2024

Burak OSKAY

ÖN SÖZ

Bu çalışma 15. yy filozoflarından Paracelsus' un bir sözü olan “Her şeyde zehir vardır, zehirsiz hiçbir şey yoktur. Bir zehrin zehir olup olmaması dozuna bağlıdır.” Sözünden yola çıkarak günümüzde kontrol edilemeyen nozokomiyal enfeksiyonlara karşı akrep venomlarında bulunan AMP' ler aracılığıyla mücadeleye katkı sağlamak amacıyla projelendirilmiştir.

Bu çalışmanın bu noktaya gelinceye kadar emeği geçen, bana yol gösteren ve tecrübelerini her daim paylaşan özellikle danışmanım Doç. Dr. Kazım ŞAHİN ve II. Danışmanım Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN hocalarıma, kapısı sürekli bize açık olan Ana Bilim Başkanımız Prof. Dr. Zihni Açar YAZICI' ya, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ ve Dr. Öğr. Üyesi İlkey BAHÇECİ' ye, her zaman yanımda olan Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE hocama ve tez çalışmamda her zaman fikirlerini ve deneyimlerinden istifade ettiğim Doç. Dr. Atilla TOPÇU ve Prof. Dr. Levent TÜMKAYA' ya ve araştırmamda emeği ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Arş. Gör. Sena ŞAHİN AKTURA' ya teşekkür ederim.

Ayrıca bu eğitim yolculuğumda her daim yanımda olan eşim Kübra OSKAY' a ve ayrıca manevi olarak desteklerini sürekli hissettiğim annem Sevim OSKAY ile babam Yusuf İzzettin OSKAY' a ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

“Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimince desteklenmiştir. Proje numarası: TDK-2022-1380” (“This work was supported by the Research Fund of Recep Tayyip Erdogan University, Project Number: TDK-2022-1380”).

Burak OSKAY
RİZE/2024

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
KISALTMALAR	IX
TABLolar LİSTESİ	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	4
1.1. Akrepler.....	4
1.1.1. Akreplerin Morfolojik Özellikleri	6
1.1.2. Türkiye ve Dünyadaki Akrep Türleri	7
1.1.2.1. <i>Androctonus crassicauda</i>	9
1.1.2.2. <i>Leiurus abdullahbayramii</i>	11
1.1.3. Akrep ve Diğer Hayvan Zehirlerinin Tedavi Amacıyla Kullanım Tarihçesi	13
1.1.4. Akrep ve Diğer Hayvan Zehirlerinden Elde Edilen Terapotiklerin Günümüzdeki Kullanımı	14
1.1.5. Akrep Venomunun Kimyasal Yapısı.....	22
1.2. Antimikrobiyal Peptitler (AMP)	23
1.3. Nanopartiküler ve Yapıları	25
1.3.1. Kitosan Nanopartikül	26
1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	28
1.5. Nozokomiyal Enfeksiyonlar Hakkında Genel Bilgiler	30
1.6. Nozokomiyal Enfeksiyonlarının Prevalansı.....	32
1.7. Nozokomiyal Enfeksiyonlara En Sık Neden Olan Bakteriler (ESCAPE Bakteriler)	35
1.7.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35

1.7.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
1.7.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>	39
1.7.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	42
2. GEREÇ VE YÖNTEM	47
2.1. Gereçler	47
2.1.1. Besiyerleri ve Ayraçlar	48
2.1.2. Kullanılan Kitler	48
2.1.3. Bakterilerin Toplanması	48
2.1.4. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmesi	49
2.1.5 Akrelerin Bakım ve Beslenmesi	50
2.1.6 Akrelerden Venom Toplanması	51
2.1.7. Kitosan Sentezi	51
2.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	52
2.2.1. Akrep Venomlarından Antimikrobiyal Peptitlerin Elde Edilmesi	52
2.2.2. Kitosan Enkapsülasyon Karakterizasyon Analizleri	52
2.2.2.1. Zeta Sizer	53
2.2.2.2. UV-NİS	53
2.2.2.3. TEM Analizi	53
2.2.2.4. FT-IR Analizi	53
2.2.3. Sitotoksosite Analizi	54
2.2.4. <i>in vitro</i> Analizler	55
2.2.4.1. Bakterilerin Hazırlanması	55
2.2.4.2. Venomların Hazırlanması	55
2.2.4.3. MIC Değerlerinin ve Dozajlamanın Hesaplanması	55
2.2.4.4. Fraksiyonun Kitosan ile Birleştirilmesi	56
2.2.5. <i>in vivo</i> Analizler	57
2.2.5.1. Rat Gruplarında Sepsis Oluşturulması	57
2.2.5.2. Biyolojik Maddelerden Dozaj Hesaplanması	57
2.2.5.3. Biyolojik Maddelerin Uygulanması	58
2.2.5.4. Kan, Doku ve Organ Örneklerinin Toplanması	58
2.2.6. Biyokimyasal Analizler	59
2.2.6.1. Homojenizasyon İşlemi	59

2.2.6.2. Oksidasyon Analizleri (GSH ve MDA)	60
2.2.6.3. Sitokin Analizleri	60
2.2.7. Histopatolojik Analizler	62
2.2.8. İstatiksel Analiz	64
3. BULGULAR.....	65
3.1. HPLC Fraksiyonları	65
3.1.1. İlk HPLC Fraksiyonlarının Değerlendirilmesi	65
3.1.2. <i>K.pneumoniae</i> suşunun antibiyotik direncinin belirlenmesi	68
3.1.3. MİK Verileri	69
3.1.4. İleri Safılaştırma	70
3.2. Nanopartikül Karakterizasyonları	72
3.2.1. Zeta Potansiyel	72
3.2.2. FT-IR	73
3.2.3. TEM.....	74
3.2.4. UV-NIS Spektrometre	75
3.3. Histolojik Analizler	75
3.4. Sitotoksik Analizler (HeLa Hücre Hattı)	87
3.5. Biyokimyasal Analizler	89
3.5.1. MDA ve GSH Analizleri	89
3.5.2. Sitokin Analizleri.....	90
3.5.2.1 TNF- α	90
3.5.2.2. IL-1 β	91
3.5.2.3. IL-6	91
3.5.2.4. IL-10	92
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	94
4.1. Tartışma.....	94
4.2. Sonuç ve Öneriler.....	101
KAYNAKÇA.....	102
EKLER.....	122

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Tez Türü : Doktora Tezi
Danışman : Doç. Dr. Kazım ŞAHİN
II. Danışman : Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN
Hazırlayan : Burak OSKAY
Yıl : 2024
Sayfa Sayısı : 123

ÖZET

***Androctonus crassicauda* ve *Leiurus abdullahbayrami* AKREP ZEHİRLERİ
PEPTİTLERİNİN BAZI HASTANE ENFEKSİYON ETKENLERİ
ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN İN VİTRO VE İN VİVO
ARAŞTIRILMASI**

Antibiyotiklere dirençli bakterilerin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlar önemli ekonomik ve insan sağlığı sorunlarına yol açmaktadır. Bu nedenle bilim adamları dirençli bakterilere karşı yeni arayışlara yönelmişlerdir. Bu bakterilere karşı etkin bir doğal madde bulmak amacıyla *Androctonus crassicauda* ve *Leiurus abdullahbayramii* akrep zehirlerinin HPLC yöntemiyle saflaştırarak mevcut antimikrobiyal peptitlerin (AMP) in vitro ve ratlar ESCAPE bakteri suşları ile sepsis oluşturarak in vivo etkinliğini araştırmayı amaçladık. Ayrıca saflaştırılan bu peptitlerin nanopartikülle kaplanarak antimikrobiyal etkinliğini güçlendirmeyi amaçladık. İn vitro çalışmada agar kuyucuk yöntemiyle bakterilere karşı etkinlik araştırıldı. *L.abdullahbayramii* akrep türünde herhangi bir etkinlik bulunmazken *A.crassicauda* türünde 36. dk fraksiyonunda *K.pneumoniae* suşuna karşı etkinlik tespit edildi. Bu fraksiyonla nanopartikül kaplama işlemi ve daha sonra karakterizasyon analizleri gerçekleştirildi. İn vitro deneylerde gruplara ayrılan ratlar *K.pneumoniae* klinik suşu ile sepsis oluşturuldu. Bakteri uygulamasından sonra 6. saatte tedavi amacıyla akrep zehirleri uygulandı ve 24. saatte sakrifiye edildi. Sepsis bulgularını ve denenen maddenin etkinliğini görmek amacıyla akciğer dokuları alındı ve homojenizasyon işlemine tabi tutuldu. Bunlardan ELİSA ile TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 ölçümleri yapıldı. MMP-2 ve MMP-9' lu primer ve sekonder antikor kitleri kullanılarak ekstraselüler matriks ve fibrozis açısından histopatolojik incelemeler yapıldı. Elde edilen biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal veriler ışığında *K.pneumoniae*' ye karşı sepsis oluşturulan kontrol grubuna göre anlamlı farklılık bulunmuştur. Ayrıca histolojik olarak sepsis grubunda akciğer doku kesitlerindeki alveolar septadaki değişiklikler ve inflamasyon alanları ile hyalin membran yapısında azalma her iki akrep türünde de gözlemlenmiştir. Sitotoksikite belirlenmesinde HeLa hücre kullanılmış. 24 ve 48 saat dilimlerinde iki akrep türünde de sitotoksik etkinlik saptanmıştır. Bu bulgular ışığında AcraX' in *K.pneumoniae* suşuna karşı etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nozokomiyal enfeksiyonlar, akrep venomu, kitosan, Antimikrobiyal peptit.

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Medical Microbiology
Thesis Type : Doctorate Thesis
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Kazım ŞAHİN
Co-supervisor II. : Assoc. Prof. Dr. Figen ÇALIŞKAN
Author : Burak OSKAY
Year : 2024
Pages : 123

ABSTRACT

**IN VITRO AND IN VIVO INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL
EFFECTS OF *Androctonus crassicauda* and *Leiurus abdullahbayrami*
SCORPION VENOM PEPTIDES ON SOME HOSPITAL INFECTIOUS
AGENTS**

Nosocomial infections caused by antibiotic-resistant bacteria cause significant economic and human health problems. For this reason, natural anti-bacterial substances against antibiotic resistant bacteria are being sought. In order to find effective substances against these bacteria, we aimed to investigate the effectiveness of antimicrobial peptides (AMPs) in the venom of *Androctonus crassicauda* and *Leiurus abdullahbayrami* scorpions purified by the HPLC method. The effectiveness of the AMP was investigated in vitro and in vivo by inducing sepsis with ESCAPE bacterial strains in rats. We also considered strengthening the antimicrobial activity of these purified peptides by coating them with nanoparticles. In the in vitro study, activity against bacteria was investigated by the agar well method. While no activity was found in the *L.abdullahbayrami* scorpion species, activity was detected against the *K.pneumoniae* strain in the 36th min fraction in the venom of the *A.crassicauda* species. Nanoparticle coating process was performed on this fraction and then the particles were characterized. In in vitro experiments, sepsis was induced in rats allocated into groups, with the clinic strain of *K.pneumoniae*. scorpion venom was applied 6 hours after bacterial application, and the rats were sacrificed at 24 hours. Lung tissues were taken and subjected to homogenization process. In the homogenates, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 measurements were made with ELISA. Histopathological examinations were performed using anti-MMP-2 and MMP-9 antibody kits in terms of extracellular matrix and fibrosis. In the light of the biochemical, histopathological and immunohistochemical data, a significant difference was found compared to the control group in which sepsis was induced with *K.pneumoniae*. In addition, histological changes in the alveolar septa in the lung tissue sections in the sepsis group, inflammation areas and a decrease in the hyaline membrane structure were observed in both scorpion species. HeLa cells were used to determine cytotoxicity. Cytotoxic activity was detected in both scorpion species at 24 and 48 hours intervals. In light of these findings, it was concluded that AcraX was effective against *K.pneumoniae* strains.

Keywords: Nosocomial infections, scorpion venom, cithosan, Antimicrobial peptide.

KISALTMALAR

AMP	:	Antimikrobiyal peptit
Acra	:	Androctonus
CDC	:	ABD Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers of Disease Control and Prevention)
cfu	:	Bakteri kolonisi oluşturma birimi
DSÖ (WHO)	:	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
EMA	:	Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency)
EUCAST	:	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
FDA	:	Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FT-IR	:	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GSH	:	Glutasyon peroksidaz (γ -glutamil-sisteinil-glisin)
HPLC	:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Liquid Pressure Chromatography)
IL	:	İnterlökin
IP	:	İntraperitoneal
IV	:	İntravenöz
Lab	:	Leirus abduallahbayramii
LB	:	Luthrien Broth
LD ₅₀	:	Ortalama Öldürücü Doz
LPS	:	Lipopolisakkarit
MDA	:	Malondialdehit
MDR	:	Multi-drug Resistance
MHB	:	Muller Hinton Broth
MİK	:	Minimal inhibisyon konsantrasyonu
MRSA	:	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
Na	:	Sodyum
PDI	:	Polidispersite indeksi
PDR	:	Pan- drug Resistance

Rpm	:	Revolution per minute
RTEU	:	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
TEM	:	Geçirimli Elektron Mikroskop (Transmission Electron Microscopy)
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör
TPP	:	Tripolifosfat
UV-NİS	:	Ultraviyole Görünür Spektrometri (UV-Visible Spectroscopy)
XDR	:	Extensive Drug Resistance



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Akreplerin taksonomisi (Bücherl, 1971)	5
Tablo 2. Dünya geneline dağılmış en ölümcül akrep türlerinin bazıları	8
Tablo 3. İnsanlar için onaylanmış hayvansal zehir kaynaklı ilaçlar	17
Tablo 4. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması	26
Tablo 5. Türkiye’ deki nozokomiyal enfeksiyonlarının polikliniklere göre dağılımı	33
Tablo 6. Türkiye' deki Nozokomiyal enfeksiyonlarında bakteriyel etkenlerinin dağılımı	34
Tablo 7. <i>S. aureus</i> en sık karşılaşılan direnç mekanizmaları (Lowy, 2003).....	45
Tablo 8. Matute-Bello et al. Modified Lung Histopathological Damage Score (LHDS)	63
Tablo 9. IHC Staining Positivity Score.	63
Tablo 10. 36-39. dk 1. fraksiyon pik verileri.....	67
Tablo 11. MİK verileri. 36-39. dk fraksiyonun bakteriler üzerine etkileri.....	69
Tablo 12. <i>A. crassicauda</i> venomunun 36-39. dakika fraksiyon protein miktarı	71
Tablo 13. Lung Histopathological Damage Score Results (median (25%-75% interquartile range)).	77
Tablo 14. Alveolar wall thickness (µm) Results results (mean+standart deviation). 78	
Tablo 15. IHC Positivity Grade Score Results (median with interquartile (25%-75%) range).	80
Tablo 16. 24 saat diliminde sitotoksik analiz	87
Tablo 17. 48 saat diliminde sitotoksik analiz	88
Tablo 18. Sitokin Analizler (mean+standart deviation).	92

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Akreplerin anatomik yapısı (Williams, 2009)	7
Şekil 2. Gen Bölge Sayısı	10
Şekil 3. <i>A. crassicauda</i>	11
Şekil 4. <i>Leiurus abduhbayramii</i>	12
Şekil 5. Akrep venomunun Terapötik Etkileri	16
Şekil 6. <i>K. pneumoniae</i>	36
Şekil 7. <i>A. baumannii</i> (yoğun bakım hastasından alınan örnek)	41
Şekil 8. <i>S.aureus</i>	43
Şekil 9. Hazırlanan stok çözelti	49
Şekil 10. Ratların Bakım ve Beslenmesi	50
Şekil 11. Akreplerin bakım ve beslenmesi	50
Şekil 12. Elisa Deneyi	61
Şekil 13. HPLC 3D Analiz	65
Şekil 14. <i>A. crassicauda</i> 1. HPLC Uygulaması.....	66
Şekil 15. <i>L. abduhbayramii</i> HPLC Uygulaması.....	68
Şekil 16. Disk diffüzyon analizi	69
Şekil 17. HPLC 36-39. dk fraksiyon grafiği.....	70
Şekil 18. a) Yoğunluğa göre boyut dağılımı b) Zeta potansiyeli dağılımı.....	72
Şekil 19. FT-IR Ölçümü	73
Şekil 20. TEM Haritalama.....	74
Şekil 21. UV-NİS Grafiği	75
Şekil 22. H&E ile boyanmış akciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.	81
Şekil 23. MMP-2 primer antikoru ile inkübe edilmiş akciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.....	83
Şekil 24. MMP-9 primer antikoru ile inkübe edilmiş akciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.....	85
Şekil 25. Akciğer Dokusu GSH Değişim Grafiği.....	89
Şekil 26. Akciğer Dokusu MDA Değişim Grafiği	90

GİRİŞ

Penisilinin keşfiyle insanlığın kullanımına sunulan antibiyotikler, tarihteki birçok salgınların kontrol altına alınmasını sağlamıştır. Günümüzde ise bu avantajlı yaklaşımın yerini bilinçsizce ve hatalı kullanımlar, gereksiz reçetelemeler (Harman & Günseren, 2021), doğada hayvansal ve zirai kullanımlardaki yoğunluklar sonucu oluşan antibiyotik kalıntılarının suda ve toprakta birikmesiyle genetik olarak bunlara dirençli bakteri türlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Monahan et al., 2021). Mutasyonlar sonucu oluşan bu dirençli bakteriler halk sağlığı için önemi gün geçtikçe artarak devam etmektedir.

Antibiyotik direnci geliştiren bakterilerin günümüzde yol açtığı en büyük sorun nozokomiyal enfeksiyonlardır. Hastaneye yatış sonrası şekillenen nozokomiyal enfeksiyonlar hastanede kalış süresinin uzatmasına bağlı olarak maliyetlerin artması gibi ekonomik sonuçları olmakla birlikte morbidite ve mortalite oranlarında yükselişe de neden olmaktadır. Bu nedenle enfeksiyonun kontrol altına alınması oldukça önemlidir (Lakoh et al., 2020). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir epidemiyolojik çalışmaya göre 4,5 ile 11 milyon dolar sağlık hizmetlerine ek bir maliyet artışına ve ayrıca yılda yaklaşık 80.000 kişinin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Hormozi et al., 2018). Ayrıca Birleşmiş Milletler bünyesinde Interagency Coordination Group (IACG) tarafından yayınlanan farklı bir çalışma raporunda ise antibiyotik dirençli mikroorganizmaların dünya çapında en az 70.000 ölüme neden olduğu ve 2050 yılına kadar her yıl 10 milyon ölüm oluşabileceğini, bu nedenle bu enfeksiyonların önemine dikkat edilerek gerekli önlemlerin alınmasını bildirmiştir (Yacoub et al., 2020). Bu da sorunun büyüklüğünü göstermektedir.

ABD Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından açıklanan verilere göre Avrupa Birliği Ülkeleri yılda 670.000' den fazla enfeksiyon nedeninin antibiyotik dirençli bakteriler tarafından meydana geldiği ve bu vakalardan yaklaşık 33.000' in ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) ve CDC' nin ortaklaşa yaptığı son çalışmalarda özellikle karbapenem ve 3. kuşak sefalosporinlere dirençli *K. pneumoniae* ile yine karbapenem dirençli *Acinetobacter spp.* yükseliş göstermeleri ve engellenemeyişleri endişe verici olduğu bildirilmiştir. Bu

engellemelerin sağlanması ayrıca bir maliyet ve zaman gerektirmesi açısından önemlidir (URL-1, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>, 22 Ocak 2022). Ayrıca 2050 yılına kadar antibiyotiklerin hatalı kullanılmasına bağlı olarak 10 milyon insanın ölümüne sebep olabileceği ve insanlığı ekonomik olarak da etkileyeceği öngörülmektedir (Mwangi et al., 2019).

Araştırmamızda nozokomiyal enfeksiyonlar içerisinde en sık görülen, tedavi süreçleri zor, zaman alıcı ve antibiyotik direnci en fazla karşılaşılan etkenlerden olan ve halk sağlığı açısından tehlikeli olarak nitelendirilen *ESCAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter spp.*) bakteri suşları (Boucher et al., 2009; Tacconelli et al., 2018) arasından seçilmiştir.

Günümüzde gelişen teknolojik gelişmelerden faydalanarak, yeni antibiyotik üretimi için gerekli kimyasalların bulunmasından ziyade, araştırmalar bu enfeksiyöz ajanlarla doğal yollarla mücadele üzerine yoğunlaşmıştır. Bu yeni bulunan organik bileşikler; nanopartikül maddeler ile kaplanarak daha kuvvetli bileşikler haline getirilmesi sağlanabilmektedir (Mureed et al., 2021). Yapılan araştırmalarda *K. pneumoniae*, *S. aureus* gibi biyofilm oluşturarak tedavileri zor olan dirençli bakterilerde nanopartikül kaplı antibiyotiklerin kullanılması biyofilm oluşumunu engelleyerek tedavilerin etkinlik derecelerinin arttırdığını göstermiştir (Hayat et al., 2018).

Bu şekilde tedavileri zor ve yayılımları kolay bu enfeksiyon ajanlarının yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini ve bu sayede durdurulabilmesi gerektiğinden dolayı bu çalışmayı yapmayı planladık. Antibakteriyel etkiye sahip olan fakat geliştirilecek olan bu biyomoleküllere karşı bakteriler direnç mekanizmalarının da geliştiremeyecek yeni moleküllere acilen ihtiyaç bulunması halk sağlığı için oldukça önemlidir (Zhou et al., 2020).

Zehirli hayvanlar, hayvan türlerinin yaklaşık %15' ini oluşturmaktadırlar (Jenner & Undheim, 2017). Hayvansal zehirlerin yapısında bulunan antimikrobiyal peptitler (AMP), membranların parçalanmasını indükleyerek, kanal bloker özelliğinde oldukları, hücre içerisinde belli bir hedefe yönelen hareketli yapılar oldukları için birçok mikroorganizmayı öldürebilmektedirler. Ayrıca mikroorganizmalardaki direnç

mekanizmalarını indüklemeye az duyarlı olmaları da bu biyolojik yapıları avantajlı hale getirmektedir (Raja et al., 2017). İmmun modölatör özelliklerinden dolayı vücut savunma sisteminin daha da güçlenerek etkenle mücadeleyi sağlamaları mikroorganizmalarla mücadelede daha etkin olmamızı sağlayabilirler (Lai & Gallo, 2009).

AMP' lerin nanopartikül yapılar ile kaplanması sonucunda daha kuvvetli antimikrobiyal bir ajan oluşturarak, dirençli bakterilerle mücadele etmenin mümkün olabileceğini ve bu bileşiklerin doku ve organlarda herhangi bir zarar oluşturmayaacağını öngörmekteyiz.

Akrep zehirlerinin immunolojik etkilerinin olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Saadi et al., 2015). Bu özellikleri hem vücudun immunolojik olarak direncini yükseltmesini sağlamakta, vücudun savunma mekanizmaların uyarılması sayesinde bakterilerin farklı dokularda oluşturdukları lezyonların iyileşme süreçlerini hızlandırılması öngörülmektedir.

Çalışmamızda oluşturduğumuz hipotezlerden olan dokularda rejenerasyon etkisi farklı hastalıklar için yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Örnek olarak; *A. amorexia* akrep türünün sıçanlarda oluşturulan romatoid artrit modeli ile yapısında bulunan peptitler aracılığıyla synovial sıvıda, eklem dokularında rejenerasyon gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Hassan et al., 2019). Yine farklı bir çalışmada uygulanan düşük frekanslı ışınlarla oluşturulan deneysel hepatotoksistide *A. amoreuxi* türü akrep zehirleriyle yapılan tedavide rejenerasyonun şekillendiği rapor edilmiştir (Hasan et al., 2022).

Bu tez çalışmasındaki amaç; AMP aracılığı ile *in vivo* ve *in vitro* olarak bakteriyosidal/bakteriyostatik etkinliğin gösterilmesi ve bunun *in vivo* olarak uygulamalar sonrasında metabolizma da oluşturacağı yanıtların incelenmesidir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Akrepler

Akrepler, morfolojik analizler ve günışığına çıkarılan fosiller ile yapılan incelmeler sonucu en eski canlılardan oldukları bildirilmiştir. Bu yüzden akreplere yaşayan fosiller de denilmektedir (Lourenço, 2018). Ayrıca mitolojik dönemlerde ve eski tarihlerde “şeytan için çalışan ajan” ve “kötülük ve günah ile ilgili” olduğuna inanılan kötü üne sahip canlılardır (Polis, 1990).

1990 yıllarından günümüze akrepler üzerine yapılan çalışmalar ve bu çalışmaları yapan bilim insanlarının sayısında hızlı bir artış gözlemlenmektedir. Bunun bir sonucu olarak her geçen gün yeni türler tanımlanmaktadır. Günümüzde tanımlanmış 2200 tür akrep bildirilmiş olup bu sayının artacağı tahmin edilmektedir. Bildirilen akrep türlerinden yaklaşık 50 civarı bünyelerinde ölümcül özelliğe sahip zehir ihtiva etmektedir (Lourenço, 2014, 2018).

Akrepler; Tablo 1’ de gösterildiği gibi *Arachnida* sınıfı içerisinde *Scorpionida* takımında bulunmaktadır. Kuyruk kısmında 2 adet zehir bezi bulundurlar. 3 ila 18 cm arasında değişen vücut uzunluğundadır. Sert bir gövde yapısına sahiptirler. Gece avlanmayı severler ve genellikle taş, kaya gibi yerlerde gizlenerek yaşamayı tercih ederler (Nejati et al., 2018).

Tablo 1. Akrelerin taksonomisi (Bücherl, 1971)

ÜST	ALEM	ŞUBE	ALT ŞUBE	SINIF	TAKIM	ÜST FAMILYA
ALEM						
Eukaryota	Animalia	Arthropoda	Chelicerata	Arachnida	Scorpiones	Pseudochactoidea Buthidea Chaeriloidea Luroidea Scopionoidea

Vivipar özellikte olup doğum ile yavrularını dünyaya getirirler. Türler arası farklılık göstermekle beraber 7-14 ay süren bir gebelik süreçleri vardır. Doğum sezonları ilkbahar ve yaz aylarındadır. Bir doğumda 10-60 arası yavru doğururlar (Lourenço, 2018; Özlü Ekmekçioğlu, 2019).

13 yılda eşeyssel olgunluğa gelen akrelerin yaşam süreleri ortalama 26 yıldır. Bu süre zarfında 69 kez gömlek değiştirmektedirler. Doğumdan sonra belli bir süre anne sırtında geçiren yavru akreler ilk gömleklerini bu safhada değiştirirler (Özkan & Karaer, 2007).

Adaptasyonları çok iyi olan canlılar olup, ılık ve nemli iklime sahip bölgeleri yaşam alanı olarak tercih ederler. Kısaçaclarını kullanarak toprak alanlarda çukurlar kazarak hem diğer avcı canlılara karşı kendilerine korunaklı yer oluştururken hem de konfor zonlarına uygun nemli bir ortam oluştururlar. Kısaçacları ile yakaladıkları avlarını eğer küçükse bu uzuvlarıyla sıkarak öldürürler. Daha büyük avlar için yine yakaladıkları kısaçaclarına ilaveten sokmaları sırasında zehirlerini enjekte etmek suretiyle felç ederek öldürürler (Özkan & Karaer, 2007).

Zehirlerinin toksisitesinin bulundukları coğrafi yapıya göre değişim gösterdikleri bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada; İran' ın farklı bölgelerinden *Hottentotta saulcyii* türü akreler toplanmış, elde edilen zehirlerin LD₅₀ değerleri, farklı coğrafik bölgelerden toplanan aynı akrep türü ile yapılan benzer çalışmalardaki deney hayvanlarına iv yolla uygulanan ham venomun LD₅₀ dozlarının 0.95, 1.01 ve 0.73 mg/kg (Latifi & Tabatabai, 1979; Tu, 1984) olarak farklı olduğu tespit edilmiştir (Yağmur et al., 2015).

Subtropik veya tropik olan ülkelerde gelişen tıbbi teknolojilere rağmen hala akrep sokmalarından dolayı ciddi halk sağlığı problemi olarak kabul edilmektedir (Ozel et al., 2019).

1.1.1. Akreplerin Morfolojik Özellikleri

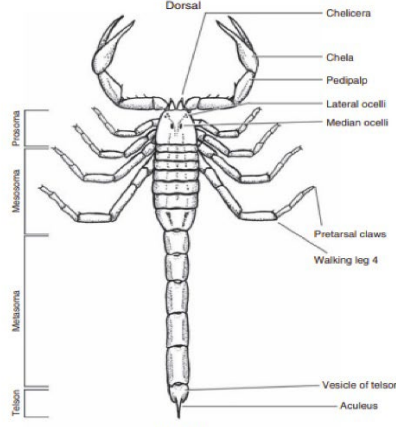
Morfolojik olarak incelendiklerinde vücutlarının iki genel kısımdan oluştuğu görülmektedir. Bunlardan ilki kitin yapısında olan ve carapax denilen sert kısımdan oluşan prosoma (cephalotoraks) bölümüdür. İkinci kısım ise mesosoma ve metasoma bölümlerini kapsayan abdomen (opistosoma) bölümüdür.

Prosoma altı ekstremiteden oluşmaktadır. Bunlar bir çift keliser, bir çift pedipalp ve dört çift yürüme ekstremiteleridir (Erkmen, 2012). Ayrıca bu bölüm segmentsiz olup kabaca baş ve gövde kısmını kapsamaktadır. Kısaç şeklinde bulunan uzuvları peridalp bölümünde yer almaktadır. Peridalp yapısında havadaki titreşimleri algılayan bir çeşit sensör vazifesi görevi gören trichobotrium denilen duyu tüyler bulunmaktadır (ÖZKAN & KARAER, 2004).

Kliserler besinleri parçalayacak ve bunları farinkse iletecek şekilde gelişmişlerdir. Ayrıca avların tutulmasında da etkin olarak görevlidirler (Yağmur, 2005).

Akreplerin vücudunda bulunan zehir keseleri (telson) abdomen bölümündeki metasoma yapısında bulunmaktadır. Metosoma 5 segmente ayrılmış olup telson ve iğne kısmı beşinci segmentte bulunmaktadır (Erkmen, 2012). Telsonların içerisinde iki tane zehir bezi bulunmaktadır. Bu zehir bezleri bağımsız olarak kanallar aracılığıyla iğneye açılmaktadır. Son segmentte bulunan iğne armut şeklinde görülmektedir. Kuyruk kısmı yürüme esnasında arkaya doğru, dinlenme sırasında yana doğru kıvrık şekilde dururken, sokma esnasında yay şeklini almaktadır (ÖZKAN & KARAER, 2004).

Akreplerin en ilginç özellikleri atalarından kalma bir özellikleri olan UV ışığı altında floresan ışımaya yapmalarıdır. Bunu kutikula içerisinde yeralan ve kabukta biriken 4-metil-7-hidroksi-kumarin bileşiğinin neden olduğu bildirilmiştir. Bu madde yavrularda bulunmadığı için floresan özellik gösteremezler (Volschenk, 2005).



Şekil 1. Akrelerin anatomik yapısı (Williams, 2009)

1.1.2. Türkiye ve Dünyadaki Akrep Türleri

Akreler 4 büyük familyaya ayrılmışlardır. Bunlar *Buthidae*, *Scorpionidae*, *Luridae* ve *Euscorpiidae*. Türkiye’ de bu familyalar içerisinde yer alan 41 adet akrep türü bulunduğu bildirilmiştir. Bugüne kadar tespit edilen alt türler bölgelere göre;

Güneydoğu Anadolu Bölgesi; *Androctonus crassicauda*, *Buthacus macrocentrus*, *Compsobuthus matthiesseni*, *Hottentotta saulcyi*, *Leiurus abdullahbayrami*, *Mesobuthus phillipsii*, *Scorpio fuscus*, *Calchas birulai*, *C. Kosswigi*

Doğu Anadolu Bölgesi; *M. eupeus*, *Olivierus caucasicus*, *Orthochirusfomi* *chevive C.anlasi*

İç Anadolu Bölgesi; *Euscorpius eskisehirensis*, *E. aladaglarensis*, *Aegaeobuthus gibbosusanatolicus*

Marmara Bölgesi; *E.touricus*, *E.uludagensis*, *E. idaeus*

Doğu Akdeniz; *E. ciliciensis*, *E. koci*, *Protoiurusasiaticus*, *C.schmiedeknechtive*, *A.nigrocinctus*

Batı Akdeniz; *P. kraepelini*, *E. lycius*, *N. gruberi*, *P. kadleci*, *P. kraepelini*, *P. kumlutasi*, *E. arikani*, *E. lycius*, *E. goçmeni*, *E. alanyaensis*

Ege Bölgesi; *Iuruskinzel bachi*, *E. avcii*, *E. sultanensis*, *E. hanazicus*, *E. hakani*, *A.g. analiticus* (Filazi & Özkan, 2021)

Tıbbi açıdan önemli ve zehirleri ölümcül olan bazı akrep çeşitleri Tablo 2’ de verilmiştir.

Tablo 2. Dünya geneline dağılmış en ölümcül akrep türlerinin bazıları

Common name	Scientific name	Geographical distribution	References
Sahara scorpion	<i>Androctonus australis</i> (Ewing, 1928)	North Africa and Middle East	Touloun et al. (2001)
Arabianfat-tailed scorpion	<i>Androctonus crassicauda</i> (Olivier, 1807)	Turkey, Middle East and North Africa	Radmanesh, (1990); Dittrich et al. (1995)
Yellow scorpion	<i>Buthus occitanus</i> (Amoreux, 1789)	Countries bordering Mediterranean and Middle East	Ghalim et al. (2000)
Deathstalker	<i>Leiurus quinquestriatus</i> (Ehrenberg, 1829)	North Africa and Middle East	Dittrich et al. (1995)
South African fattail scorpion	<i>Parabuthus transvaalicus</i> (Purcell, 1899)	South Africa	Bergman (1997)
Trinidad thick-tailed scorpion	<i>Tityus trinitatis</i> (Pocock, 1897)	Trinidad and Venezuela	Daisley et al., 1999
Brazilian scorpion Brazil,	<i>Tityus bahiensis</i> (Perty, 1833)	Argentina	Bucaretschi et al. (1995)
Arizona bark scorpion	<i>Centruroides sculpturatus</i> (Ewing, 1928)	California, New Mexico, Arizona and Baja California	Chowell et al. (2006); Dehesa-Dávila and Possani, 1994
Indian red scorpion	<i>Mesobuthus tamulus</i> (Fabricius, 1798)	India	Kovarik, (2007)

1.1.2.1. *Androctonus crassicauda*

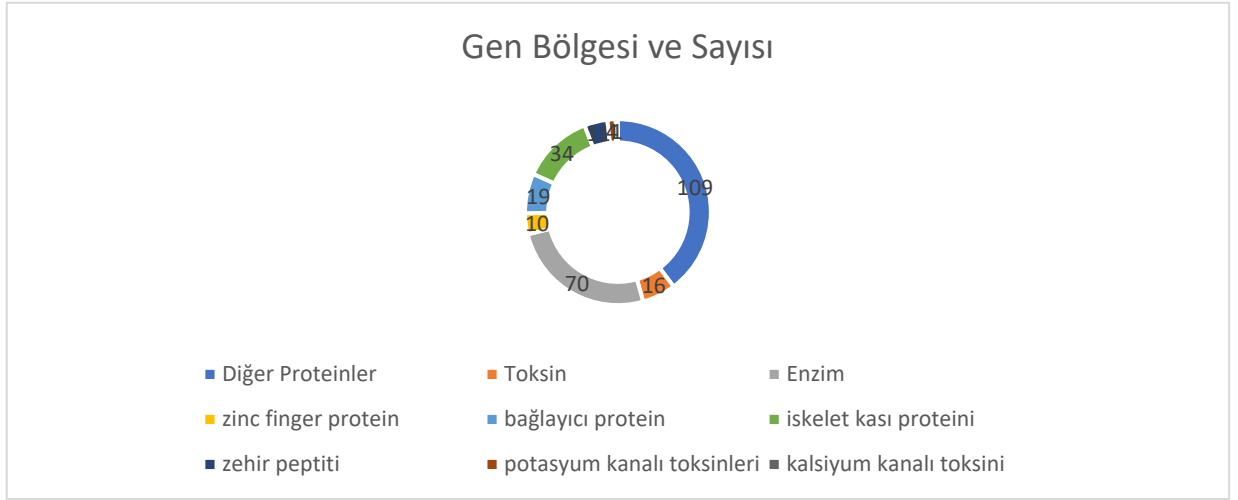
Buthidea akrep ailesi içerisinde bulunan, oldukça zehirli bir akrep türüdür. Özellikle İran, Irak, Türkiye, Suriye, Ürdün, Arabistan bölgelerinde yoğun olarak bulunmaktadır (Bayatzadeh et al., 2020). Yağlı kuyruklu akrep diye de isimlendirilmiştir.

1807 yılında Oliver tarafından ilk olarak İran’ da keşfedilmiş ve *Scorpion crassicauda* olarak adlandırılmıştır. Türkiye’ deki ilk tespit Iğdır ilimizde Birula tarafında 1904 yılında bildirilmiştir (Yağmur, 2021). 1951 yılında Vachon tarafından yapılan araştırmalar sonucunda Malatya, Mardin Şanlıurfa illerimizde de türün varlığı bildirilmiştir (Vachon, 1952).

A. crassicauda akrep türüne ait zehirde ağırlıkları 267 ile 44.541 Da arasında 80’ den fazla peptit yapısında bileşenin var olduğu tahmin edilmekte olup bunlardan 8 tanesinin karakterizasyonları yapılmıştır (Caliskan et al., 2013). Dünyanın en tehlikeli akrep türleri arasında yer alan *A. crassicauda* venomunun LD₅₀ değeri 0,40 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Alajmi et al., 2020).

Zehir bezleri üzerinde yapılan araştırmalarda Şekil 2’ de gösterildiği gibi zehir bezi transkriptomunda tanımlana regüle genlerin sayıları bulunmuştur. Buna göre mRNA dizilerine göre 7 gruba ayrılmış olup, benzerliklerine ve yakınlıklarına göre belirlenmiştir. Bu gruplar enzimler, iskelet kası proteinleri, toksinler, bağlayıcı proteinler, zehir peptitleri, çinko finger proteinleri ve diğer proteinler olarak ayrılmıştır (Salabi & Jafari, 2022).

İmmunolojik olarak toksik etkilerini aşırı uyarılma ile oluşturmakta olup fosfolipaz etkisi olmadığı için diğer akrep zehirlerinden farklı olarak hemolitik etkileri yoktur. Ayrıca bu özelliği venomun sitotoksik etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu nedenle diğer akrep türlerinden farklı mekanizmaya sahip bir zehir olduğu bildirilmiştir (Khodadadi et al., 2012). İnsanların *A. crassicauda* tarafından sokulmasından sonra monositler uyarılmakta ve bunun sonucunda da IL-12 salınımında indüksiyona neden olduğu gösterilmiştir (Saadi et al., 2015).



Şekil 2. Gen Bölge Sayısı

A. crassicauda türüne ait akrep zehirinde yapılan çalışmalarda AST ve ALT değerlerinde dikkate değer değişikliklere neden olduğunu gösterilmiştir. Venomun vücuda girdikten sonra karaciğer yetmezliğine ve myokardiyal enfarktüse neden olduğu, ayrıca in vivo deneylerde artan katekolaminler, insülin, glukagon ve kortizol düzeylerindeki değişimlerin etkisiyle hiperglisemi tablosuna yol açtığı bildirilmiştir (Ozkan et al., 2007).

Semptomatik olarak yapılan bir çalışmada *A. crassicauda* tarafından sokulan vakalarda zehirin enjekte edildiği yerde ağrı (%92,3), kızarıklık (%69,2) ve şişme (%61,5) oluşurken, kusma (%92,3) ve baş dönmesi (%34,6) gibi genel semptomlar rapor edilmiştir. Ayrıca akrep sokması vakalarında ölüm oranının %11,5 olduğu bildirilmiştir (Abd El et al., 2019).



Şekil 3. *A. crassicauda*

1.1.2.2. *Leiurus abduhbayramii*

Türkiye’ de yaşayan *Buthidae* ailesine ait 12 türden birisidir. İlk tespitlerinde *Androctonus* sınıfı içerisinde olduğu düşünülen bu akrep türü, 1960 yılında ilk olarak Adıyaman ilimizde tespit edilerek *L. quinquestriatus* olduğu bildirilmiş, 2009 yılında ise bildirilen raporda bu türden farklı olduğu ve isminin *L. abduhbayramii* olduğu ilan edilmiştir (Ozkan et al., 2011a).

Yaşam alanlarının Güneydoğu Anadolu Bölgesi’ nde Batı Fırat havzasında sınırlarında yer alan Hatay, Adıyaman, Şanlıurfa, Gaziantep, Kilis ve Kahramanmaraş illerinde olduğu tespit edilmiştir (Erdeş et al., 2014). Bölgede sarı akrep olarak bilinmektedir (Çevik & Kanat, 2022).

Nöronal ve kas hücreleri (kalp, düz ve iskelet kasları) yapısındaki voltaj kapılı sodyum, potasyum, klor, kalsiyum gibi iyon kanallarını etkileyen nörotoksin özelliğinde zehir taşımaları ve bu zehirin oldukça öldürücü güce sahip olması bu canlıları tıbbi açıdan önemli kılmaktadır (Çevik & Kanat, 2022).



Şekil 4. *Leiurus abdullahbayramii*

Yapılan son araştırmalara göre 113 farklı bileşiği yapısında bulundurduğu tespit edilmiştir. Ayrıca total venom yapısında 28 adet K^+ , 42 adet Na^+ , 4 adet Cl^- ve 2 adet Ca^{+2} kanallarına etkili proteinler bulunmuştur (Borges & Lomonte, 2023).

Venomun vücuda zerkinden sonra sodyum ve potasyum voltaj kapılı kanallarını uyarılması ile oluşan katekolamin fırtınasından dolayı sol ventrikül kontraktilitesinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (kardiyomyopati) (Dokur et al., 2017). Adrenal bezlerden ve postganglionik sinir uçlarından salınan katekolaminlerin etkisiyle oluşan kardiyomyopatiden başka böbreklerden renin salgılamasına da neden olabilmektedirler (Bakir et al., 2012). Zehirlerin bu etkileri ve aşırı uyarılan alfa reseptörlerde oluşturduğu etkiden dolayı pulmoner kapillerlerde

geçirgenliğin değişmesinin sonucuyla akciğerlerde ödem oluşmaktadır (Dokur et al., 2017).

Yapılan çalışmalarda *L. abdullahbayramii* akrep türünden elde edilen zehirin LD₅₀ değerinin 0,19 mg/kg olduğu tespit edilmiş olup, düşük dozlarda dahi ne kadar etkili olduğunu göstermektedir (Borges & Yağmur, 2022). Ayrıca zehir toksisitelerinin *A. crassicauda* türüne göre 2 ile 5 kat arasında daha kuvvetli ve öldürücü olduğu bildirilmektedir (Ozkan et al., 2011a).

1.1.3. Akrep ve Diğer Hayvan Zehirlerinin Tedavi Amacıyla Kullanım Tarihçesi

Hayvan zehirlerinin tedavi amaçlı kullanımını tarihi olarak çok eskilere dayanmaktadır. Antik Roma döneminde zehirli hayvanlardan elde edilen venomlar ile çiçek hastalığı, cüzam ve ateşlenme durumlarında kullanıldığına dair kaynaklar bilinmektedir (Utkin, 2015). Ayrıca Aristoteles, Hipokrat, Galen ve Pallus' a ait yazılı kaynaklarda akrep ve arı zehirlerinin anestezide ve artrit tedavilerinde kullanıldığı bilgisi verilmiştir (Bogdanov, 2015).

Akrepler eski Mısır' dan beri bilinen ve araştırılan muhteşem ve her zaman ürkütücü olmuş tarih öncesi canlılardır. Zehirleri insanlar için tehlike arz ettikleri için her zaman araştırma konusu olmuştur. Eski dönemlerdeki bu incelemeler panzehirlerinin bulunması ile başlamıştır. Örneğin Eski Mısır döneminde panzehir yapımı biliniyordu ve sokma vakaları çok olduğu için terapötik olarak kullanılıyordu (Chen et al., 2018).

Rusya Çarlığını kuran Korkunç İvan döneminde gut tedavisinde arı zehiri kullanılarak krem yapıldığı bildirilmiştir. Ayrıca böbrek taşı tedavisinde ve diüretik olarak geliştirdikleri karışımların içeriğinde de arı ve akrep zehirinin bulunduğu kayıtlarda bildirilmiştir (Bogdanov, 2015).

Bilimsel olarak ilk maserasyon yöntemiyle akrep zehirinin sağılması 1872 yılında Jausset de Bellesme tarafından yapılmıştır. Türkiye' de akreplerden zehir temini antiserum üretmek amacıyla Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı bünyesinde 1942 yılında başlanmıştır (Özkan, 2008).

Akreplerin yoğun olduğu İran’ da da hala yüksek oranlarda akrep sokmalarının olduğu ve bu bölgede eski dönemlerden beri geleneksel veya modern tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (Dehghani & Arani, 2015).

Ayrıca geleneksel Çin tıbbında ise akrep zehirleri kas kasılmaları ve hormonal işleyişlerin düzenlenmesi açısından sıklıkla kullanılan yöntemler arasında bulunmaktadır (Chen et al., 2018).

Akrep zehirlerinin terapötik potansiyelleri moleküler hedeflerinin olması ve iyon kanal reseptörü özelliklerinden dolayıdır. Farmakolojik olarak sentetik kimyasal maddeler içeren ilaç etken maddeleriyle karşılaştırıldıklarında bu iki özellikleri aynı anda bulundurmuş olmaları avantajlı hale getirmektedir. Bu konuda en iyi örnek; kanal reseptör özelliklerinden yararlanarak kardiovasküler tedavilerde kullanılmak üzere Ca^{+2} kanal blokörleri geliştirilmiş olmasıdır (King, 2013).

Yapılan çalışmalarda anti-neoplastik aktiviteleri gösterilmiş olup özellikle nöroblastom, lösemi, glioma, meme kanseri gibi birçok kanserlerde etkili olabileceği çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir (Kazemi & Sabatier, 2019).

Akrep venomlarının dışında tedavi amaçlı en çok araştırma konusu olmuş bir diğer zehirli hayvan ise yılanlardır.

Antik Yunan döneminde yaşamış Nikander, yılan zehirini tanımlamakla birlikte panzehirini de bulmuştur. Bununla birlikte yılan zehirleri Albert Calmette tarafından ilk defa hayvanlara enjekte edilip alınan serumların güçlü bir panzehir olduğunu tespit etmiştir. 1934 yılından sonra yılan zehrinden sadece panzehir olarak değil, farklı hastalıkları karşı tedavi edici özelliği olabileceği konusunda araştırılmaya başlanmıştır (Utkin, 2015).

1.1.4. Akrep ve Diğer Hayvan Zehirlerinden Elde Edilen Terapotiklerin Günümüzdeki Kullanımı

Hayvan zehirlerinden elde edilen terapötikler konusunda ilk akla gelen ilaç, bir engerek yılan türü olan *Bothrops jararaca* ait zehirden elde edilen Captopril® veya Enalapril® isimli farmasötiklerdir (Tablo 3). 1980’ lerin başlarından beri hipertansif hastalarda ACE enzim inhibitörü olarak kullanılmaktadır (Utkin, 2015).

Antikuagülan olarak kullanılan Aggrastat® (triofiban) isimli ilaç *Sistrurus miliarius barbour* türü çingiraklı yılanın zehrinde bulunan heptapeptit yapısından

üretilmektedir. Özellikle trombotik kardiovasküler vakalarda yaygın bir kullanım alanı vardır (Hashemzadeh et al., 2008).

Artrit, artralji ve immunolojik hastalıkların tedavilerinde arı zehiri terapötik amaçla kullanılmaktadır. Ayrıca aneljezik etkinliğinden dolayı kas-iskelet sistemi rahatsızlıklarında da kullanılabilineceğine dair yayınlar bulunmaktadır. Bu uygulamalar günümüzde alternatif tıp tedavilerinde canlı arı sokması şeklinde olabileceği gibi topikal krem şeklinde lokal olarak uygulanabilmektedir. Canlı arı sokması işlemi akapuntur noktalarına arının sokarak zehirini kontrollü bir şekilde enjekte etmesini sağlayarak uygulanmaktadır (Zhou et al., 2020).

İyon kanalları farklı dokularda ve hücrelerde fazlaca bulunmaktadır. Bu kanalların dokularda proliferasyon artışı, tümör progresyonları, anjiyogenez, metastazlar ve apoptoz gibi mekanizmalarda önemli rolleri vardır. Hücre ve dokuların görevlerinin gerçekleştirilmesini sağlarlar. Bu özellikleri sayesinde kanser tedavilerinin ve yeni terapötiklerin geliştirilmelerinde iyon kanallarına etkileri yeni hedef bölgeler olarak düşünülmektedirler. Bundan dolayı akrep zehirleri kanser ve diğer hastalıkların tedavisi için araştırılmalar yoğunlaştırılmıştır (Díaz-García & Varela, 2020).

Ayrıca akrep venomu sahip olduğu birçok moleküller bileşik sayesinde antiepileptik ve analjezik özelliklere sahip olduğu yapılan birçok araştırmalarla kanıtlanmıştır. *Buthus martensi* akrep türüne ait zehirden Çin tıbbında hemipleji, yüz felci, apopleksi, serebralpalsi ve epilepsi gibi nörolojik bozukluklarının tedavisinde, ayrıca romatizma ve menenjit gibi hastalıklarda ağrı kesici olarak kullanılmaktadır (Shoukry et al., 2020).



Şekil 5. Akrep venomunun Terapötik Etkileri

Şekil 5’ de bildirildiği üzere günümüze kadar akrep venomları ile yapılan araştırmalar özet olarak genel başlık halinde verilmiştir (Ahmadi et al., 2020). Ayrıca kardiyovasküler sistem hastalıkları ve diyabet gibi hastalıklar ile ilgili çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir (JAVED et al., 2022).

Tablo 3. İnsanlar için onaylanmış hayvansal zehir kaynaklı ilaçlar

Molecule	Species of origin venom/toxin	Production	Mechanism of action	Use	More frequently reported adverse effects, pregnancy and breast feeding warnings	Reference
Batroxobin (Defibrase®)	Brazilian lancehead snake (Bothrops moojeni)	Purified from venom	Cleaves α -chain of fibrinogen	Acute cerebral infections; unspecific angina pectoris; sudden deafness	Microvascular thrombosis	Stocker, 1978; Vu et al., 2013; Pentapharm DSM Nutritional Products Ltd, 2018
Batroxobin (Plateltex-Act®)	Common lancehead snake (Bothrops atrox)	Purified from venom	Cleaves α -chain of fibrinogen	Gelification of blood for topical application	No toxicity phenomena are described in the tissue treated with the gel.	(Plateltex, 2018)
Batroxobin-Fibrin sealant (Vivostat®)	Brazilian lancehead snake (Bothrops moojeni)	Purified from venom	Cleaves α -chain of fibrinogen	Autologous fibrin sealant in surgery	The sealant has no known adverse effects	(Kjaergaard and Trumbull, 1998; Vivostat A/S, 2018)

Tablo 3 (Devam). İnsanlar için onaylanmış hayvansal zehir kaynaklı ilaçlar

Bee venom therapy (Apidox®)	Honey bee (Apis mellifera)	Whole venom	Anti-inflammatory action; alteration of the immune response via antigen competition	Pain associated with osteoarthritis and multiple sclerosis	Irritation, swollen, reddened, skin and severe allergic reactions that can be life-threatening.	(Gottler, 2019; US National Library of Medicine, 2020)
Bivalirudin (Angiomax®)	European medicinal leech (Hirudo medicinalis)	Synthetic	Reversible direct thrombin inhibitor	Anticoagulant in percutaneous coronary intervention	Hemorrhagic events, back pain, pain, hyper/hypotension, insomnia, anxiety, bradycardia, fever, nervousness	(US Food and Drug Administration, 2020)
Captopril (Capoten®)	Jarara snake (Bothrops jararaca)	Synthetic	Angiotensin-converting enzyme inhibitor	Hypertension, cardiac failure	Cough and skin rash; US FDA pregnancy category D; excreted into human milk; discontinue breast feeding or discontinue the drug, since the effects in the nursing infant are unknown	(US Food and Drug Administration, 2020)

Tablo 3 (Devam). İnsanlar için onaylanmış hayvansal zehir kaynaklı ilaçlar

Cobratide (Ketongning, cobrotoxin)	Chinese (Najanajatra)	cobra	Purified from venom	Blockage of nicotinic receptors	Chronic arthralgia, sciatica, neuropathic headache	Fatal side affects, such as respiration inhibition, can occur when it is injected at higher dose levels.	(Chen et al., 2016; Orientoxin Biotech Co. Ltd., 2019)
Desirudin (Iprivask®)	European medicinal leech (Hirudo medicinalis)		Recombinant	Selective and near- irreversible inhibitor of thrombin	Prevention of venous thrombotic events	Bleeding, deep vein thrombophlebitis, wound secretion, nausea, vomiting, fever, hematoma, anemia	US Food and Drug Administration, 2020)
Enalapril (Vasotec®)	Jarara snake (Bothrops jararaca)	capitviper	Synthetic	Angiotensin- converting enzyme inhibitor	Hypertension, cardiac failure	Skin rash, hypotension, fatigue, headache, abdominal pain, dyspnea.	(US Food and Drug Administration, 2020)
Eptifibatide (Integrilin®)	Pigmyrattle snake (Sistrurus miliarius)		Synthetic	Prevents binding of fibrinogen, von Wille brand factor, and other adhesive ligands to GPIIb/IIIa	Acute coronary syndrome; percutaneous coronary intervention	Bleeding, dizziness	(RxList, 2019; European Medicines Agency, 2020)

Tablo 3 (Devam). İnsanlar için onaylanmış hayvansal zehir kaynaklı ilaçlar

Exenatide (Byetta®)	Gliamon (Heloderma suspectum)	steril lizard	Synthetic	Glucagon-like peptide-1 receptor agonist	Type II diabetes mellitus	Hypoglycemia, nausea, diarrhea, headache, viral gastroenteritis, gastroesophageal reflux disease, dyspepsia fatigue	(US Food and Drug Administration, 2020)
Extended-release exenatide (Bydureon®)	Gliamon (Heloderma suspectum)	steril lizard	Synthetic	Glucagon-like peptide-1 receptor agonist	Type II diabetes mellitus	Hypoglycemia, nausea, diarrhea, headache, viral gastroenteritis, gastroesophageal reflux disease, dyspepsia fatigue	(US Food and Drug Administration, 2020)
Leechtherapy	European leech (Hirudo medicinalis) or other species	medicinal	Leech	Inhibits platelet aggregation and the coagulation cascade	Skin grafts and reattachment surgery	Lymphadenitis, slight swelling, pain of regional lymph nodes on the side of leech application and subfebrile temperature.	(Mumcuoglu, 2014; US Food and Drug Administration, 2020)

Tablo 3 (Devam). İnsanlar için onaylanmış hayvansal zehir kaynaklı ilaçlar

Leechtherapy	European medicinal leech (Hirudo medicinalis) or other species	Leech	Inhibits platelet aggregation and the coagulation cascade	Skin grafts and reattachment surgery	Lymphadenitis, slight swelling, pain of regional lymph nodes on the side of leech application and subfebrile temperature.	(Mumcuoglu, 2014; US Food and Drug Administration, 2020)
Lixisenatide (Lyxumia® and Adlyxin®)	Gliamon (Heloderma suspectum)	Synthetic	Glucagon-like peptide-1 receptor agonist	Type II diabetes mellitus	Nausea, vomiting, diarrhea, low blood sugar.	European medicines Agency, 2020; US Food and Drug Administration, 2020)
Trofiban (Aggrastat®)	Saw-scaled viper snake (Echiscarinatus)	Synthetic	Antagonist of fibrinogen binding to the GPIIb/IIIa	Acute coronary syndrome	Dizziness, slow heart rate, leg pain, pelvic pain, swelling	(MedicurePharma, 2016)
Ziconotide (Peria®)	Magical conemarinesnail (Conus magus)	Synthetic	Cav2.2 channel antagonist	Severe chronic pain	Dizziness, confusion, drowsiness, abnormal gait, memory impairment	(US Food and Drug Administration, 2020)

Günümüzde tedavi amaçlı kullanılan hayvan zehirlerinden üretilen ve Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency, EMA), Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) vb. kuruluşlarca onaylanan ve uygun görülen terapötik ajanlar Tablo 3’ de bildirilmiştir (Bordon et al., 2020).

1.1.5. Akrep Venomunun Kimyasal Yapısı

Akrep venomlarının yapısında peptitler, enzimler, mukoproteinler, serbest aminoasitler, nukleotitler, lipitler, aminler, heterosiklik bileşenler, inorganik tuzlar ve henüz tespitleri yapılamamış bileşenlerden oluşan oldukça kompleks bir yapıdan oluşmaktadır (Ortiz et al., 2015). Çoğu örümcek ve yılan zehirinden farklı olarak akrep zehirlerinin enzim aktiviteleri oldukça düşüktür (Gwee et al., 2002).

Akrepler son abdominal segmentte bulunan zehir bezlerinden salgıladıkları venom aracılığıyla; tehlike durumlarında avcılarından korunmakta, beslenmek için avlarını etkisiz hale getirmekte ve çeşitli mikroorganizmalarının kontaminasyonunu engellemektedirler. Bu önemli bileşik oldukça karışık ve kompleks bir yapıya sahiptir (Ahmadi et al., 2020; Krämer et al., 2022). Yapısındaki peptitler, kalsinler, disülfid köprülü olmayan peptit iyon kanallarına tropizmi özelliğinde olup nörotoksin olarak etki etmektedirler (Chippaux, 2012). Bu nörotoksin özelliği özellikle yılanlara göre akreplerde daha yüksek oranlarda olup avcılık ve korunmada bu canlılara daha ölümcül olma özelliği kazandırmıştır (Gwee et al., 2002).

α ve β toksin olarak iki grupta sınıflandırma yapılabilir. Bunlar; voltaj kapılı Na^+ kanallarının inaktivasyonu sağlayan α toksinler ve negatif potansiyellerde kanalların açılmasını uyaran β toksinlerdir. Burada belirtilen α toksin düşük dozlarda hücre zarında depolarizisyona sebep olurken, yüksek dozlarda aksiyon potansiyelini uzatarak felç ve kardiyak aritmiye neden olurlar. β toksinlerde myoklonik veya spastik kas kasılmalarına neden olarak etkilerini göstermektedirler (Ortiz et al., 2015).

Sodyum, potasyum, klor ve kalsiyum kanallarına ait hücre membranların yapısında bulunan voltaja bağlı iyon kanallarında bulunan proteinleri tanıyarak bunlarla etkileşime girerler (Jolodar, 2019).

Nörotoksin mekanizması *in vivo* yapılan araştırmalarda kolinerjik etki yaparak perisinaptik aralıktan asetil kolin (Ach) sentezini artırmasına sebep olmaktadır. Buna bağlı olarak adrenerjik reseptörlerin uyarılması sonucu adrenerjik bezlerden

katekolamin sentezini arttırmaktadır. Katekolaminin etkisiyle hipertansiyon, iskelet ve düz kaslarda kasılmalara, bronkokonstrüktif etkilere neden olurlar (Ortiz et al., 2015; Ozkan et al., 2006).

Akrep venomunun insan vücudunda yaptığı patofizyolojik etkilerinin temel sebebi salınan IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , NO, PGE₂ ve kininlerdir. Bu sitokinler metabolizmada düzensizliğe neden olmaktadır. Organlarda oluşan hasarların asıl etkisi TNF- α nedenlidir. TNF- α hücre zarındaki lipid metabolizmasına etki ederek iyon kanallarının işlevsel olmalarına engel olmaktadır. Ayrıca komplement sisteminin alternatif ve klasik yoldan aktive olmasını sağlar (Angsanakul & Sitprija, 2013).

1.2. Antimikrobiyal Peptitler (AMP)

AMP' ler tüm canlı organizmalarda doğal immun sistemin bir parçası olan protein parçacıklar olup, olumsuz durumlarda çeşitli enfeksiyonlara karşı canlıyı koruyan doğal bağışıklık bileşenleridir (Diamond et al., 2009; Ma et al., 2020). Çeşitli mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu ve non-spesifik etkileri vardır. Ayrıca eritrositler üzerine hemolitik aktiviteye sahiptir (Zeng et al., 2005).

Dubos tarafından 1939 yılında toprakta bulunana *Bacillus brevis* türünden elde ettiği bir maddenin farelerde pnömokok enfeksiyonunu iyileştirdiğini tespit etmesiyle bu konuda araştırmalar başlamıştır (Dubos, 1939). Bir sonraki yıl Dubos ve Hotchkiss etkili maddeyi saflaştırmayı başarmalarıyla, *Gramicidin D* adlandırmasını yaparak ilk defa bir AMP' yi literatüre kazandırmışlardır. Yine Dubos tarafından 1941 yılında Gram pozitif ve Gram negatif etkinliği olan *tirozidin* adlı AMP keşfi gerçekleştirilmiş, ancak bu madde insan kan hücrelerine karşı toksik etkili olduğu tespit edilmiştir (Rammelkamp & Weinstein, 1942).

İlk hayvansal AMP, tavşan lökositlerinden elde edilen *defensin* olup daha sonraki yıllarda *bombinin* ve inek sütünden *laktoferrin* peptitleri keşfedilmiştir (Bahar & Ren, 2013).

AMP' lerin etki mekanizması bakteri membran yapısına girerek yapısal hasara neden olması şeklindedir. Memelilerde AMP' lerin kaynağı organizmanın ilk savunma bariyerleri olan dolaşımdaki fagositik lökositler ve yine immunolojik mekanizmada yer alan deri ve mukozal yüzeylerdeki epitel hücreleridir. Bu yapılarda depolanan en

önemli AMP' ler *defensin* ve *katelisidin* aileleri bünyesinde olan peptitlerdir (Herasimenka et al., 2005).

İnsan vücudunda bakterilerin ilk giriş yeri olan deri yüzeyinde, ter bezleri aracılığıyla psoriasin, dermcidin ve laktoferrin önemli AMP' lerden olup sürekli olarak salgılanarak patojenlerin vücuda girişi engellenmektedir. Ayrıca diğer bir AMP olan katelisidin-37 ise patojen varlığının tespitinden sonra salgılanarak yine bir bariyer görevi üstlenmektedir. Katelesidinler nötrofil granüllerinde öncü olarak depo şeklinde bulunarak ihtiyaç halinde aktifleşmektedir (Mwangi et al., 2019).

AMP' ler 4 sınıfa ayrılır. Bunlar; disülfid köprülü β peptitler, amfipatik yapılı α - sarmal peptitler, uzatılmış peptitler ve halkalı peptitlerdir. Doğadaki AMP' ler farklı yapılara sahip olmalarına rağmen ortak özellikleri, katyonik yüklü olup, 3 boyutlu katlanma şekillerine göre amfipatik yapıdadırlar. Katyonik yüklü olmaları negatif yüklü olan bakteri zar yapıları ile olan etkileşimleri sayesinde öldürme mekanizmalarını açıklamaktadır (Campos et al., 2004).

α -sarmal AMP' ler biyolojik bir zar yapı ile etkileşime girdiklerinde amfipatik yapıya dönüşürler. Bu özelliklerinden dolayı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip bir gruptur. İnsanlar için önemli olan katelisidinler de bu grup içerisinde yer almaktadırlar (Mwangi et al., 2019). Katelisidinler insanlarda doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olarak görev almaktadır (Kościuczuk et al., 2012).

β -peptitler büyük bir grup olup, birçok organizma tarafından üretilabilmektedir. α -peptitlerden farklı olarak disülfüt bağları oluşturan sistein kalıntılarına sahiptirler. Bakterilerin plazma zar yapılarını bozarak öldürmektedir (Kumar et al., 2018). Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler ile mantarlara karşı etkili bir diğer önemli AMP olan defensinler bu grupta yer almaktadır. Ayrıca diğer önemli üyeleri protegrin ve taşıplesindir (Panteleev et al., 2015).

Üçüncü sınıf olan uzatılmış peptitler sınıfı diğer iki gruptan farkı çoğunlukla arginin, prolin veya triptofan gibi spesifik aminoasit kalıntılarına yapılarında bulundurmalarıdır (Mahlapuu et al., 2016). Gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olup bakteri membran yapısını bozarak öldürme özelliğine sahip peptitlerdir. Bu gruptaki önemli AMP' ler; sıgırlarda bulunan indolisidin, tritripticin ve insan tükürük bileşiminde bulunan histatinidir (Mwangi et al., 2019).

Akreplerde ilk saflaştırılan AMP' ler; *Hadrurus aztecus* türü akrebin venomundan elde edilen *Hadrurin* ve *Pandinus imperator* türü akrebin venomundan elde edilen *Pandininler* peptitleridir (Zerouti et al., 2021).

Günümüzde AMP' lerden sentetik olarak üretilen ve terapötik olarak kullanılan antibiyotiklere *Kolistin*, *Dalbavansin*, *Daptomisin*, *Teikoplanin*, *Vankomisin* örnek verilebilir (Asif et al., 2024).

1.3. Nanopartiküler ve Yapıları

Nanopartiküller 1-100 nm büyüklüğünde, farklı moleküler şekillere (küresel, silindirik, konik, boru şeklinde) sahip olan yapılardır. Karbon, metal, metal oksit veya organik maddelerden sentezlenmektedirler (Ealia & Saravanakumar, 2017). Günümüzde özellikle sağlık alanında ilaç taşıyıcısı olarak araştırmalarda oldukça geniş bir yelpazeye sahip polimerlerdir (Emel Uyanıkgil & Salmanoğlu, 2020).

Partikül büyüklüğüne göre içerisine birden fazla molekül konularak bu ilaçların taşınabilmesi, hem hidrofobik hem de hidrofilik materyallerin yüklenebilmesi, kontrollü salınım sağlayabilmeleri gibi birçok avantaj sağlamaktadırlar (Gelperina et al., 2005).

Nanopartiküllerin ilaçlar için taşıyıcı olarak kullanılmasındaki amaç; istenen bölgeye ilacın ulaştırılmasının ve sonucunda lokal olarak ilaç konsantrasyonunun artırılmasının sağlanması, ilacın klerensini azaltarak uygulanan ilacın yarılanma süresinin arttırılması, vücutta ilaç geçişinin zor olduğu bölgelerden (kan-beyin bariyeri gibi) ilaçların geçmesini sağlamaktır.

Tablo 4' de yapısındaki kimyasal maddelere göre nanopartikül ajanların sınıflandırılması gösterilmiştir (Emel Uyanıkgil & Salmanoğlu, 2020).

Tablo 4. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Karbon bazlı nanomateriyaller	İnorganik bazlı nanomateriyaller	Organik bazlı nanomateriyaller	Kompozit bazlı nanomateriyaller
Fullerenler (C60) Karbon nanotüpler (CNT) Karbon nanofiberler Grafen (Gr)	Altın Gümüş Titanyum dioksit Çinko oksit Demir oksit Kuantum noktalar	Dendrimerler Miseller Lipozomlar Polimer nanopartiküller	Kitosan Polilaktik asit Hidroksi etil metakrilat

1.3.1. Kitosan Nanopartikül

$\beta(1,4)$ -2-amino-2-deoksi- β -D-glukan yapısına sahip bir polimerdir (Galindo-Rodriguez et al., 2005). β -1-4 bağı ile bağlı D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin polisakkaritlerinden oluşmaktadır. Kitinden üretilmiştir. Polikatyonik yapısı suda kolay çözünme ve negatif yüzeyle (mukozal membranlar gibi) bağlanabilme özelliği sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde kitosan, polar ilaçların epitelyal yüzeyle kolayca bağlanmasını sağlamaktadır. Doğal glikozaminoglikanlarla yapısal olarak benzerliklerinden dolayı toksisiteyi oldukça az ve biyouyumlulukları yüksektir (Mikušová & Mikuš, 2021). Asidik ortamda (hidroklorik asit, asetik asit ve glutamik asit gibi) organik ve inorganik asitlerle reaksiyona girerek çözünebilirler (Ghoorban et al., 2013).

Yapılarında katyonik yapısına ek olarak amino ve hidroksil gruplarında dokulara yapışmayı sağlamaktadır. Bundan dolayı vücutta kalış süresi uzamakta ve terapötik etkinliği arttırmasına neden olur (Xia et al., 2024). Ayrıca yapısındaki hidrofilik gruplar sayesinde zayıf geçirgenliğe sahip ilaçların dokulara geçişlerinde sağlamaktadırlar (Park et al., 2021). Teknolojik gelişmeler ışığında insan vücudunda kitosan nanopartikülünün bölgesel olarak farklı fiziksel ve kimyasal özellikler gösterdiği tespit edilmiştir. Bu özelliği kullanılarak birden fazla ilacın aynı anda istenilen yere taşınması sağlanabilmektedir (Xia et al., 2024).

Kitosan molekülünün lizozim, pepsin gibi enzimlerle parçalandığı, oluşan yan ürünlerin herhangi bir toksik yapıda olmadığı ve canlı organizma tarafından tamamen emilebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca antikoagulan özellikte olup asitlere de dirençli bir yapısı bulunmaktadır. Bu özelliklere sahip olmasından dolayı ilaç taşıyıcı olarak uygulama sahası bulmuştur (Huang et al., 2017).

Diğer doğal polimerler ile karşılaştırıldığında daha fazla pozitif yüke sahip olduğu görülmektedir. Bundan dolayı ilaç dağılım sistemlerinde tercih edilmektedirler (Ghoorban et al., 2013).

İyonik çapraz bağ oluşturabilme özelliğinden dolayı taşıdığı bileşik ile kararlı bir yapı oluşturur. Uzun süre taşıdığı ilacı serbest bırakabilmektedirler (Jhaveri et al., 2021). Bu özelliklerini hazırlanma aşamasında Tripolifosfat (TPP) solüsyonu ile oluşturdukları çapraz reaksiyon ile daha kararlı yapılara dönüşmelerinde görmekteyiz. Bunu TPP' nin anyonik yapıda, kitosanın ise katyonik yapıda olmasından dolayı kolloidal bir bileşik oluştururlar (Pan et al., 2002).

Eklenen ilaçlar ile gastrointestinal sistemden ilaçların kontrollü bir şekilde geçişlerine olanak sağlamaktadırlar. Bu mukoadesyon özelliklerinden dolayı akciğerlerde de aynı şekilde yapışma ve kontrollü olarak ilaç salınımını sağlamaktadırlar (Jhaveri et al., 2021).

Yapılan *in vivo* çalışmalarda 14 saat sonunda idrar ile atıldığı ve kitosan nanoparçacıkların vücutta birikim yapmadığı gösterilmiştir (Hu et al., 2013).

Çeşitli yöntemlerle kitosan nanopartikül sentezleme işlemi yapılabilmektedir. Çözücüde buharlaştırma, emülsiyon, iyonotropik jelasyon, ters misel, sprey drying gibi yöntemler günümüzde sıklıkla uygulanana yöntemlerdir. Bunlar arasında en sık uygulanan yöntem iyonotropik jelasyon yöntemidir. Bu yöntem kitosan yapısındaki amino grupları ile negatif yüklü TPP ile birleştirilmesi esasına dayanmaktadır (Kiaie et al., 2016).

Kitosanın antimikrobiyal özellikleri vardır. Yapısında bulunan pozitif yüklü amin grupları sayesinde bakteri hücre duvarının negatif yükü ile etkileşime girerek hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı kolonizasyonu engelleyebilmektedir (Alqahtani et al., 2020; Jhaveri et al., 2021).

1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

1960 yılında tespit edilen *Salmonella*, *Shigella* ve *Escherichia* bakteri suşlarında belirlenen antimikrobiyal direnç, ilk başlarda hafif enfeksiyon diye tanımlanırken, 1970' li yıllarda *N. gonorrhoeae* ve *H.influenzae* bakterilerinin ampisiline olan direnci tespit edilmesiyle olayın ciddiyeti gelişmiş ülkelere anlaşılmıştır. Bu dönemlerden günümüze, antibiyotiklerin reçetesiz olarak yaygın ve fazla miktarlarda tüketilmesi, ayrıca insan-hayvan-çevre üçgenindeki antibiyotik kalıntılarının giderek artması dirençli bakterilerin insidanslarında orantılı olarak artış göstermiştir. Aslında bakterilerin bu mekanizmaları oluşturmalarının esas amaçları hayatta kalabilmek içindir (Aslam et al., 2018).

Bu hayatta kalabilme savaşında mikroorganizmalar farklı farklı yollar geliştirmişlerdir. İlaç giriş ve dağılımının inhibisyonu, hedef bölge değişikliği, antimikrobiyal etkinliğinin bozulması amacıyla enzim üretimi gibi yöntemleri kullanarak ve mutasyonlar geçirerek daha güçlü hale gelebilmektedirler (Aslam et al., 2018).

Bakteriler genetik olarak direnç mekanizmalarını iki yoldan kazanırlar: kromozomal mutasyonlar ve plazmitler gibi gen paketlerini taşıyan serbest yapıların horizontal olarak aktarılması. Burada plazmitler kilit rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki yatan hastaların bağırsak florasındaki patojenler ile nozokomiyal patojenler arasında plazmit aracılı gen transferleri nedeniyle mutant bakteriler oluşturabilmektedirler. Özellikle hastanede yatan hastalarda yüksek antibiyotik uygulamasına bağlı olarak, bakteriler üzerinde oluşturulan baskıdan dolayı antibiyotiklere direnç kazanması için uyarılmalarına neden olmaktadır (San Millan, 2018).

Bakterilerin direnç mekanizmaları kabaca ikiye ayrılmaktadır; intrinsik direnç ve edinsel direnç. İntrinsik dirençte antibiyotik için bakteri üzerinde hedef bölge bulunmamaktadır. Örneğin; *Mycoplasma spp.* bakteri suşlarında hücre duvarı olmadığından dolayı hücre duvarına etkili β -lactam ve glikopeptit grubu antibiyotikler işlevsizdir (Schwarz et al., 2005). Edinsel direnç 3 farklı mekanizma ile faaliyet göstermektedir. Bunlar; *i-*) enzimlerin modifikasyonu, *ii-*) antimikrobisallerin hücre içi birikimlerinin engellenmesi, *iii-*) hedef bölge değişikliği şeklinde sıralanmaktadır (Abushaheen et al., 2020).

i-) *Enzimatik modifikasyon*; bakteri enzimlerinin yapısındaki asetil, adenil veya fosfat gruplarının antibiyotiklerin kimyasal yapısına eklenmesi ve bundan dolayı antibiyotiklerin etki mekanizmalarını bozulmasına neden olmaktadır. En sık *aminoglikozidlerin* fosforilasyonu, adenilasyonun veya asetilasyona uğramasında görmekteyiz (Ramirez & Tolmasky, 2010).

ii-) *Antibiyotiklerin hücre içi birikiminin engellenmesi*; efluks pompasının aşırı ekspirasyonu veya azaltılmış efluks mekanizmaları ile antibakteriyellerin bakteri hücrelerinde birikimi engellenerek bakterinin hayatta kalması sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu mekanizmanın ana bileşenini dış zar proteini olan porinler üslenirler. Burada şekillendirilen genlerin regülasyonu, modifikasyonu sayesinde geçirgenlikte değişikliğe neden olmakta ve antibiyotiklerin bakteri içerisine girmesini engelleyen bir bariyer olmaktadır (Schwarz et al., 2005).

iii-) *Hedef bölge değişikliği*; en sık *florokinolonlarda* rastlamaktayız. Bakteri DNA girazdaki mutasyonlar sonucu bu antibiyotiğe karşı direnç oluşur. *Sulfanamidlerde* ise şekillenen dirençte, yine hedef bölge değişikliği mekanizması ile dihidropteroat sentetaz enziminin etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır (Schwarz et al., 2005).

2008 yılında Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC ve ECDC) antibiyotik dirençlerini mikroorganizmaların fenotipik yapılarına göre sınıflandırmıştır. Buna göre multidrug resisten, (MDR) yaygın ilaca dirençli (XDR, extended-resistance), sınırlı duyarlı (PDR, pan-resistan) diye üçe ayrılmıştır.

MDR, 3 antimikrobiyal kategoride bir veya daha fazla antibiyotik ajanına duyarlılığı tarif etmekte olup çoklu ilaç direncini tanımlamaktadır. Ancak genellikle dirençli mikroorganizmalar sadece bir antimikrobiyal ajana dirençli olmayıp daha fazla ajana çapraz direnç gösterebilmektedirler. PDR; kolistin, tigesiklin ve aminoglikozitler hariç tüm gruplara direnci tanımlamaktadır (Tünay et al., 2012). XDR; aşırı ilaç direnci, yaygın ilaç direnci gibi tanımlamalar yapılmaktadır. Hemen hemen tüm antibiyotik gruplarına dirençlidirler. İlk başlarda *Mycobacterium tuberculosis* için kullanılmıştır (XDR-TB). Bu tanım *izoniazid* ve *rifampin* yanında *florokinolon*, *aminoglikozidler*, *polipeptitler*, *tiyomidler*, *sikloserinler* ve

paraaminosalisilik asit gruplarından en az üçüne dirençli *M. tuberculosis* için kullanılmıştır (Bassetti et al., 2020; Magiorakos et al., 2012).

2018 yılında Gram negatif bakterileri kapsayan yeni tanım olan *tedavi edilmesi zor direnç* (DTR, difficult-to-treat resisten) ortaya atılmıştır. DTR' ler özellikle toplum ve hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarında hızla yaygınlaşmakta ve kontrol edilmesi zorunlu hale geldikleri bildirilmiştir (Bassetti et al., 2020).

1.5. Nozokomiyal Enfeksiyonlar Hakkında Genel Bilgiler

Hastaneye yatış sırasında enfekte olmayıp yatıştan 48 saat sonra veya taburcu olduktan sonraki 30 gün içerisinde oluşan enfeksiyonlara Sağlık Hizmetleri İlişkili Enfeksiyonlar veya Nozokomiyal Enfeksiyonlar denilmektedir (Revelas, 2012).

Tarihçesine bakıldığında nozokomiyal enfeksiyonları ilk olarak tespit eden Ignaz Phillip Semmelweis olarak kabul edilir. 1847 yılında çalışmakta olduğu doğum hastanesinde yatmakta olan yeni doğum yapmış hastalarda yayılan sepsis vakaları üzerine yaptığı incelemeler sonucu tespit etmiştir. Uzman doktorlar ve tıp öğrencilerin baktığı hastaların ebelerin ilgilendiği hastalara göre ölüm oranları yüksek olması ve o sırada bir patoloğun yine puerperal sepsisten dolayı ölen kişiye yaptığı otopsi sırasında eline neşteri batırmasıyla yine sepsisten dolayı ölmesinden şüphelenmesi üzerine yapılan incelemelerde etkenlerin aynı olduğunu tespit etmiştir. Ancak bu teori o dönemde reddedilmiştir. 1890 yılında *Koch pustulası* olayın mikroorganizma ilişkili olduğunu desteklemiş olup, teori kabul görmüştür (Haque et al., 2018).

Semmelweis dönemindeki hastane enfeksiyon etkeni A grubu *Streptokoklar* iken 1970 yılından itibaren *Pseudomonas* ve *Enterobacteriaceae* patojenlerinin nozokomiyal enfeksiyon oluşturma insidenslerinde artış olmuştur. 1990 yılından itibaren birkaç antibiyotiğe mikroorganizmaların direnç geliştirmeye başladığı fark edilmiştir. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli *Enterokoklar* görülmeye başlanmıştır (Revelas, 2012).

En sık görülen enfeksiyon türleri 4 ana gruba ayrılır: kan dolaşım enfeksiyonları, kateter ile ilişkili üriner sistem enfeksiyonları, cerrahi alan enfeksiyonları, ventilatör ilişkili pnömoni enfeksiyonlar. Katater veya şant uygulamaları ve uzun süre kullanımı enfeksiyon riskini arttıran durumların başında gelmektedir. Cerrahi girişimler sonucu oluşan kesiler patojenlerin bu bölgelerden

vücuda giriş kapıları oluşturmaları açısından yine önem arz etmektedir. Ayrıca personel ve ortam dezenfeksiyonu ile sterilizasyonundaki yetersizlikler bu enfeksiyonların yayılımında yine önemli faktörler arasında yer almaktadır (Khan et al., 2017).

Nozokomiyal enfeksiyonların en sık karşılaşılan ve en hızlı yayılan türü ventilatör ilişkili enfeksiyonlardır. Hem hasta odasının hava sirkülasyonu hem de ortamda bulunan ve temas edilen malzemeler açısından patojenlerin kontaminasyonu ve hastalık prevalansı ile doğrudan ilgilidir. Dünya Sağlık Örgütü' ne (WHO) göre havada asılı bakteri miktarı ≤ 180 cfu/m³ ise hastalık oluşturma derecesi düşük, 700-1800 cfu/m³ aralığında bulaş riski yüksek kabul edilmektedir (Chen et al., 2020).

HAI' nin verilerine göre 2015 yılında nozokomiyal enfeksiyonlar arasında %21,8 ile en sık pnömonilerin olduğu bildirilmiştir. Sırayla bunu deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (skin and soft tissue infection, SSI) (%21,8), gastrointestinal (%17,1), üriner sistem (12,9), kan dolaşım enfeksiyonları (%9,9) izlemiştir. Mikroorganizmalar açısından enfeksiyon etkeni en fazla etken bakteriler bunu mantarlar ve virüsler takip etmektedir (Sikora & Zahra, 2022).

Nozokomiyal enfeksiyona neden olan bakteriler ekzojen kaynaklı olabildiği gibi endojen kaynaklı da olabilmektedirler. Özellikle fırsatçı patojenler immun sistemdeki diğer hastalıklara bağlı olarak veya uygulanan girişimler nedeniyle baskılanması sonucu konakta enfeksiyon riskini artırır (Sikora & Zahra, 2022). Örneğin kan beyin bariyeri kan yoluyla merkezi sinir sistemine gelebilecek çeşitli mikroorganizmalara karşı korurken, kafatası ve leptomeninksler çevresel olarak gelişebilecek enfeksiyonlara karşı korumaktadır. Ancak bu bölgede oluşabilecek herhangi bir travma, kan-beyin bariyerin yıkımlanması, katater ve şant uygulamaları gibi durumlarda mikroorganizmaların invazyonuna maruz kalabilirler ve nozokomiyal menenjitler oluşmasına neden olurlar. Özellikle bu durumun beyin cerrahi operasyonları sonrasında %0,8-15 arasında görülme sıklığı bildirilmiştir. Nozokomiyal menenjit olaylarında karbapenem dirençli Gram negatif bakteriler %60-70 oranlarında yüksek mortaliteye neden olabilmektedirler (Ayhan et al., 2021).

Yatan hastalarda patojen mikroorganizmalara karşı kullanılan antibiyotikler, bu patojenleri baskılamaya çalışırken diğer taraftan vücut mikroflorasındaki dengeyi bozduğundan dolayı nozokomiyal enfeksiyonlara karşı risk oluşturmaktadırlar

(endojen kolonizasyon). Ekzojen kolonizasyon; damlacık yolu, aerosol yollu ve doğrudan temas ile (sağlık çalışanlarından veya diğer hasta ziyaretçileri vasıtasıyla), kullanılan kontamine aletler aracılığıyla olabilmektedir. Bu duruma en iyi örneklerden birisi; mekanik ventilasyon cihazlarında oluşan veya biriken orofaringeal sekresyonlarla kirlenmeleri ve bunların mikroaspirasyonları nedeniyle şekillenen pnömonilerdir. Diğer bir örnek; nozokomiyal enfeksiyonlar içinde sık gözlenen fakat diğer enfeksiyonlara göre daha az şiddetli seyreden idrar yolu enfeksiyonlarıdır. Buradaki en önemli neden sondaların uzun süre kullanılmasıdır. Burada *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.*, *P.aeruginosa* ve *Candida spp.* mikroorganizmaların invazyonu önemli rol oynamaktadır (Vincent, 2003).

1.6. Nozokomiyal Enfeksiyonlarının Prevalansı

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı' nın 2019 yılında ülkemizde görülen nozokomiyal enfeksiyonların prevalansı Tablo 5' de verilmiştir. Tablo 6' da ESCAPE bakteri grubunda yeralan etkenlerin durumu karşılaştırmalı olarak bildirilmiştir. (URL-2, https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/bulasici-hastaliklar-ve-erken-uyari-db/Dokumanlar/Raporlar/USHIESA_OZET_RAPORU_2022.pdf,22.02.2022)

Tablo 5. Türkiye’ deki nozokomiyal enfeksiyonlarının polikliniklere göre dağılımı

ENFEKSİYON TÜRÜ	ENFEKSİYON SAYISI	HİZ*	DANSİTE**	SEKONDER KDE SAYISI	SEKONDER KDE ORANI‡
Kan Dolaşımı Enfeksiyonu (KDE)	19584	0,25	0,64	-	-
Pnömoni	11118	0,14	0,36	1352	12,2
Üriner Sistem Enfeksiyonu	8751	0,11	0,29	1055	12,1
Cerrahi Alan Enfeksiyonu (CAE)	6722	0,09	0,22	227	3,4
Ventilatör ilişkili Olay (VIO)	3803	0,05	0,12	254	6,7
Cilt-Yumuşak Doku Enfeksiyonu	1613	0,02	0,05	175	10,8
Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonu	969	0,01	0,03	71	7,3
Göz, Kulak, Burun, Boğaz veya Ağız Enfeksiyonu	489	0,01	0,02	2	0,4
Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonu	445	0,01	0,01	64	14,4
Pnömoni Dışında Diğer Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu	415	0,01	0,01	52	12,5
Kardiyovasküler Sistem Enfeksiyonu	120	0,00	0,00	8	6,7
Üreme Sistemi Enfeksiyonu	84	0,00	0,00	1	1,2
Sistemik Enfeksiyon	61	0,00	0,00	0	0,0
Kemik ve Eklem Enfeksiyonu	34	0,00	0,00	2	5,9
TOPLAM	54.208	0,69	1,77	3263	6,0
Hasta Sayısı: 7877049			Hasta Günü: 30.654.601		

*HİZ = (Enfeksiyon sayısı / Hasta sayısı) X 100

** Dansite = (Enfeksiyon sayısı / Hasta günü) X 1000

‡ Sekonder KDE Oranı = (Sekonder KDE sayısı / Enfeksiyon sayısı) X 100

Tablo 6. Türkiye' deki Nozokomiyal enfeksiyonlarında bakteriyel etkenlerinin dağılımı

ETKENLER	TÜM		PNÖMONİ		VİP*		ÜSYE**		KİYE***		KDE****		CAE*****	
	ENFEKSİYONLAR													
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
S.aureus	2.786	5	152	4,4	282	3,4	18	0,9	51	0,7	652	7,5	529	12,7
Klebsiella spp	1.1521	20,7	726	20,8	1.621	19,5	624	32,1	2.270	30,0	1.749	20,2	554	13,3
P. aeruginosa	6.320	11,4	550	15,8	1.550	18,6	158	8,1	1.042	13,8	529	6,1	425	10,2
Acinetobacter spp.	10.267	18,4	1.250	35,8	3.376	40,6	610	3,1	658	8,7	866	10,0	281	6,8

*VİP: Ventilator ilişkili pneumoni

**ÜSYE: Üst solunum yolu enfeksiyonu

***KİYE: Katater ilişkili idrar yolu enfeksiyonu

****KDE: Kan dolaşım enfeksiyonu

*****CAE: Cerrahi alan enfeksiyonu

1.7. Nozokomiyal Enfeksiyonlara En Sık Neden Olan Bakteriler (ESCAPE Bakteriler)

1.7.1. *Klebsiella pneumoniae*

1882 yılında ilk defa Carl Friedlander tarafından pnömoniden ölen hastalardan izole edilmiştir (Bengoechea & Sa Pessoa, 2019). Ciddi enfeksiyonlara neden olabilen patojenlerdendir. Son yıllarda çeşitli mutasyonlar geçirerek yeni virulans özellikleri ve direnç mekanizmaları geliştirerek enfeksiyon oluşturma kabiliyetlerini ve antibiyotiklerin bu patojenlere karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etkinliklerini azaltmıştır. İnsanların gastrointestinal sistemlerinde ve üst solunum yollarında bulunan bu bakterilerin yüksek patojenite özelliği kazanmaları sonucunda, günümüzde terapötik olarak kullanılan mevcut antibiyotikler ile tedavilerinin güçleşmesi ve tehlikeli enfeksiyon ajanlarına dönüşmelerine neden olmuştur. Bu dirençli suşlar yüksek hastalık riski oluşturarak pnömoni, yumuşak doku enfeksiyonları, sepsisemilere neden olabilmektedirler (Mańczyńska et al., 2021).

Çevre şartlarından korunmak için hızlı adapte olabilme kabiliyetine, genomik plasisiteye sahip bakterilerdir. Yüksek plasmit yüküne sahip olması ve DNA yapılarındaki G+C içeriğinin değişkenlik göstermesi ile sağlamaktadırlar (Longo et al., 2019).

Mukoid fenotiplerin yapısında bulunan *rmp* regülatör genleri ekstra kapsüller polisakkarit düzenlenmesini sağladığı için önemli virulans faktörü olarak kabul edilmektedir (Juan et al., 2019). Fagositozdan kaçmayı ve hayatta kalmayı sağladığından dolayı kapsül önemli bir organel olarak kabul edilir (Kuş et al., 2017). Ayrıca diğer Gram negatif bakteriler ile karşılaştırıldıklarında kapsül yapısı daha sağlam olmakla birlikte konak savunma sisteminde yer alan peptitlerin aktivasyonlarını da inhibe etme özelliğinde olduğu bildirilmiştir (Herasimenka et al., 2005).

Ayrıca yine genlerin kontrolünde çalışmakta olan sideroforlar bulunmaktadır. Bu yapı sayesinde küçük moleküllü demir iyonlarına karşı affinite göstermekle birlikte diğer bir virülans faktörüdür. Hipervirulent enfeksiyonlar yapan *K.pneumoniae* suşları sidereforlardan *aerobactin* ve *salmochelin* üretiminin oldukça yoğun olduğu gözlemlenmiştir (Harada et al., 2019). Bahsedilen bu bileşikler bakterinin hem

dokulara tutunmasında hem de dokular arası yayılmada görev aldıkları bildirilmiştir (Ranjbar et al., 2019).



Şekil 6. *K. pneumoniae*

Nozokomiyal bakteriyemilere neden olan *K. pneumoniae* suşlarında yapılan incelemelerde β -laktam ve karbapenem grubu antibiyotiklere karşı dirençli genlere sahip oldukları bilinmektedir (Juan et al., 2019). Ayrıca tetrasiklinler, makrolidler, linkozamidler, florokinolonlar vb. gibi Gram negatif bakterilere karşı sık kullanılan antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Geliştirilen direnç mekanizmaları efflux pompa sistemini ve porinleri kodlayan genler aracılığıyla kontrol edilmektedir (Ranjbar et al., 2019). Buradaki değişimleri yapısındaki genler (*rmp*, *TEM*, *SHV*, *OXA-48*, *NDM*) aracılığıyla gerçekleştirirler (Lev et al., 2018). Genlerdeki değişimler kromozomal veya plazmidler aracılığı ile kodlanmaktadır. Sürekli bu genlerin biriktirilmesiyle (*de novo* mutasyonlar ile) antibiyotiklere aşırı dirençli suşlar (XDR) ortaya çıkmakta ve dünyada bu şekilde salgınlara yıllardır neden olmaya devam etmektedir (Navon-Venezia et al., 2017; Theocharidi et al., 2022).

Her geçen gün farklı mekanizmalarla direnç geliştiren *K. pneumoniae* suşlarının % 61,4 MDR, % 22 XDR ve %1,8 tüm ilaçlara dirençli (pan resistant drug)

olduğu yapılan çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Testing, 2013). *Ampisiline* doğal dirençli olan *Klebsiella spp.* ayrıca yapısındaki *blaSHV-1* genindeki nokta mutasyonlar aracılığıyla *sefuroksim*, *aztreonam* ile 3. ve 4. kuşak *sefalosporinlere* karşı direnç geliştirirler (Magiorakos et al., 2012).

Sağlıklı bireylerde asemptomatik olarak ciltte, bağırsak florasında, ağızda ve burunda taşınabilmektedir. Bundan dolayı bireysel taşıyıcılığa bağlı bulaşma olduğu için hastanelerde, özellikle yeni doğan üniteleri ve bağışıklığı baskılanmış hastaların bulunduğu yoğun bakım birimleri başta olmak üzere risk altındadır. Hastane enfeksiyonu olarak pnömoni, idrar yolu ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilmektedirler. Nozokomiyal enfeksiyonların yanı sıra oluşturabildikleri toplumsal kaynaklı enfeksiyonlara yani hastane dışı bulaş ile de çeşitli enfeksiyonlar oluşturabilirler. Bu toplumsal kökenli enfeksiyonlar pyojenik karaciğer absesinden, pnömoni ve menenjitte kadar ilerleyebilen ağır sonuçlara neden olabilmektedirler (Holt et al., 2015).

1.7.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Gram negatif, aerobik ve çubuk şeklinde non-fermenter basillerdir. En önemli virülans faktörleri; lipopolisakkarit (LPS), flagellum, pili, tip III sekresyon sistemleri, biyofilm, ekzotoksin A, proteazlar, alginat oluşumları sayılabilir (Rocha et al., 2019).

İnsanlardaki ilk kolonizasyon yeri olarak gastrointestinal sistemi tercih eder ve nemli bölgeleri sevdiğinden dolayı perineal bölgeye doğru ilerleme gösterir. Yaşayabilmesi için gerekli olan karbon ve nitrojeni asetat ve amonyaktan sağlayabilmektedir. Sağlam deriye lokalize olamadıkları için sağlıklı bireylerde enfeksiyon oluşturma özellikleri yoktur. Fakat normal bağırsak florasında hastalık oluşturmada bulunabilirler (Pachori et al., 2019).

Kontakt lens ile ilgili ülseratif keratit, özellikle diabetes mellitus gibi hastalıklarda immün sistem baskılanması sonucu oluşan otitis externa, kistik fibrozisli hastalarda kronik sinopulmoner kolonizasyon gibi hastalıklara neden olmaktadır (Driscoll et al., 2007).

P. aeruginosa ile ilgili yukarıda bahsedilen hastalıklardan ayrı olarak en önemli problem nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmalarıdır. Canlı ve cansız yüzeylerde hayatta kalabilmeleri, insanları rezervuar olarak kullanabilmeleri ve tıbbi aletler

aracılığıyla kolaylıkla taşınabilir olmaları sonucunda kolaylıkla yayılabilen bir bakteridir. Bundan dolayı nozokomiyal enfeksiyon çeşitlerinden en sık vantilatör ilişkili pnömoni, kan dolaşım enfeksiyonları ve cerrahi alan enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Moradali et al., 2017).

Aminoglikozitler, kinolonlar ve β -lactamlar başta olmak üzere birçok antibiyotik grubuna direnç kazanmışlardır. Geliştirmiş oldukları intrinsik, adaptif veya kazanılmış mekanizmalar sayesinde antibiyotiklerin etkilerinden korunarak hayatta kalmayı başarabilmektedirler (Pang et al., 2019).

Direnç geliştirme açısından iki mekanizma oldukça önemlidir. Bunlar intrinsik direnç ve kazanılmış direnç. İntrinsik direnç mekanizmaları; dış zar geçirgenliğindeki değişiklikler, effluks sisteminin aşırı ekspirasyonu, antibiyotik inaktive edici enzimlerle oluşmaktadır. Kazanılmış direnci oluşturan unsurlar ise effluks pompası, porinler ve penisilin bağlayıcı proteinler ve enzimlerin yapısında bulunan genlerin mutasyonlardır (Pang et al., 2019).

İntrinsik mekanizmalar; diğer Gram negatif bakterilerin yapısında olduğu gibi bulundurdıkları dış zarları antibiyotiklerin bakterilere geçişi için bir bariyer görevi göstermektedir (Breidenstein et al., 2011). Ayrıca alginat sekresyonu sırasında oluşan biyofilm yapısı da başta antibiyotikler olmak üzere vücut savunma sistemlerinden de kaçmaları için oluşturdıkları önemli bir virulans faktörüdür (Porrás Gómez et al., 2012). Kazanılmış direnç mekanizmaları sayesinde özellikle karbapanemler gibi antibiyotiklere karşı direnç geliştirmişlerdir. Burada kazandıkları direnç genlerinde şekillenen horizontal mutasyonlar sayesinde, oluşturdıkları savunma sistemleridir (Sanz-García et al., 2018).

AmpC tipi sefalosporinidaz etkinliği ile antibiyotik inaktivasyonu; efflux sistemlerini kullanarak birçok grup antibiyotiğin bakteri içerisine girişlerin engellenerek etkin olamamasını sağlamak; DNA giraz (*gyrA* ve *gyr B*) ve topoizomera IV (*parC* ve *parE*)' leri sayesinde florokinolonlarda ve LPS modifikasyonu ile de kolitsin antibiyotiklerine karşı hedef bölge değişikliği yaparak etkisiz hale getirmesi *P. aeruginosa* 'nın direnç mekanizmalarıdır. Ayrıca mobil genetik elemanlarıyla kazandıkları *TEM*, *SHV*, *CTX-M* genetik materyallerle β -laktam grubu antibiyotiklere ve karbapanemlere karşı direnç kazanarak hayatta kalmayı başarabilmektedirler. Bu özelliklerinden dolayı sıklıkla bu etkene bağlı gözlemlenen

dirençler MDR olarak tespit edilmiştir. MDR görülen vakalarda yapılan kohort çalışmalarında mortalite oranının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Basseti et al., 2018).

P. aeruginosa en sık yoğun bakım servislerinde nozokomiyal enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bunun nedeni fazla miktarda antibiyotik kullanılması, bu serviste yatan hastaların immun sistemlerinin zayıf olması ile mekanik ventilasyon, mesane kateterleri ve şant (santral venöz kateterizasyon) uygulamaları gibi invaziv işlemlere maruziyet ve bu işlemler sırasında medikal malzemelerin uzun süreli kullanımından kaynaklandığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Pachori et al., 2019).

2016-2017 yılları arasında yapılan bildiride nozokomiyal enfeksiyonlar arasında 28 Avrupa ülkesinde %7,1 oran ile en sık görülen patojen olarak raporlanmıştır (Suetens et al., 2018). *P.aeruginosa*'nın, ECDC 2020 yılında yayınlanan verilere göre en çok direnç geliştirdiği antibiyotik grupları; *karbapenemler*, *florokinolonlar*, *seftazidim*, *piperasilin-tazobaktam* ve *aminoglikozitler*dir. *P. aeruginosa* suşları bunların %30,1' i en az birine, %17,3' ü ise en az iki ve daha fazlasına direnç geliştirmiştir (Karruli et al., 2023).

1.7.3. *Acinetobacter baumannii*

Gram negatif kokobasil bir mikroorganizma olan *Acinetobacter spp.* suşuna ait 65 adet alt türü olduğu tespit edilmiş olup içlerinde en sık hastalık etkeni ve en patojen olanı *A. baumannii*'dir. Ayrıca aerobik olup, nonfermentatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif olan fırsatçı bir mikroorganizmadır (Al Atrouni et al., 2016; Sarshar et al., 2021). Flagellaları olmadığından hareketsizdirler, fakat yapılarında bulunan tip IV pilileri aracılığıyla uzatma geri çekme şeklinde yapıp seğirme denilen hareket ile ilerleme göstermektedir (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020).

Acinetobacter spp. diğer suşları nonpatojen olup çevresel etkindirler. Nemli ortamda bulunurlar. Nemli ve sulak topraklı alanlar, su arıtma tesisleri yaşamak için tercih ettikleri bölgelerdir (Al Atrouni et al., 2016; Wong et al., 2017). Yapılan bazı çalışmalarda ördek, güvercin, tavuk, tavşan, kedi, köpekten izole edilmiş olup, bu hayvanların taşıyıcı oldukları gösterilmiştir (Al Atrouni et al., 2016).

Biyofilm oluşturabilmeleri en önemli virulans özellikleridir. Bu sayede antibiyotiklerden kaçabilmektedirler. Ayrıca bu özellikleri sayesinde yüzeylere

tutunarak kolaylıkla yayılmalarını sağlamaktadır (Jaisankar et al., 2020). Abiyotik yüzeylerde yapışma sonrasında oluşturduğu biyofilm piluslar ve *BAP* yüzey adezyon proteini üretimi sayesinde olmaktadır (Gaddy & Actis, 2009). Bu bakterinin MDR suşları, epitel hücreye yapışabilme kabiliyetlerini taşıdıkları *bla_{PER-1}* β -laktamaz geni ile ilişkilidir. Ayrıca aminoglikozid grubu antibiyotik kullanımının *A. baumannii* enfeksiyon riskini arttırdığı bildirilmiştir (Rodríguez-Baño et al., 2008). Düşük terapötik dozlarda kullanılan antibiyotiklerin de biyofilm oluşumunu indüklemektedir (Kaplan, 2011).

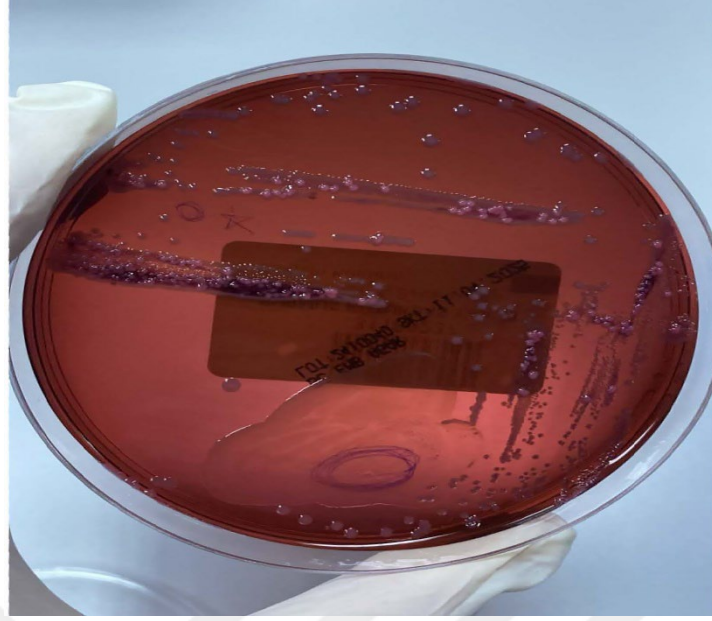
Diğer önemli bir virülans faktörü de dış membran proteinleridir. Bunların en önemlisi *OmpA* adı verilen dış zar proteinidir. Bu protein özellikle hücreye invazyondan ve hücrenin apoptoza uğramasından sorumlu tutulmaktadır. *OmpA* sayesinde bakteri konak fibronektinini kullanarak epitele tutunmayı sağlamaktadır (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020).

İnsan vücudunun önemli savunma sistemlerinden olan NOD1/NOD2, nitrik oksit ve makrofajlar tarafından kullanılan otofaji gibi mekanizmaları inhibe etme gücüne sahip oldukları çeşitli araştırmalarda kanıtlanmıştır (Rubio et al., 2022).

Biyofilm oluşturarak yayılabilmesinin en önemli sonucu nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmasıdır. Bu şekilde endemik salgınlara dahi neden olabilmektedirler (Jaisankar et al., 2020).

Nozokomiyal enfeksiyona neden olan ve yaygın olarak çevrede bulunan bir bakteridir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden olabilmektedirler (Artuso et al., 2022). 27.02.2017 yılında DSÖ tarafından “Acilen Yeni Antibiyotiklere İhtiyaç Olan Bakteriler Listesi” yayımlanmış olan listede kritik öncelikli bakteri grubunda yer almaktadır (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020).

Nozokomiyal enfeksiyonlar arasında ventilatör ile ilişkili pnömoniler de en sık sorumlu olduğu kabul edilen bir patojendir (Pang et al., 2019).



Şekil 7. *A. baumannii* (yoğun bakım hastasından alınan örnek)

Antibiyotiklere karşı dirençte çok farklı mekanizmalar geliştiren *A. baumannii* bunu antibiyotiklerin etkisini azaltan enzimlerin üretimi, hedef değiştirme, membran geçirgenliğini değiştirme, biyofilm oluşturma ve membran efflüks sisteminin aşırı ekspirasyonunu sağlayarak gerçekleştirmektedirler (Gordon & Wareham, 2010).

A. baumannii'nin çok dirençli bir bakteri olmasının en önemli nedeni genomunda dirençten sorumlu 45 gen adasının bulunmasından kaynaklanmaktadır (Adams et al., 2008). Özellikle *Karbapenem* direncinden esas sorumlu genom *OXA* (*oksasilin*) olarak bildirilmiştir. *OXA-51* sadece bu patojende varlığı bildirilmiş olup β -laktamaz sentezinde kullanılan bir genomdur (Perez et al., 2007).

A.baumannii *Tetrasiklin*, *Kloramfenikol*, *Aminoglikozid* direncini efflüks pompasının aşırı ekspirasyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir (Vila et al., 2007).

AmpC *Sefaloproteinazları*, *KPC* *serin karbapenamazları* ve *Metalolactamazlar* aracılığı ile gen aktarımı nedeni ile oluşturulan antibiyotik direnci transpozonlar vasıtasıyla aktarımı gerçekleştirilmektedir (Yoon et al., 2016).

Düşük dozda antibiyotik uygulanması efflüks pompasının aşırı ekspirasyonu biyofilm oluşumuna katkı sağlayan maddelerin sentezinin ve taşınmasının arttığı gösterilmiştir (He et al., 2015). Ayrıca efflüks pompası aracılığı ile bakteri içerisine

alınan antibiyotiklerin atılması gerçekleşir ve bu sayede hücre içi birikim engellenmiş olur.

Pompadaki genlerin kromozomlar tarafından kodlanır ve burada oluşan nokta mutasyonlar nedeniyle direnç mekanizmasında rol oynarlar. Antibiyotikler arasında bu pompanın en güçlü indükleyicisi olan *tigesiklin* olduğu bildirilmiştir (Lin et al., 2017; Wright et al., 2014).

1.7.4. *Staphylococcus aureus*

1880 yılında Alexander Ogston tarafından ülserli yaraları olan hastalardan alınan numunelerden izole edilmiştir (Sultan et al., 2018).

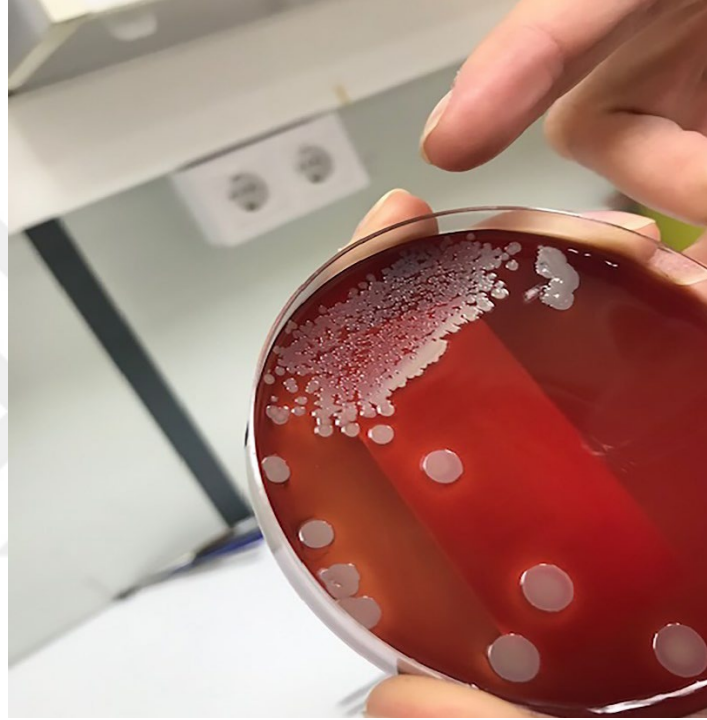
Nozokomiyal enfeksiyonlar arasında ventilatör ilişkili pnömonilere neden olan patojenler arasında *MRSA* %40 oranla en sık enfeksiyona neden olan bakterilerdendir. Ayrıca tedavi edilmesine rağmen vakaların %20 mortaliteye neden olmasıyla oldukça önemli bir enfeksiyon etkenidir (Lacey et al., 2022).

1961 yılında ilk metisiline dirençli oduğunun raporlanmasından itibaren dünyanın birçok yerinde akut veya kronik nozokomiyal salgınlara neden olmuştur (Denis, 2017; Millar et al., 2007).

1950 yıllarında yoğun penisilin kullanımından dolayı antibiyotik dirençli *S.aureus* suşları ortaya çıkmaya başlamıştır. Buradaki direncin nedeni bu bakterilerin penisilinin yapısında bulunan β laktam halkasını hidrolize edebilen penisilinaz enzimini üretebilmelerinden dolayı oluşmuştur (Anuj et al., 2019). 1959 yılında piyasaya çıkan ilk antistafilokokal metisiline direnç 2 yıl sonra ortaya çıktığı raporlanmıştır. Başta olumlu sonuçlar alınmasına karşın Jevons tarafından 1961 yılında direnç genini kodlayan *mecA*'nın *penisilin bağlayıcı protein* (PBP2a) ürettiğini ve izole edildiğini ilan etmiştir (Anuj et al., 2019; Sakoulas & Moellering Jr, 2008). 2000 yılında kullanılmaya başlayan *linezolid* karşı bir yıl sonra *MRSA* suşlarının direnç geliştirdiği ortaya çıkmıştır. 2003 yılında klinik uygulamalara giren *daptomisin* karşı iki yıl sonunda direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Günümüzde direnç geliştirdiği *vankomisin*, kullanılmaya başlamasından yaklaşık 40 yıl sonra bu antibiyotiği karşı da direnç geliştirmeyi başarmıştır. *Vankomisine* ilk direnç tespit edilen vaka 1996 yılında Japonya'da bildirilmiş olup, 2002 yılında *VanA* gen kompleksinin neden olduğu gelişen teknolojinde desteği ile yapılan moleküler

alışmalar sonucunda bulunmuştur (Sakoulas & Moellering Jr, 2008; Stryjewski & Corey, 2014).

S. aureus cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, endokardit, bakteriyemi, pnömoni, osteomyelit, enfektif artrit ve ürener sistem enfeksiyonları gibi bir çok enfeksiyona neden olabilmektedir (Khalili et al., 2010).



şekil 8. *S.aureus*

S. aureus konak dokuda kolonize olmak için hüresel ve extraselüler matrikse yapışmak zorundadır. Yapısında bulunan birçok protein sayesinde hücre yüzeylerini kaplayabilen bir biyofilm oluştururlar. Bu zellik patojenitelerinde oldukça önemli olup yüzeylere yapışmasını ve enfeksiyon oluşturmalarını sağlar. Biyofilm sayesinde opsonizasyon ve fagositozdan da korunmuş olurlar (Mashaly & Badr, 2022).

Ayrıca kendilerini fagositozdan korumak için panton-valentin toksin (PVL) retilirler. Bir sitotoksin olan PVL lökosit, monosit ve makrofajların yıkımına neden olmaktadır. Yapılan alışmalarla PVL pozitif suşların morbidite ve mortaliti ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bundan dolayı toplum kaynaklı *MRSA* enfeksiyonlarında bir belirteç olarak kabul görmektedir (Nichol et al., 2019).

%20 civarında toplumsal nazal taşıyıcılıktan dolayı yayılma imkanı bulmaktadırlar. Bu nedenle *S. aureus* ile mücadeleyi daha zor bir hale getirmektedir (Barcudi et al., 2020). Burun deliklerinin anterior kısımlarında squamöz epitele yerleşim gösterirler. Bu yerleşim özelliğinden dolayı *MRSA* enfeksiyonları çok hızlı bir şekilde yayılabilme özelliğine sahiptir. Özellikle hastane personeli ile taşınımı nedeniyle en sık görülen nozokomiyal enfeksiyon sebeplerindendir (Denis, 2017).

Ayrıca *linezolid*, *daptomisin*, *klorafenikol* gibi antibiyotiklere de direnç geliştirdiği tespit edilmiştir. *Linezolid* direnci 23 S rRNA bölgesinde yer alan gen bölgelerinde şekillenen nokta mutasyonların sonucu olduğu, *kloramfenikol* için plasmid kaynaklı *cfr* geni tanımlanmıştır (Lowy, 2003).



Tablo 7. *S. aureus* en sık karşılaşılan direnç mekanizmaları (Lowy, 2003)

Antibiyotik	Dirençli Gen	Gen bölgesi	Direnç Mekanizması	Lokasyon
β laktam	1.blaZ	β laktamaz	B-laktamın hidrolizi	Pl: Tn
	2.mecA	PBP2a	PBP afinitesinin azalması	C: SCCmec
Glikopeptitler	1.VISA (unknow)	Peptidoglikan değişikliği	Vankomisin hücre duvarından çıkışının engellenmesi	C
	2.	D-Ala-D-Lac	Vankomisin için düşük affiniteli dipeptit sentezi	Pl: Tn
Kinolonlar	1.parC	ParC (GrlA) topoizomera IV komponenti	Enzim DNA bölgesinin kinolon için afinitesini azaltan QRDR bölgesinde mutasyon	C
	2.gyrA gyrB	veya Girazın veya bileşeni gyrA gyrB	Enzim DNA bölgesinin kinolon için afinitesini azaltan QRDR bölgesinde mutasyon	C
Aminoglikozidler (Gentamisin)	Aminoglikozid değiştiren enzim (örn. <i>Aac</i> , <i>aph</i>)	Asetiltransferaz, Fosfotransferaz	Asitleyici ve/veya fosforile edici enzimler aminoglikozitleri değiştirir	Pl, Pl: Tn
Trimetoprim-Sulfonamid (TMP-SMZ)	1.Sulfonamid: <i>sulA</i>	Dihidropteroat sentezi	Enzim tarafından β aminobenzoik asidin aşırı üretimi	C
	2.TMP: <i>dfrB</i>	Dihidrofolat redüktaz (DHFR)	DHFR için afinitenin azalması	C
Kinoprisitin (Q) Dalfoprisitin (D)	1.Q:ermA, ermB, ermC	Ribosomal metilaz	23S ribozomal alt üniteye bağlanmayı azaltır	Pl, C
	2.D: vatA, vatB	Asetiltransferaz	Enzimatik farklılaşma	Pl

S. aureus antibiyotik direnç mekanizmaları; efluks sisteminde değişiklikler (*glikopeptitler*), ilaç hedefinin değiştirilmesi (β -*laktamlar*; *glikopeptitler*; *aminoglikozitler*; *tetrasiklinler* *makrolitler*; *florakinolonlar*), ilacın inaktivasyonu (β -*laktamlar*; *kloramfenikol*) ve aktif ilaç akışı (*tetrasiklinler*) şeklinde gelişmektedir (Vanamala et al., 2021).



2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Şubat 2022 ile Haziran 2023 tarihleri arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı' na ait uygulama laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Araştırmamızla ilgili olarak 24.03.2022 tarih ve 2022/78 numaralı karar ile Girişimsel Olmayan Etik Kurul onayı alınmıştır (Ek 1). İn vivo araştırmamızı gerçekleştirebilmemiz için RTEU Yerel Etik Kurul Başkanlığı' ndan 24.03.2022 tarih ve 2022/04 numaralı karar ile Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı alınmıştır (Ek 2).

Projenin bütçesi RTEU Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü' nün desteği ile gerçekleştirilmiştir. 10.10.2022 tarih ve 2074 sayı ile onaylanmıştır. Projemiz TDK-2022-1380 proje kodu ile araştırmamız için gerekli olan laboratuvar sarf malzemeleri, deney hayvanlarımızın ücretleri ile bakım ve beslenmeleri gibi maliyetler karşılanmıştır.

2.1. Gereçler

Kullanılan cihazlar farklı firmalardan temin edildi. Etüv (Nüve N500), mikrosantrifüj (Beckman coulter), çalkalayıcı benmari (Memmert), inkübatör (WiseCube), 80⁰C derin dondurucu (New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U570), -20⁰C derin dondurucu (Bosch), buzdolabı (Bosch), vorteks (Velp Scientifica), hassas terazi (Ohaus), otomatik pipetler (Rainin), soğutmalı santrifüj (Hettich Rotina 380 R), çalkalamalı inkübatör (IKA 4000i), buz/kar makinası (Scotsman), distile su cihazı (GFL), pastör fırını (Ecocell), otoklav (WiseClave), sınıf II kabin (Mars safety class training institute), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), doku takip cihazı (Shendon Citedel 2000,Thermo Scientefic), doku gömme dispanseri (Leica RM 1150 eg, Leica Biosystems), rotary mikrotom (Leica RM 2525, Lecia Biosystems), otomatik boyayıcı (Leica IHC/ISH, Leica Biosystems), zeta potansiyel (MPT-2 purpose titratör, Malvern®), TEM analizi ve haritalandırma (HT 7800, Hitachi®), HPLC cihazı (SPD-M20A, Shimadzu).

2.1.1. Besiyerleri ve Ayraçlar

Muller Hinton Broth (Sigma-Aldrich), 10% phosphate-buffered formalin (Merck KGaA), ethanol (Merck KGaA), Harris hematoxylin and Eosin G (H&E; Merck KGaA), ksilol (Merck KGaA), parafin (Merck KGaA), diaminobenzidine tetrahydrochloride (LeicaltraviewDAB, Leica Biosystems).

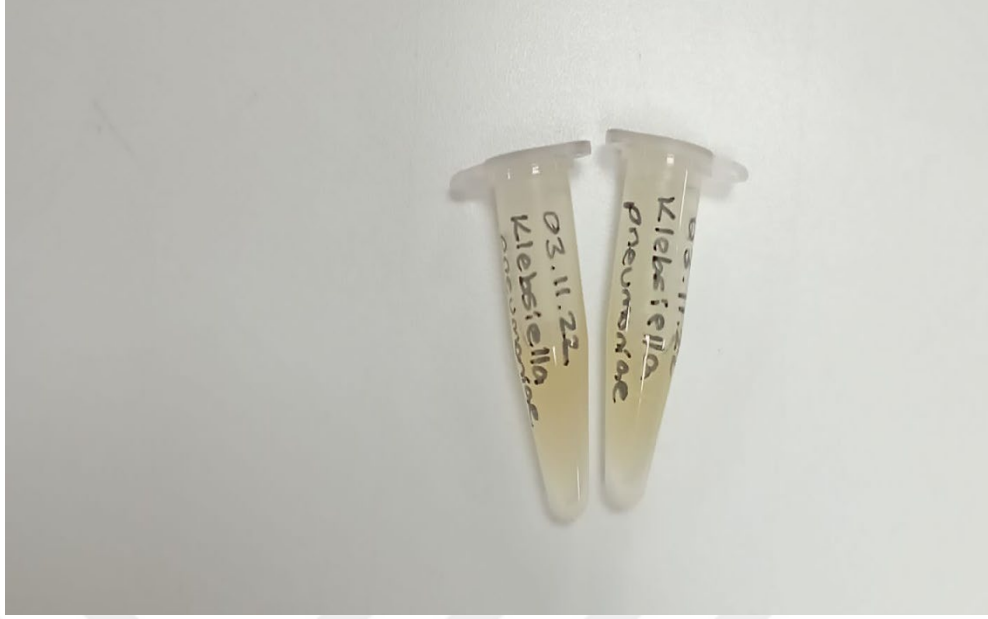
2.1.2. Kullanılan Kitler

MMP-2 (Rabbit polyclonal, ab86607, Abcam), MMP-9 (Rabbit polyclonal, ab76003), MMP-9 sekonder antibody (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), ab205718, Abcam), TNF- α (BT LAB[®], E0764Ra), IL-1 β (BT LAB[®], E0119Ra) ve IL-6 (BT LAB[®], E0135Ra).

2.1.3. Bakterilerin Toplanması

RTEU Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına nozokomiyal enfeksiyon şüphesi ile yatan hastalardan gelen numunelerden bakteri suşları toplanmıştır. Antibiyotik duyarlılık deneyleri *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) rehberine göre diffüzyon disk yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına nakilleri gerçekleştirilen bakteri suşları zenginleştirmek ve saklanmak amacıyla sıvı LB besiyerine ekimleri gerçekleştirildi. 24 saat oda ısısında çalkalamalı inkübatöre konuldu. İnkübasyondan sonra bu numuneler, %20 gliserollü ortamda -80°C' lik derin dondurucuya daha sonra kullanılmak üzere yerleştirildi.



Şekil 9. Hazırlanan stok çözelti

2.1.4. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmesi

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı' na yapmış olduğumuz Hayvan Deneyleri Etik Kurulu başvurumuza istinaden 24.03.2022 tarih ve 2022/04 karar numarası ile izin alınmıştır. Bu çerçevede ratlara yapılan uygulamalarda riayet edilmiş olup tamamen prosedürlere uygun işlemler gerçekleştirilmiştir.

Araştırmamızda RTEU Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi' nde bakım ve beslenmeleri sağlanan 47 adet Sprague-Dawley erkek rat kullanıldı. 6-8 haftalık olan ratların ağırlıkları 175 ± 15 gr olarak ölçülmüştür.

Kontrol grubu 6, zehir grubu 9 ve diğer grupların her biri kafeslere sekizer adet olacak şekilde toplamda 6 adet kafese yerleştirildi. Her bir kafeste bulunan ratlara günlük 4-6 g/100 g canlı ağırlık olacak şekilde serbest şekilde (ad libitum) beslenmeleri ayarlandı. Bu miktarın 3 katı kadar taze su kafeslerde bulundurulmuş ve suları günlük değiştirilmiştir.

Konfor zonlarına uygun olacak şekilde $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, %55-60 arası nem ve 12 saat ışık 12 saat karanlık olacak şekilde ortamları standart halde olması sağlanmıştır.



Şekil 10. Ratların Bakım ve Beslenmesi

2.1.5 Akrelerin Bakım ve Beslenmesi

Şanlıurfa Tektek Dağları'ndan 52 adet *A. crassicauda* ve 38 adet *L. abdullahbayramii* akrep türlerinden toplanmıştır. Toplanan akrelerin uygun şartlarda bakım ve beslenmelerinin sağlanması için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarına nakilleri gerçekleştirildi.



Şekil 11. Akrelerin bakım ve beslenmesi

Merkezde hava delikleri açılmış herbirinde bir akrep olacak şekilde özel kutulara konuldular. Stres şartlarını en aza indirmek amacıyla kutuların içerisine yumurta viyollerinden kesilerek yapılmış, doğal ortamlarında olduğu gibi sürekli saklanabilecekleri yapay barınak konuldu.

Üretilen *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvaları ile iki haftada bir beslenmeleri sağlandı. Su ihtiyaçlarını karşılamak için önlerinde sürekli duran ve günlük yenilenen ufak kaplarda verilmiştir.

2.1.6 Akreplerden Venom Toplanması

Elektrik uyarımı yoluyla akreplere zarar vermeden ayda bir defa olacak şekilde zehirler toplanmıştır.

İki elektrotlu, frekansı ve voltajı ayarlanabilir bir elektrostimülatör (Maksimum Kapasite, 50 V, 10 Hz) aracılığı ile işlem gerçekleştirilmiştir. Cihazdaki elektrotlardan biri akrebin üzerinde herhangi bir yere, diğer elektrot ise akrebin metasomanın 5. segmenti ile telson arasındaki bölgeye konulmak suretiyle 0,2 Hz frekans ve 20 V voltajda elektriksel uyarım verilerek zehirlerin damlalar halinde mikrotüplere toplanması sağlandı.

Total venoma distile su eklenip pipetlenerek karıştırıldı. Daha sonra 4°C de 15 dk 14.000 g hızda santrifüje edildi. Süpernatant kısmı başka bir tüpe pipet yardımıyla aktarıldı. Peptitleri içeren bu kısım vakum kurutucuda kurutulduktan sonra -20°C ayarlı buzdolabına konulmuştur.

2.1.7. Kitosan Sentezi

Ticari olarak alınan kitosan polimerleri TPP solüsyonu ile kararlı hale getirildi. Bunun için %0,1 (w/v) kitosan %1 (v/v) asetik asit şeffaf görünüm elde edinceye kadar çözünmesi sağlandı.

TPP damla damla yavaş bir şekilde solüsyon içerisine eklendi. Kitosan/TPP oranı 2:1 olacak şekilde ayarlandı. 1 saat manyetik karıştırıcı aracılığı ile homojenize edildi. 1 M NaOH kullanılarak pH' sı 4,6-4,8 ayarlandı.

Soğutmalı santrifüj kullanılarak 4°C 5000 rpm, 45 dakika santrifüj işlemi sonrası oluşan süpernatant atılarak pellet 3 kez saf su ile yıkandı. Son olarak -50°C' de kurutma işlemi yapıldı (Açikel, 2020).

2.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

2.2.1. Akrep Venomlarından Antimikrobiyal Peptitlerin Elde Edilmesi

-20°C de muhafaza edilen kurutulmuş halde bulunan venomlar çözünmesi için belirli miktarda distile su ilave edildi ve vorteks cihazı ile homojen hale gelmesine yardımcı olundu. Tam çözünme sağlanması için ise 4°C 14.000 g ve 15 dk santrifüj işlemi yapıldı (Possani et al., 2001).

Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC) yöntemiyle venomların saflaştırılması sağlandı. Çalışmada C18 ters faz analitik kolon kullanılarak hareketli faz akışı 1 ml/dakika olacak şekilde 230 absorbanda 60 dk da ayrıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için hareketli ve doğrusal gradientli iki tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Tampon A; %0,12 su içerisinde triflorasetikasit ve Tampon B; %0,10 trifloroasetik asit asetonitrilde derişimli çözeltileridir. Kolona yüklenen 2 mg çözünür venom ve her fraksiyon ayrı ayrı tüplere alınarak kurutma işlemine tabi tutuldu. Mikrotüplerin kapakları kapalı olarak -20°C de muhafaza edilmek üzere soğutucuya kaldırıldı (Caliskan et al., 2013; Corzo et al., 2001).

0-60 % B tampon çözeltisi olacak şekilde gradient 60 dakika süresince uygulanmıştır. Alınan fraksiyonların ileri saflaştırmalarında gelen peptidin alıkonma süresine göre 10-45 %B veya 20-40 %B olacak şekilde gradient ayarlanmıştır. Ayrıca ileri saflaştırma basamaklarında ters-faz mekanizma ile toplanan fraksiyonlar katyondeğişim kromatografide yeniden ayırma yapılmıştır. Kolon olarak; TSK-gel sulfopropyl kolonu kullanılmış ve çözücü A olarak 1 M asetik asit, çözücü B olarak 2 M amonyum asetat kullanılmıştır. Fraksiyonlar 10-50 %B olacak şekilde dakikada 1,5 ml lik akış hızı ile 40 dakika süresince 230 nm izlenmiş ve doğrusal gradient olarak toplanmıştır (Corzo et al., 2001).

2.2.2. Kitosan Enkapsülasyon Karakterizasyon Analizleri

Kitosan ile kaplamanın karakterizasyonunun incelenmesi amacıyla 4 farklı analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerden; Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu (TEM) (Jeoljem 1220), Frouier-Transform Infra Red Spectrophotometer (FT-IR Spektrometre) (Perkin Elmer Spectrum Two), Mor Ötesi Görünür Işık Spektrometre (UV-NİS) (Perkin Elmar Lambda 750 (çift ışıklı)) Eskişehir Osmangazi

Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM) kurumunda hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü (Zeta Sizer Nano ZSP) ile boyut ve elektriksel potansiyel analizleri üniversitemiz merkez laboratuvarında hizmet alımı şeklinde yapılarak incelenmiştir.

2.2.2.1. Zeta Sizer

Parçacık boyutu analizi PDI değerine göre yapılmaktadır. 0 ile 1 arasında olan değer 0' a yakınsa parçacık homojen dağılmış, 0,5' ten yüksek ise heterojenlik gösterdiğini belirtir (Ghoorban et al., 2013).

Dinamik ışık saçılımı (DLS, dynamic light scattering) mekanizması ile ölçüm gerçekleştirilmektedir. Sulu süspansiyondaki moleküllerin elektroforetik hareketlerine göre algılanır (Naser et al., 2015).

Numuneler analizatörde 25⁰ C de 90 derecede okuma yapıldı (Avadi et al., 2010).

2.2.2.2. UV-NİS

Enkapsülasyon analizi aşağıda bildirilen formül uygulanarak kapsülasyon oranı elde edilmiştir. Optik olarak karakterizasyon analizi yapılmaktadır. Çözeltilerdeki inorganik iyon ve komplekslerin ölçümlerinde kullanılır. Çalışmada konsantrasyon değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

$$\text{İlaç enkapsülasyon verimi (\%)} = \frac{\text{başlangıç ilaç miktarı} - \text{bağlanmayan ilaç miktarı}}{\text{başlangıç ilaç miktarı}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.2.3. TEM Analizi

Nanoparçacıkların bağlanması ve morfolojik karakterizasyonunun kontrolü için görüntüleme ve haritalama işlemi yapılmıştır (Ali et al., 2011).

TEM cihazındaki bakır ızgaralara konularak oda sıcaklığında kurutulduktan sonra ölçüm ve haritalandırılma yapıldı.

2.2.2.4. FT-IR Analizi

Biyolojik materyalin yapısında bulunan organik bileşiklerin tayini KBr pelletleri kullanılarak özel spektrometre aracılığıyla ölçüm gerçekleştirilmiştir (Naser

et al., 2015). 3 ana dalga boyu ölçümünden orta dalga boyu (MIR; 400-4000 cm^{-1}) kızıl ötesi (IR) bölgesinin ölçümü yapılmıştır (KILIÇ & Karahan, 2010).

Burada 1200-3600 cm^{-1} aralığı fonksiyonel grupları, 700-1200 cm^{-1} aralığındaki bölge ise parmak izi bölgesi olarak tanımlanmaktadır (Van de Voort, 1992).

2.2.3. Sitotoksosite Analizi

Sitotoksosite analizi için HeLa hücre hattı kullanılmıştır. HeLa (İnsan Serviks Epiteloid Karsinom Hücresi) hücre hattı Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Şap Enstitüsü tarafından üretilen ve pasajlanan hücre kültürü bankasından dondurulmuş olarak temin edilmiştir. Çalışma aşamasına kadar -80°C de muhafaza edilmiştir.

Bu analizde AcraX fraksiyonun kitosan kaplı formu ile *L. abdullahbayramii* türünün total venomu incelenmiştir.

HeLa hücre hattı %10 FBS (Pan Biotech P-30-1301) içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) içerisinde (2M L-Glutamin ve %1 NEAA içerir) 25 T flaskta günde 2 defa kontrol edilerek %70 ve üzerinde konfluensiye gelmesi beklendi (Doubling Time: 34-40 saat).

96 kuyucuklu mikropatlere 25 T flask içerisinde %70 ve üzerinde konfluensiye gelen hücelere 500 μL Tripsin-EDTA (Gibco, 15400054) eklendi ve 37°C ' de %5 CO_2 ortamında 3-5 dk inkübasyona bırakıldı. Ters tip mikroskop (Zeiss Primovert, Almanya) altında hücrelerin dissosiyeye oldukları gözlemlendiği anda %10 FBS içeren besiyeri eklendi. 300 xg' de 5 dk santrifüj edilerek besiyeri aspire edilip atıldı. Daha sonra 1 ml EMEM besiyeri eklendi. Triptan mavisi (Gibco, 1525061) kullanılarak Logos Luna II cihazında sayım yapıldı. Sitotoksik analizi yapılacak AcraX ve *L. abdullahbayramii* ham venomu kuyucuklara eklendi ve her kuyucuğa 10^4 hücre olacak şekilde %10 FBS' li besiyeri eklendi.

250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.6 μg olarak seri dilüsyon yapılarak 5 farklı konsantrasyonda hücre hatlarının üzerine akrep venomları ekildi. Ayrıca kontrol grubu oluşturuldu. 24 ve 48 saat olarak 2 farklı zaman aralığında okumalar gerçekleştirildi.

Analiz her grup için 3 tekrarlı çalışılmıştır. İnkübasyonun sonunda kuyucuk hacminin %10 kadarı (20 μl) WST-8 solüsyonu eklendi. Hücre kabı alüminyum folyo ile sarılarak 2 saat daha inkübatörde bırakıldı ve süre sonunda hücre kültür kabında

450 ve 630 nm dalga boylarında okuma yapıldı. Çıkan sonuçlar aşağıda bildirilen formül ile değerlendirildi.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{(\text{Deney Kuyucuğu}-\text{Blank})}{(\text{Negatif Kontrol}-\text{Blank})} * 100 \quad (2)$$

2.2.4. *in vitro* Analizler

2.2.4.1. Bakterilerin Hazırlanması

Broth dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. -80⁰ C de bulunan bakteri stokları ilk önce – 20⁰ C’ ye, daha sonra +4⁰ C sıcaklığında kademeli çözünmesi sağlandı. Tüp içerisinde bulunan 3 µL LB besiyeri içerisine öze ucu ile bakterinin ekimi gerçekleştirildi.

Muller Hinton Broth besiyeri (MHB) (Sigma Aldrich®) steril şartlarda firmanın belirttiği protokole uygun olarak 2,1 g toz besiyeri 100 ml distile su ile homojen bir şekilde karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan besiyerinden 3 ml steril tüpe aktarıldı. Üzerine öze ile alınan bakteri inoküle edildi. Bu süspansiyondan 0,1 ml alındı ve üzerine 9,9 ml steril MHB eklenerek 1:100 stok dilüsyon elde edilmiş olundu. Yine bu dilüsyondan 1ml bakteri alınıp ve üzerine 9 ml MHB agar eklendi (Garcia et al., 2013). Her bir bakteri suşu için ayrı ayrı bu işlem gerçekleştirilmiştir.

Her bir bakteri solüsyonu için 0,5 McFarland ayarlanarak, 1-2 10⁸ CFU/mL miktarında bakteri kolonisi olması sağlandı (Garcia et al., 2013).

2.2.4.2. Venomların Hazırlanması

Mikrotüplerde bulunan fraksiyonların her biri 20 µl distile su aracılığıyla sulandırıldı. Vorteks işlemi gerçekleştirilerek, fraksiyonların çözünmesi ve homojen hale gelmesi sağlandı (Garcia et al., 2013).

2.2.4.3. MIC Değerlerinin ve Dozajlamanın Hesaplanması

MIC tespiti için 96 kuyucuklu mikropatlere bakteri, venom ve besiyeri kullanıldı. Seyreltme işlemi ile sırayla %100, %50, %25 ve %12,5 olacak şekilde dilüsyonlar elde edilerek hesaplanmaları gerçekleştirildi.

Herbir venom fraksiyonu için mikropatlerde 4 bakteri suşu için ayrı ayrı 4 seyreltme kuyucuğu, 1 pozitif kontrol ve 1 negatif kontrol grubu olacak şekilde planlandı. Herbir fraksiyon için toplamda 6x4 kuyucuk kullanılmıştır. Toplam derişim 100 µl olacak şekilde ayarlandı.

Bir fraksiyonda bakılacak bir bakteri suşu için; 1. aşama olarak ilk kuyucuğa 172,4 µl diğer 5 kuyucuğa 90 µl MHB besiyeri konuldu. 2. aşama olarak 1. kuyucuğa 7,6 µl venom eklendi. 3. aşama olarak Pipetaj işlemi yapıldıktan sonra 1. kuyucuktan alınan 90 µl numune 2. kuyucuğa, 2. kuyucuktan alınan 90 µl numune 3. kuyucuğa, 3. kuyucuktan alınan numune 90 µl 4. Kuyucuğa, 4. kuyucuktan alınan besiyeri venom karışımı ise dışarıya atılarak seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. 4. aşama olarak venom besiyeri karışımı üzerine her bir kuyucuğa 10 µl incelenecek olan bakteri kültürünün ekimi gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak 5. gruba 90 µl besiyeri ve 10 µl bakteri inokülasyonu gerçekleştirildi. 6. kuyucuk ise negatif kontrol olarak 100 µl besiyeri ekimi gerçekleştirilmiştir. Toplamda herbir kuyucukta derişim 100 µl olacak şekilde hesaplanarak dilüsyonlarımız hazırlanmıştır.

Bu işlem her bir bakteri için iki akrep venomuna ait farklı fraksiyonlarına ayrı ayrı işlem tekrarlanmıştır.

Bu mikropatler 35⁰ C de 12 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra spektrofotometrede 595 absorbans ayarlanarak okuma işlemleri gerçekleştirilerek MIC değerlerinin ölçümleri sağlanmıştır.

MIC değerlerinden *A. crassicauda* venomunun 33-36. dakikalardaki peptitlerin menfi sonucu alınmış olup ayrıntılı olarak incelemek için tekrar 7 fraksiyona saflaştırılmıştır. Yapılan disk diffüzyon antibiyogram yöntemi sonucunda 36,0. dakika fraksiyonu *K.pneumoniae* suşuna karşı olumlu sonuç alınmıştır. Bu fraksiyonun fenotipik inceleme yapılamadığı ve yapısı incelenemediğinden dolayı bu fraksiyona AcraX adı verilmiştir. *L. abdullahbayramii* venom fraksiyonlarının ise bakterilere karşı bir etkileri tespit edilememiştir.

2.2.4.4. Fraksiyonun Kitosan ile Birleştirilmesi

Totalde 60 µg liyofilize hale getirilen kitosan polimeri AcraX ile 1:1 oranında kaplanması sağlanmıştır (Ghoorban et al., 2013).

Literatürde *A. crassicauda* ham venomu için LD₅₀ değeri olan 0,32 mg/kg (Ozkan & Carhan, 2008), *L. abdullahbayramii* venomunun 0,19 mg/kg olduğu belirtilmiştir (Ozkan et al., 2011b). Bu miktarlar venomlar için uygulama dozu olarak çalışmamızda değerlendirilmiştir.

Kitosan ekleme işlemi için 6200 µl stok AcraX sulandırma ile elde edilmiş olup bunlarda kitosan ile birleştirilecek olan (sepsisli ratlara kitosan eklenmiş venom grubu ve kitosanlı venom kontrol grubu) toplamda 10 adet rat için 320 µl venom ve 320 µl kitosan vorteks yardımı ile homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.

2.2.5. *in vivo* Analizler

2.2.5.1. Rat Gruplarında Sepsis Oluşturulması

İn vitro çalışmalar sonucunda *A. crassicauda* peptitleri *K.pneumoniae* suşlarının etkili olduğu tespit edilmesinden dolayı in vivo çalışma bu suş ile devam edilmiştir.

Çalışmamızın optimizasyonu için 6-8 haftalık erkek ratlar seçilmiştir. Bakteri uygulamasından 1 gün önce ratların ağırlıklarına göre gruplandırılmaları ve ayırım işlemleri yapılmıştır. Ratların ortalama ağırlıkları 175 gr ± 15 olarak ölçülmüştür. Ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde gruplara dağıtımları gerçekleştirilmiştir.

Stok bakterilerden %0,9 NaCl' den yararlanılarak McFarland 4' e ayarlanarak 2,5 X 10¹⁰ CFU bakteri elde edilmiştir. 0,25 µl dozda sepsis kontrol grubuna ve diğer venom uygulanacak gruplara intraperitoneal (ip) olarak uygulanmıştır (Kosar et al., 2021).

2.2.5.2. Biyolojik Maddelerden Dozaj Hesaplanması

A. crassicauda fraksiyonlama sonrası protein miktarı 309 µg bulunan 36,0. dakikadaki fraksiyonumuz in vivo çalışmada 3,5 µg/µl dozunda kullanılmıştır.

L. abdullahbayramii venomundan hazırlanan HPLC fraksiyonlarından in vitro etkinlik elde edemediğimizden dolayı çalışmamızın bu kısmında total venom olarak devam edilmiştir. 0,4 µg/µl dozda uygulanmıştır.

2.2.5.3. Biyolojik Maddelerin Uygulanması

İP yolla bakteri enjeksiyonu yapıldıktan 6 saat sonra uygun gruplara venom ve/veya venom+kitosan bileşikleri uygulandı.

Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmamıştır. Sham, zehir grubu olarak belirlenmiş olup sadece zehir uygulaması yapılmıştır. Bu grup A/B/C olarak ayrılarak sırasıyla AcraX fraksiyonu, AcraX fraksiyonunun kitosan ile kaplanmış formu ve *L. abduhbayramii* total venomu uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubuna sepsis oluşturulmuş ve sadece bakteri inoküle edilmiştir. Diğer sepsis gruplarına AcraX, AcraX+Kitosan ve *L. abduhbayramii* ham venom uygulaması gerçekleştirilmiştir.

Venom dozlaması LD₅₀ miktarlarının altında değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda *L. abduhbayramii* akrebinin 0,19 mg/kg (Ozkan et al., 2011a), *A. crassicauda* venomunun ise 0,40 mg/kg (Alajmi et al., 2020) olarak bildirilmiştir. Literatüre uygun olarak; AcraX fraksiyonlarından totaldaki 309 µg peptitten uygulayacağımız miktarın rat başına 40 µg olarak hesaplanmıştır. *L. abduhbayramii* venomundan 1 µg/250 µl olarak uygulanmıştır.

2.2.5.4. Kan, Doku ve Organ Örneklerinin Toplanması

Sakrifikasyon işlemi bakteri enjeksiyonundan 24 saat sonra yapılmış olup, yüksek doz anestezi (xylozin/ketamin hidroklorür kombinasyonu) ile gerçekleştirilmiştir (Zerouti et al., 2019).

Sakrifikasyondan sonra ratlardan alınana akciğer doku örnekleri histopatolojik olarak sepsisin ve venomun etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal analizler için alındı.

Alınan dokular üzerinde kan ve diğer vücut artıklarından arındırılması amacıyla %0,9 NaCl ile yıkandı ve kurutma kâğıdı üzerine neminin alınması amacıyla konuldu. Akciğer dokuları biyokimyasal ve histolojik analizlerde kullanmak için ayrı ayrı etiketlendirilmiş mikrotüplere konulmuştur. Dokular, buz içerisine gömülme suretiyle yerleştirilerek, muhafazaları sakrifikasyon işlemi sonuna kadar sağlanmıştır.

Bu doku ve organlardan preparatlar hazırlanması ve gerekli incelemelerin yapılması için Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesindeki Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı ile Tıbbi Biyokimya Laboratuvarına nakilleri gerçekleştirilmiştir.

Bir kısım dokular biyokimyasal analizler için -80°C' ye alınarak bozulmadan korunması sağlanmıştır.

Jelli, sarı kapaklı vakumlu kan tüplerine alınan ratların kan örnekleri santrifüjde 2000 devirde 10 dk da serumları ayrıştırılmış, etiketlenilmiş mikrotüp tüplerine otomatik pipet yardımıyla transfer edilmiştir. Çalışmamızın gerçekleşeceği zamana kadar -80°C' de korunmuştur.

2.2.6. Biyokimyasal Analizler

Sakrifikasyon sonunda alınan kan örnekleri 10.000 rpm' de 15 dk santrifüje bırakıldı.

TNF- α (BT LAB[®], E0764Ra), IL-1 β (BT LAB[®], E0119Ra) ve IL-6 (BT LAB[®], E0135Ra) biyolojik materyalimizin enfeksiyon ajanına göstermiş olduğu etkiyi ise IL-10 (BT LAB[®], E0108Ra) aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Dokularda enfeksiyon varlığı, venomun dokularda oluşturabileceği hasarların tespiti ve venomun dokular üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla Malodialdehit (MDA) ve Glutatyon peroksidaz (GSH) analizleri yapılmıştır.

GSH hücre içi oksidatif stresin göstergesi olarak bilinmekte ve birçok hastalık varlığında yükselme eğilimindedirler (Lee et al., 2018). Oksidatif stresin diğer bir belirteci olan MDA ise lipid peroksidasyonu aracılığı ile hücre hasarına neden olduğu için belirteç olarak değerlendirilmiştir (Haro Girón et al., 2023).

MDA, GSH ve sitokin analizleri için akciğer dokularına homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Sitokin analizleri ticari olarak alınan Eliza kitleri aracılığıyla ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

MDA, GSH ve sitokin analizleri üçlü tekrar şeklinde çalışılmıştır.

2.2.6.1. Homojenizasyon İşlemi

-80°C de saklanana örnekler sırasıyla -20°C ve daha sonra +4°C' de kademel olarak çözündürüldü.

Akciğer örnekleri tek tek tartılarak 0,1 gr numune için 1000 μ l TPP (Ph: 7,4) ilave edildi. WiseTis[®] marka homojenizasyon cihazı ile dokuların buz içinde homojen

bir şekilde parçalanması sağlandı. 3000 g (RCF) kuvvette 15 dk +4°C de soğutmalı santrifüj santrifüj edildi.

Süpernatant atılarak kalan homojenat mikrotüplere aktarıldı. Homojenizasyon boyunca yapılan bütün işlemler buz içerisinde yapıldı, numuneler soğuk ortamda bekletildi.

2.2.6.2. Oksidasyon Analizleri (GSH ve MDA)

MDA Analizi

Çözelti hazırlanması; %8,1 SDS' den 50 µl, %20 Ph 3,5 olan asetik asitten 375 µl ve TBA 375 µl alınarak solüsyon hazırlandı. 1 saat inkübasyondan sonra 4000 rpm hızda 15 dk santrifüj edildi.

Uygulama; numune 2 kat seyreltme işlemi uygulanmıştır. Bunun için 100 µl numuneye 100 µl tampon çözeltisi eklenmiştir. Spektrometri aracılığı ile 532 nm absorbans da okuma işlemi yapılmıştır (Uchiyama & Mihara, 1978).

GSH Analizi

Çözelti hazırlama;

Taze hazırlanması gereken Elmann çözeltisi %1 sitrattan 10 µl ve 2-nitrobenzoik asitten 0,04 mgr birleştirilip vortekslenerek hazırlandı.

Uygulama;

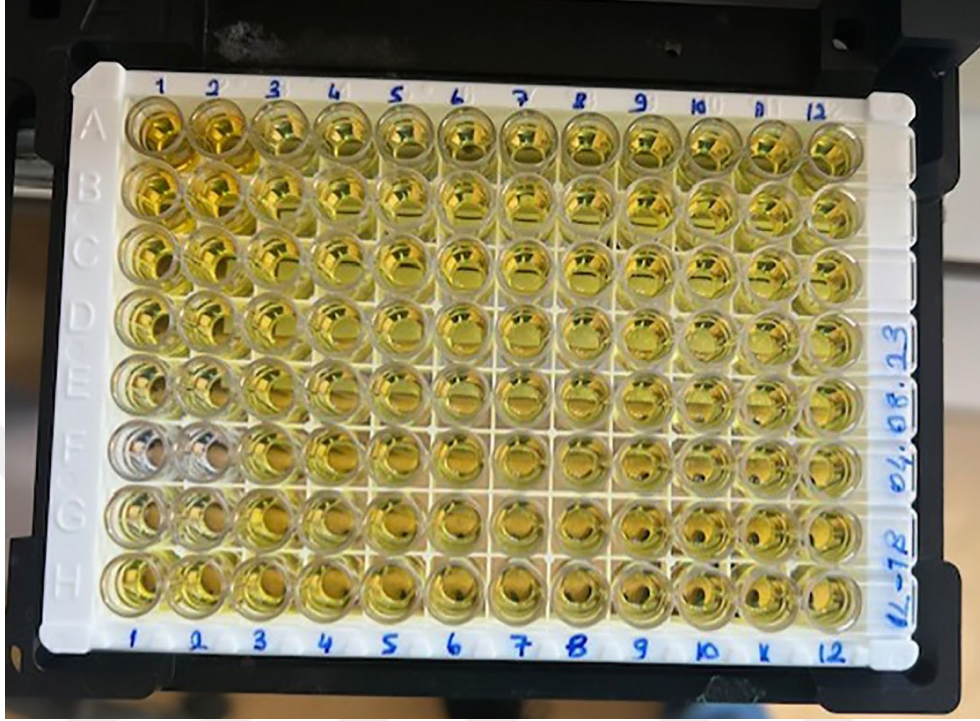
Akciğer dokusu 2 kat seyreltme işlemi uygulandı. Buna göre 100 µl numune ve 100 µl tampon eklendi. Vorteksleme işlemi yapıldıktan sonra spektrometri aracılığı ile 412 nm absorbans da okunma işlemi gerçekleştirilmiştir (Ellman, 1959).

2.2.6.3. Sitokin Analizleri

Sitokin Kitlerinin Uygulanması; Firmanın belirttiği protokole uygun olarak hazırlanıp uygulanmıştır. Tüm kitlerde solüsyonların hazırlanma prosedürü aynı olup, sırasıyla yapılan işlemler:

Stok doku homojenatlar ve kit içerisinde bulunan standart vortekslendi. Standart dilüentten 120 µl ve orijinal standarttan 120 µl alınarak 1.tüpe konuldu ve sırasıyla yapılan işlem sonucunda 5 kat seyreltilmiş oldu. Hazırlanan dilüsyondan 50 µl numuneden 40 µl alınarak mikropate kuyucuklarında pipetleme

işlemi yapıldı. Sadece standart konulan kuyucuk hariç tüm gruplara interlökin çalışılacak kite göre kitle bulunan anti-IL solüsyonundan 10 µl eklendi.



Şekil 12. Elisa Deneyi

Son olarak kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve mikroplatlerin üst kısımları kapatılarak inkübatörde 37°C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

BioTek® marka mikroplat yıkama cihazında 5 defa özel sulandırma ile yıkama işlemi yapıldı. Bu işlemin ardından sadece standart olan kuyucuklar dahil olacak şekilde Substrat A solüsyonundan 50 µl, Substrat B solüsyonundan 50 µl mikroplat kuyucuklara pipetleme işlemi gerçekleştirildi. İnkübatörde 10 37°C' de 10 dk inkübasyon işleminden sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edildi ve mavi olan rengin sarıya dönüştüğü gözlemlendi (Şekil 12). Stop solüsyon eklenmesinden 10 dk içerisinde 450 nm absorban da strektrofotometrede değerlendirilmek üzere yerleştirildi ve OD verilerinin okunması sağlandı.

2.2.7. Histopatolojik Analizler

Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlardan alınan akciğer dokusu 1.5 cm³ hacminde trimlenerek 10% phosphate-buffered formalin (Merck KGAA, Darmstadt, Germany) solusyonunda 24-36 saat boyunca fiksasyon işlemi uygulandı. Fiksasyon işleminin ardından akciğer dokusuna ait numuneler doku takip kasetlerine konuldu. Elde edilen doku takip kasetleri rutin histolojik doku takibi işlemleri için tam otomatik doku takip cihazı kullanılarak (Shendon Citedel 2000, Thermo Scientefic, Germany) dehidrasyon (artan ethanol serisi ile, Merck KGAA, Darmstadt, Germany), mordanlama aşaması (ksilol, Merck GmbH, Darmstadt, Germany), parafinde embedding (Merck KGAA, Darmstadt, Germany) aşamalarında geçirildi. Parafin embedding aşamasında sonra doku takip kasetlerinden çıkarılma doku örnekleri doku gömme dispanseri (Leica 1150 eg, Leica Biosystems, Germany) kullanılarak akciğer dokusuna ait numuneler sert parafin kullanılarak doku gömme kasetlerine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan rotary microtome (Leica RM2525, Lecia Biosystems, Germany) ile 3-4µm kalınlığında kesitler alınarak Harris hematoxylin and Eosin G (H&E; Merck KGAA, Darmstadt, Germany) ile boyandı.

İmmunohistiyokimyasal (IHC) analiz prosedürü

Çalışmamızda interstisyel alanlardaki fibrosis ve ekstraselüler matriksdeki artışları belirlemek için MMP-2 (rabbit polyclonal, ab86607, Abcam, UK) ve MMP-9 primer antikoları ile MMP-9 (rabbit polyclonal, ab76003, Abcam, UK) ile beraber secondary antibody (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), ab205718, Abcam, UK) kitleri kullanıldı.

Akciğer dokusuna ait kesitler üretici firmanın klavuzuna uygun olarak deparafinizasyon işlemi ardından Leica IHC/ISH (Leica Biosystems, Leica, Germany) cihazı kullanılarak sırası ile antigen retrieval procedure uygulandıktan sonar primer ve sekonder antikolar ile 60 dakika boyunca inkube edildi. Akciğer dokusuna ait kesitler diaminobenzidine tetrahydrochloride (LeicaltraviewDAB, Leica Biosystems, Germany)) ve Harris hematoksilin ile boyandı (Merck, Germany).

Semi-kantitatif Analizler

Akciğer dokusunda histopatolojik değişiklikleri değerlendirmek için sepsis modelli çalışmalara uygun olarak; Alveolar ve intersitisyel inflamasyon, pulmoner membranlar haylin birikimi ve alveolar septal duvar kalınlığı başlıkları altında Yıldız

ve arkadaşlarının akciğer hasar skoru kullanılarak Lung Histopathological Damage score (LHDS) skoruna hesaplandı (Tablo 8.) (Matute-Bello et al., 2011; Yildiz et al., 2021). Akciğer dokusuna her bir kesitte 30 farklı alan çalışmanın grupları bakımından çift kör histopatolog tarafından değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal prosedürler ile MMP-2 ve MMP-9 primer antikörler ile inkübe edilen akciğer dokusuna ait kesitler Table 9 'da gösterildiği gibi skorlandı. IHC pozitif hücrelerin skorlaması çift kör histopatolog tarafından her bir preparatda 30 farklı alan rastgele olarak seçilerek skorlandı.

Tablo 8. Matute-Bello et al. Modified Lung Histopathological Damage Score (LHDS)

Bulgular	Score		
	0	1	2
Alveolar inflammation	≤5%	≤50%	≥75%
Interstitial Inflammation	≤5%	≤50%	≥75%
Arterial hyaline membrane formation	≤5%	≤50%	≥75%
Alveolar wall thickness (Treatment Group/Control Group)	<x2	2x-4x	>x4

Tablo 9. IHC Staining Positivity Score.

Score	Results
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%

2.2.8. İstatiksel Analiz

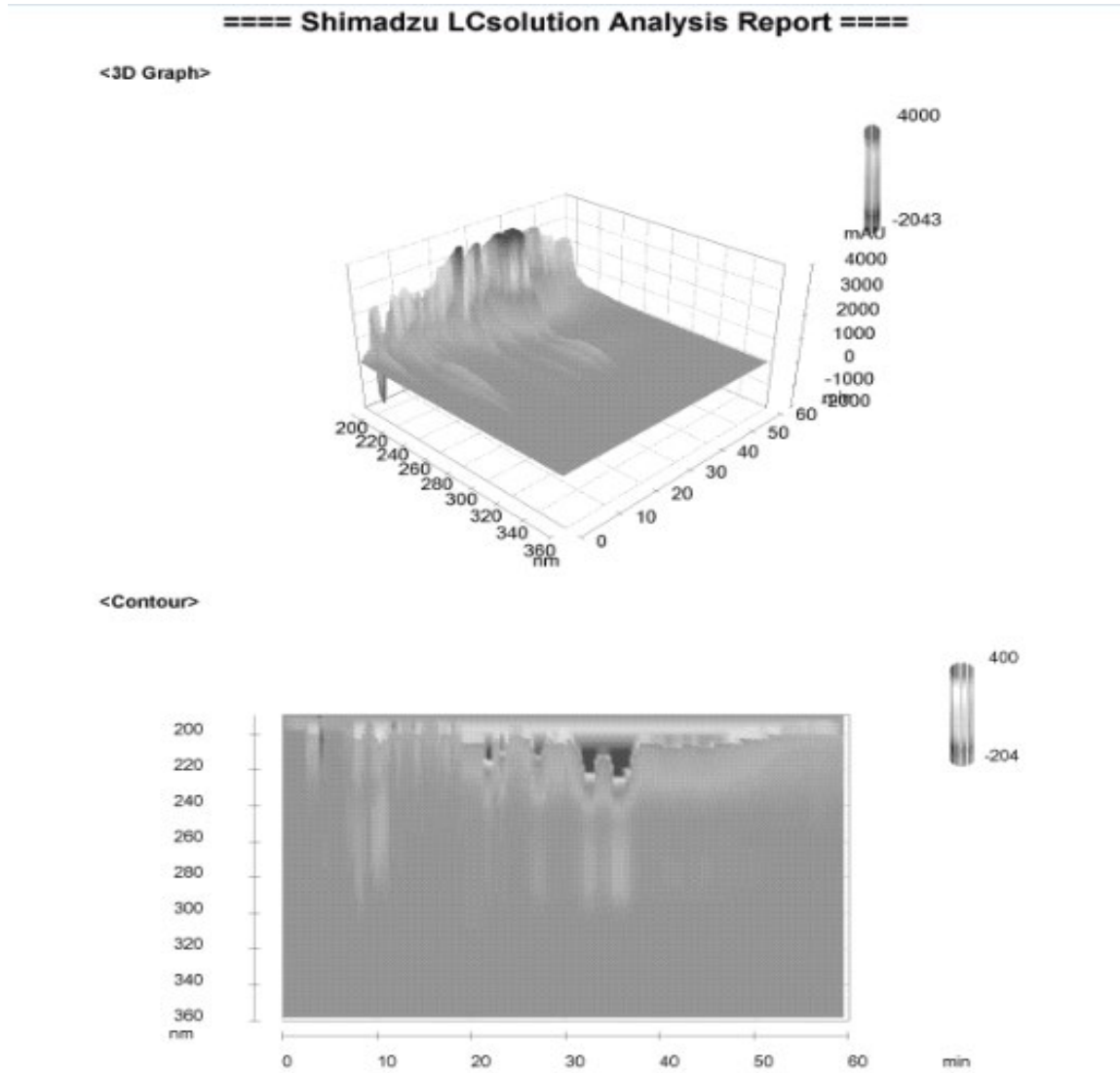
Analizler ile elde edilen veriler SPSS 18.0 statistical software (IBM Corp., Armonk, NY, USA) kullanılarak Shapiro-Wilkinosn testi, Q-Q plot, Skewness-Kurtoisis değerleri ve Leven's testleri yapılarak normallik testleri yapıldı. Semi-kantitatif analizlerden elde edilen non-parametrik veriler çeyrekler arası aralığa sahip medyan olarak hesaplandı. Non-parametrik veriler Mann-Whitney U testi ve Benferroni düzeltme testi kullanılarak analiz edildi. Biyokimyasal analizlerden elde edilen parametrik veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak hesaplandı ve gruplar arasındaki farklar tek yönlü varyans analizine (ANOVA) ve ardından Duncan testine tabi tutuldu. $p < 0.05$ değerleri anlamlı bulundu.



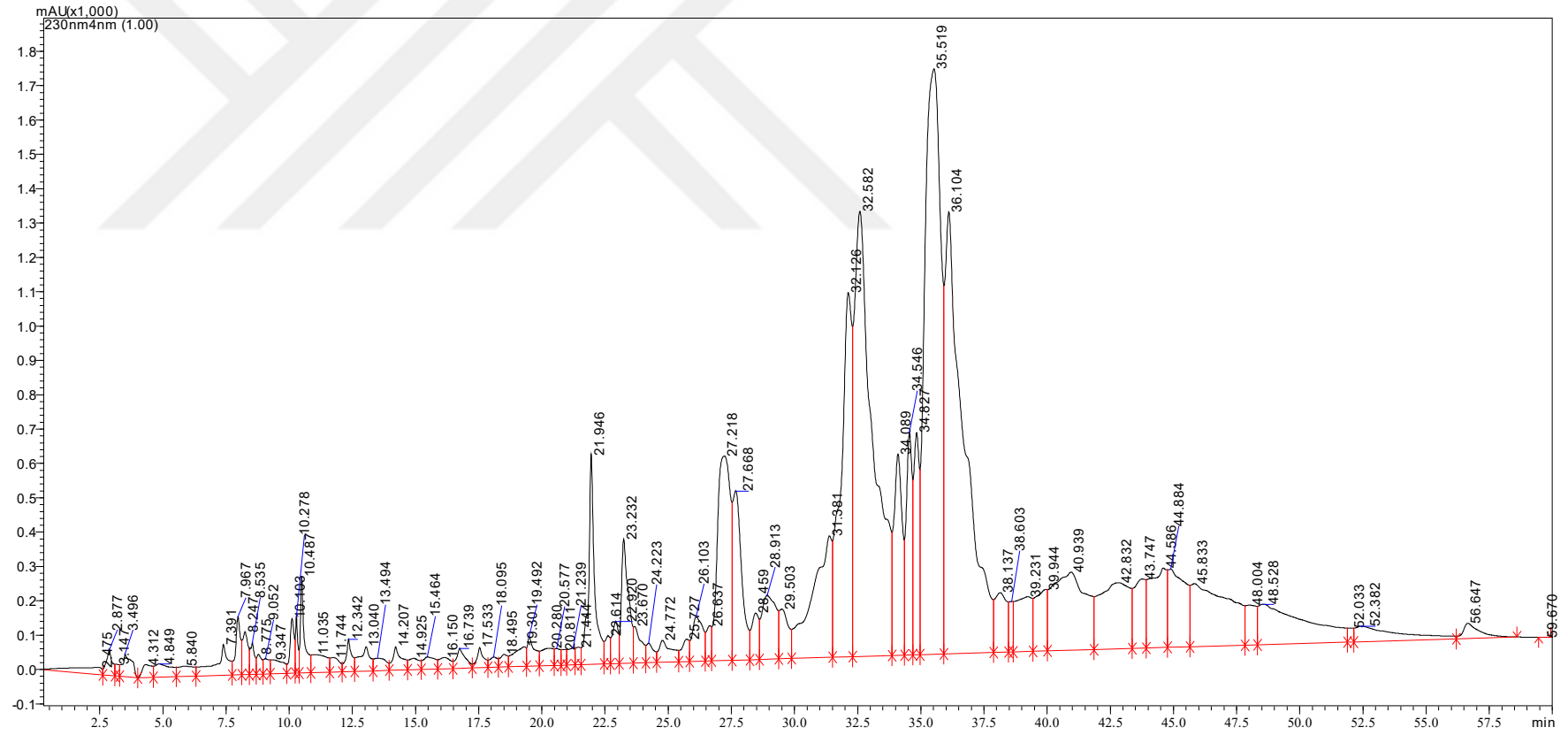
3. BULGULAR

3.1. HPLC Fraksiyonları

3.1.1. İlk HPLC Fraksiyonlarının Değerlendirilmesi



Şekil 13. HPLC 3D Analiz

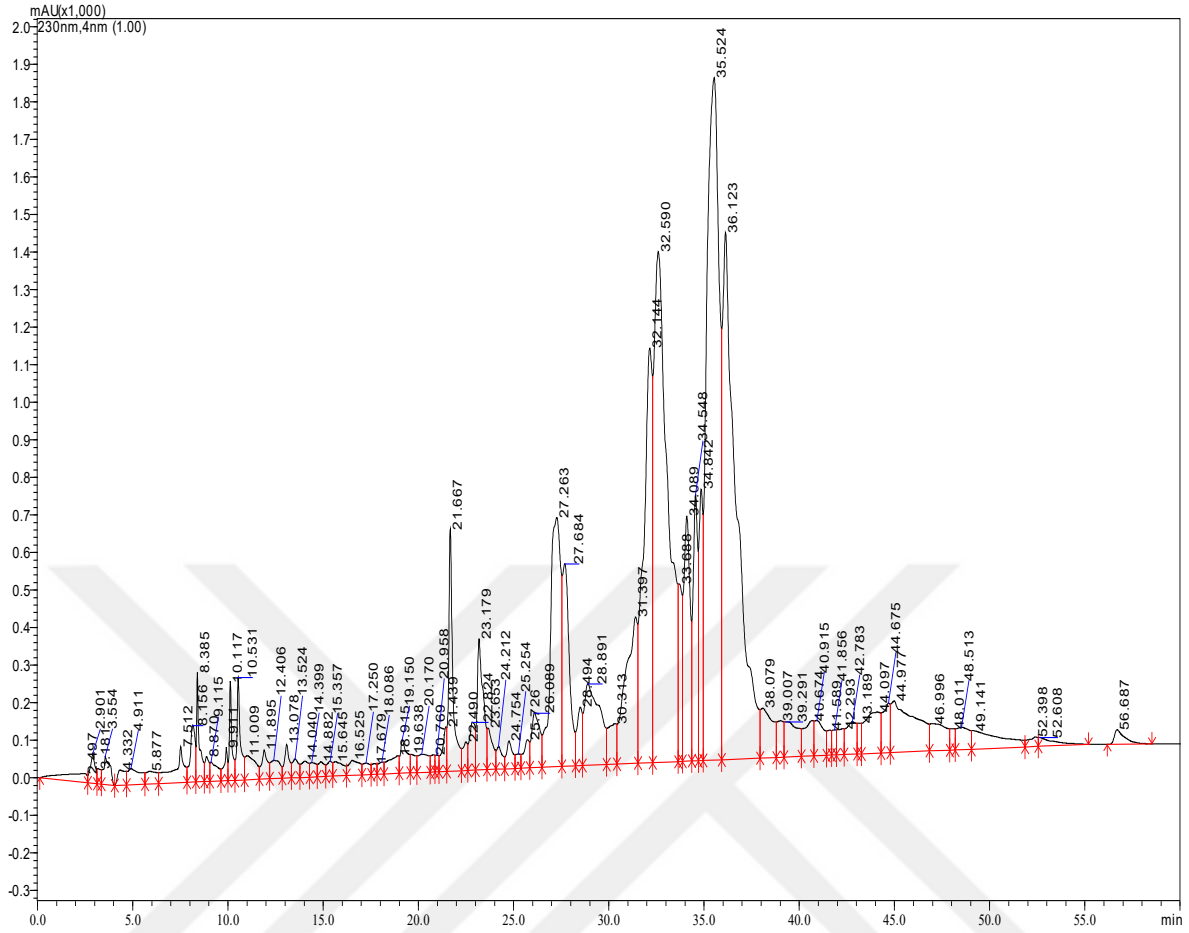


Şekil 14. *A. crassicauda* 1. HPLC Uygulaması

Fraksiyonların 230 nm absorbandsda ölçümleri gerçekleştirilmiştir. İlk fraksiyonlama işlemi sonucunda elde edilen verilen Şekil 14 ve 15’ de gösterilmiştir. *A. crassicauda* venom fraksiyonlarından olumlu sonuç aldığımız 36-39. dk fraksiyon ile ilgili ikinci saflaştırma çalışmamızda oluşan piklerle ilgili veriler Tablo 10’ de bildirilmiştir.

Tablo 10. 36-39. dk 1. fraksiyon pik verileri

Pik	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
36	21.239	971390	49396	0,173	0,315
37	21.444	674512	51476	0,120	0,328
38	32.946	10386361	612044	1.849	3.901
39	22.614	1109695	81634	0,198	0,520



Şekil 15. *L. abdullahbayramii* HPLC Uygulamas

3.1.2. *K.pneumoniae* suşunun antibiyotik direncinin belirlenmesi

K. pneumoniae suşlarının antibiyotik direncinin belirlenmesi için disk difüzyon analizi yapılmıştır (Şekil 16). Bu analizde kullanılan pozitif kontroller (Matuschek et al., 2014); Ciprofloksasin (5µg), Seftazidin (10 µg), Amikasin (30 µg), Sefepirim (30 µg), İmipenem (10 µg)' dir. Amikasin ve İmipenem dışındaki antibiyotik disklerde zon oluşmamıştır. Sonuçlar EUCAST Ocak 2023 “Expected Resistant Phenotypes Version 1.2” verileri ışığında cetvel kullanılarak ölçümler yapılmış ve yorumlanmıştır

(https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2023/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.2_20230113.pdf)(15.03.2023).



Şekil 16. Disk diffüzyon analizi

3.1.3. MİK Verileri

Tablo 11. MİK verileri. 36-39. dk fraksiyonun bakteriler üzerine etkileri

Bakteriyel suş	Akrep venomunun miktarı				Kontrol	
	4 µg	2 µg	1 µg	0.5 µg	Pozitif	Negatif
MRSA	1.170	1.077	1.038	1.015	1.027	0.045
<i>P. aeruginosa</i>	0.889	0.878	0.915	0.936	0.850	0.047
<i>K.pneumoniae</i> *	0.060	0.043	0.056	0.044	0.964	0.048
<i>A.baumannii</i>	0.638	0.805	0.755	0.800	0.746	0.046

OD değerleri, *önemli etki.

K.pneumoniae suşuna 36-39. fraksiyon etki göstermiş olup OD₅₉₅ değeri %100 dilüsyonda 0.060, %50 dilüsyonda 0.043, %25 dilüsyonda 0.056, %12,5 dilüsyonda 0.044 OD olarak ölçülmüş olup pozitif kontrol değeri 0.964 ve negatif kontrol değeri ise 0.048 OD olarak ölçülmüştür. Diğer fraksiyonların bakteriler üzerine etkilerinde ölçümlerde etkinlik saptanmamıştır. Bu veriler makroskobik olarak da değerlendirilmiştir.

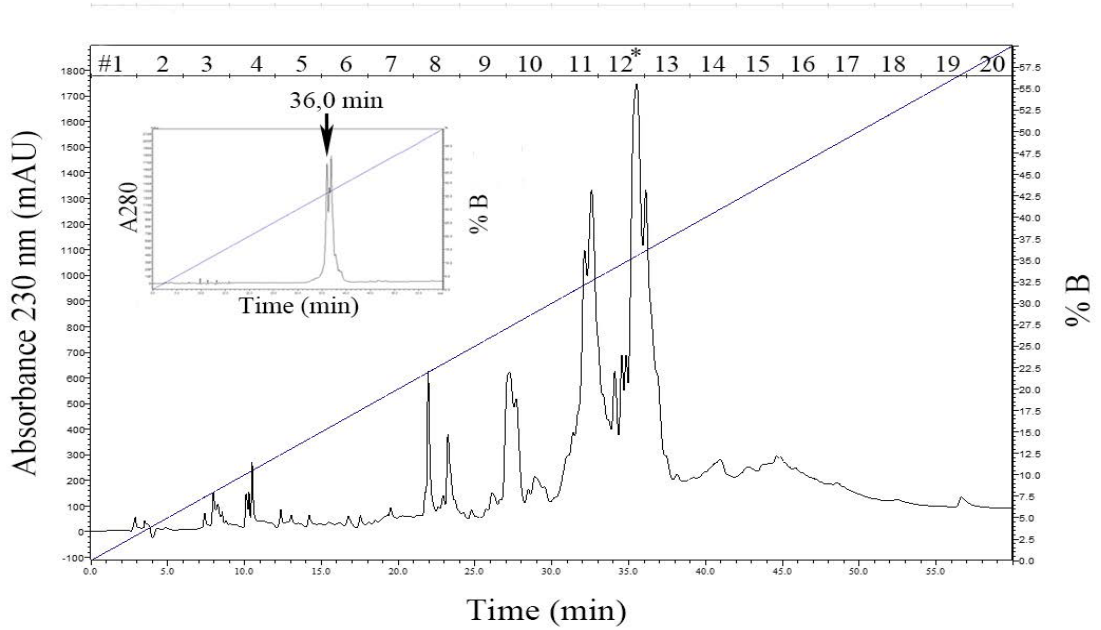
$$\text{Growth İnhibisyon (\%)} = \frac{\text{Pozitif Kontrol} - \text{Test Değeri}}{\text{Pozitif kontrol}} \times 100 \quad (3)$$

Yukarıda verilen formülasyona göre (Zimet et al., 2018), 36-39. dk fraksiyon verileri incelendiğinde konsantrasyon sırasıyla büyümeyi %93.8, % 95.5, %94.2, %95.4 oranlarında patojene etkilediği hesaplanmıştır.

L. abdullahbayrami venom fraksiyonları bakterilere etkisi makroskopik ve mikroskopik olarak tespit edilememiştir.

3.1.4. İleri Saflaştırma

36-39. dk fraksiyon verilerinin ileri saflaştırılması için yapılan HPLC sonucunda 7 fraksiyona ayrıştırılmıştır. Fraksiyonların yapılarındaki madde miktarı hesaplanmış olup Şekil 17 ve Tablo 12’ de gösterilmiştir.



Şekil 17. HPLC 36-39. dk fraksiyon grafiği

Welchrom®’ dan (5µm gözenek boyutu, 4,6x250mm) ters fazlı bir C18 analitik kolonda çalıştırılan Acra venomu (2 mg), suda %0,12 TFA’ da (çözelti A) dengelenmiş ve asetonitrilde %0,1 TFA’ nın doğrusal bir gradyanı (%0-60 B) ile elüe edilmiştir (çözelti B). 60 dakika boyunca 1 ml/dakika akış hızında. Elüsyon 230 nm’ de izlendi. 3 dakikalık aralıklarla toplam 20 farklı fraksiyon (#) toplandı. Fraksiyon 12’ nin

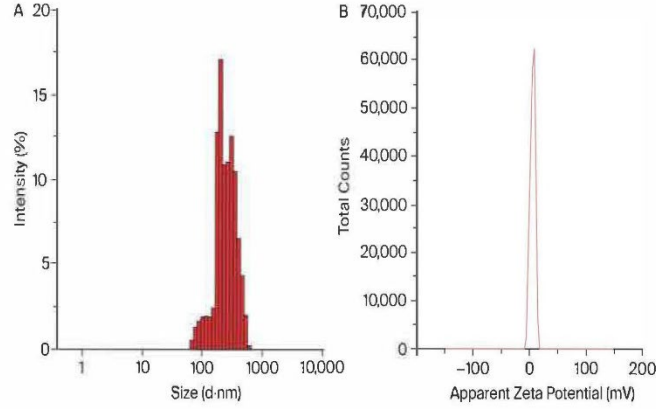
antimikrobiyal etkinliği gösterdiği için yıldız işaretiyle (*) gösterildi. Soldaki ek, çözünür zehir için benzer RP-HPLC koşullarının kullanıldığı fraksiyon 12' nin daha ileri ayırma adımını göstermektedir. Ok, 36.0 alıkonma süresinde antimikrobiyal aktivite gösteren fraksiyonu göstermektedir.

Tablo 12. *A. crassicauda* venomunun 36-39. dakika fraksiyon protein miktarı

Süre	Madde miktarı (µg/ml)	A280 (Abs)	260/280	Area %
36,0	3090	3,090	0,63	31.654
36,5	1603	1,603	0,62	12.303
36,9	2439	2,439	0,62	29.331
37,1	740	0,740	0,65	-
37,7	541	0,541	0,73	6.820
38,5	72	0,072	0,99	1.807
38,9	132	0,132	0,92	3.003

3.2. Nanopartikül Karakterizasyonları

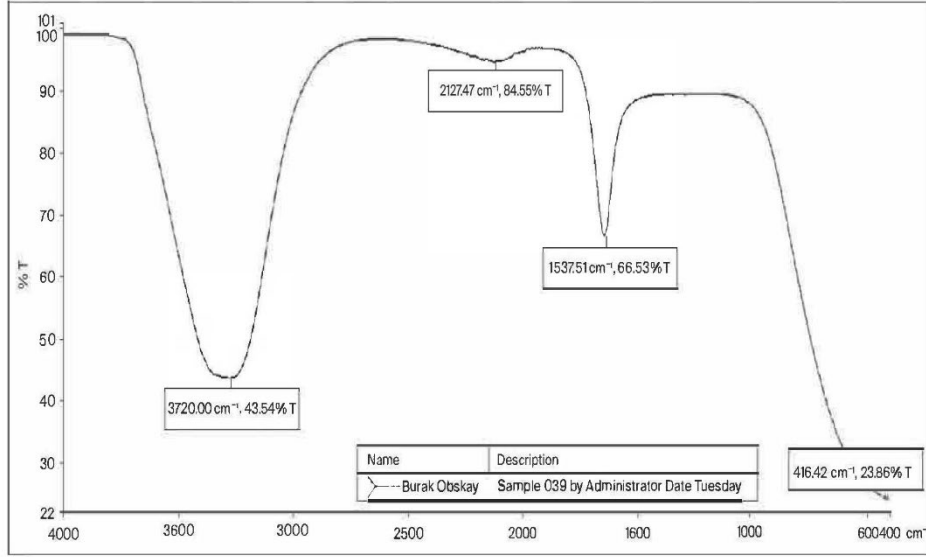
3.2.1. Zeta Potansiyel



Şekil 18. a) Yoğunluğa göre boyut dağılımı b) Zeta potansiyeli dağılımı

Şekil 18 a' da görüldüğü üzere yapılan ölçümlerde 3 okuma sonucuna göre 0,08-0,7 aralığında (Ahire et al., 2020) olan PDI ortalaması 0,596 olup orta dereceli polidispers olarak değerlendirilmiştir. Z-average (d.nm) 385,7 olarak ölçülmüştür. Boyut olarak ortalama 124,85 nm olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Şekil 18 b' de +5,61 mV ortalama iletkenlik değeri olduğu tespit edilmiştir.

3.2.2. FT-IR



Şekil 19. FT-IR Ölçümü

Analizimizde ölçümlerde elde edilen değerler Sigma-Aldrich® veri tabloları kullanılarak yorumlanmıştır (URL-3, <https://sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table.22.03.2023>. URL-4, <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table.23.02.2023>).

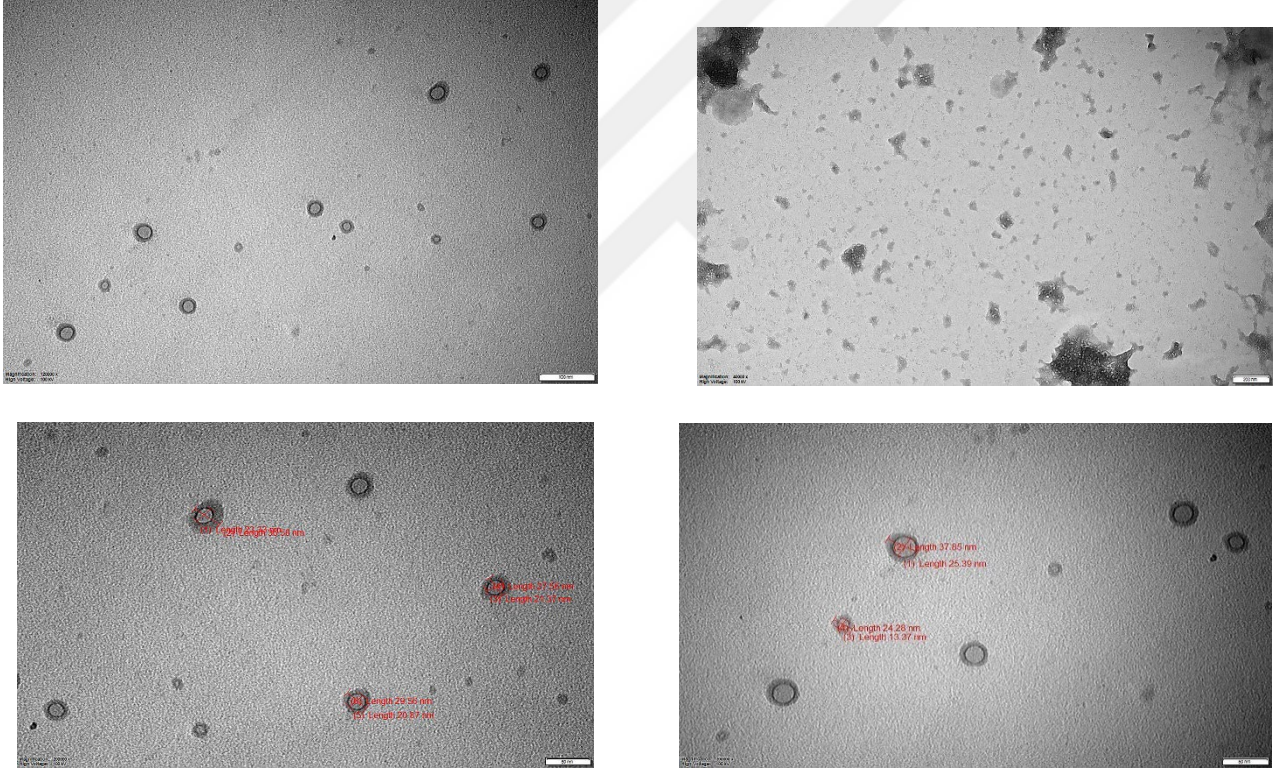
Şekil 19' a göre elde edilen veriler doğrultusunda; $1637,51\text{ cm}^{-1}$ frekansta 66,53 %T geçirgenlikte 1. pik tespit edilmiştir. Bu alanın varlığı orta derecede C=C germe olduğunu, burada disülfid bağlarının olduğu; konjuge alkenlerin (karbon-karbon çift bağına sahip bileşikler) varlığında, orta derecede NH bükmelerin varlığında aminlerin varlığı, orta derecede C-C germe olduğu, orta derecede bağlı sıklık alkenlerin varlığı, yine orta güçte cis halkalarını taşıdığı görülmektedir.

$2120,47\text{ cm}^{-1}$ frekansta 94,66 %T geçirgenlikteki bölgede 2. pik oluşmuştur. Burada oluşan pik biyolojik maddemizin yapısında güçlü bir N=N=N gemesi olan azitli bileşik bulunmaktadır. Yine güçlü N=C=N yapısında karbodiimid bulunmakta

olup; zayıf güçte üç bağı karbon-karbon halkası bulunan alkin bulunmaktadır. Güçlü olan izotiyosiyanat vardır ve bu $N=C=S$ bağlarına sahip bir bileşiktir.

3272,00 cm^{-1} frekanstaki 3. pik noktamızda güçlü ve geniş bir aralıkta moleküller arası bağı OH esneme ile tespiti yapılan alkol bileşikler tespit edilmiştir. Yine güçlü ve geniş yapıda OH esneme ile tespiti yapılan karboksilik asit bileşiği bulunmaktadır. Güçlü ve keskin yapıda CH germe ile tespiti yapılan alkin grubunun olduğu da tespit edilmiştir.

3.2.3. TEM



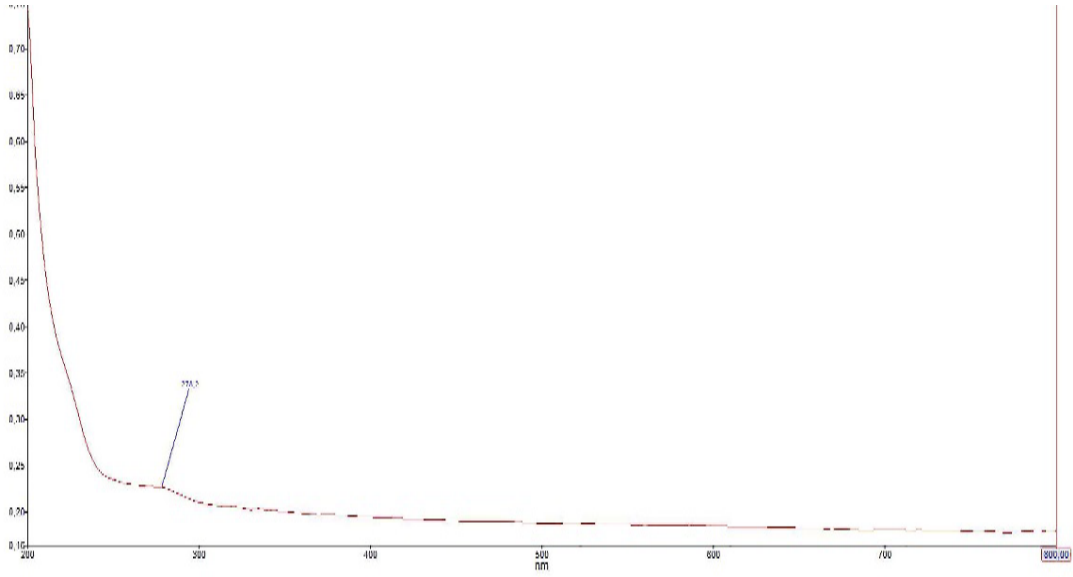
Şekil 20. TEM Haritalama

Morfolojik olarak yüzey özellikleri ve boyut değerlendirilmesi amacıyla görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Haritalardan anlaşılacağı üzere kitosan yüklü fraksiyonlarımız amaçlandığı gibi düz yüzeyli, küresel yapıda ve ortalama 25,42 nm boyutunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 20).

Monodispere dağılım olduğu gözlemlenmiş olup agregasyon olmadığı tespit edilmiştir.

3.2.4. UV-NİS Spektrometre



Şekil 21. UV-NİS Grafiği

Şekil 21’ de görüldüğü üzere 278,2 nm aralığında olduğu için $\pi - \pi^*$ geçiş olarak kabul edilmektedir. Buradaki pik batokromik kayma olarak adlandırılmakta olup çifte bağlı yapıların varlığını göstermektedir.

3.3. Histolojik Analizler

Kontrol grubuna akciğer dokusu kesitleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde alveolar keselerinin ve alveolar kesedeki Tip 1 pnömosit ve tip 2 pnömositlerin normal yapıda olduğunu gözlemledik (Şekil 22 a-b, Tablo 13, LHDS: 1(1-1). Benzer olarak yalnızca Sham-AcraX uygulama ve yalnızca Sham-Lab uygulama gruplarında tipik yapıdaki tip I ve tip II pnömositleri içeren alveol keseleri

gözlemledik (Şekil 22 c-f, Tablo 13, sırası ile: LHDS: 1(1-1), LHDS: 1(1-2.5)). Bunun aksine, sepsis uygulama grubuna ait akciğer dokusu kesitlerinde alveolar septal duvarda ve intersitisyel alanlarda yaygın inflamasyonlara bağlı olarak alveolar septal duvar yapılarında kalınlaşmalar ve pulmoner hyalin membran yapıları mevcuttu (Şekil 22 g-h, Tablo 13, LHDS: 13 (11.5-13)). Diğer taraftan, Sepsis+AcraX uygulama grubuna ait akciğer dokusuna ait kesitleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde alveolar inflamasyon ve interstisyel inflamasyonlarda azalma ile birlikte alveolar-septal duvar kalınlığında incelmeye olduğunu saptadık. Bunlara ek olarak hyalin membran yapılarının azaldığını izledik (Şekil 22 i-j, Tablo 13, LHDS: 4(3-5.5)). Benzer olarak, Sepsis+AcraX-Kitosan ve Sepsis+Lab gruplarında alveolar-septal duvar kalınlığında ve inflamasyonda azalma olduğunu izledik (Şekil 22 k-n; Tablo 13, sırası ile; LHDS: 3(2-4), LHDS: 3(3-4)).

Tablo 13. Lung Histopathological Damage Score Results (median (25%-75% interquartile range)).

Group	Alveolar Inflammation	Interstitial Inflammation	Hyaline membrane	Alveolar septum thickness (Matute-Bello et al.)	LHDS
Control	0(0-0)	0(0-0.5)	0(0-0)	1(1-1)	1(1-1)
Sham-AcraX	0(0-0.5)	0(0-0.5)	0(0-0)	1(1-1)	1(1-1)
Sham-Lab	0(0-0.5)	0(0-0.5)	0(0-0.5)	1(1-1)	1(1-2.5)
Sepsis	3(2-3) ^{a,b,d}	2(2-3) ^{a,b,d}	3(3-3) ^{a,d}	4(4-4) ^{a,b,d}	12(11.5-13) ^{a,b}
Sepsis+AcraX	1(1-1.5) ^{a,b,d,f}	1(1-1) ^a	1(0-1) ^{a,g}	1(1-1) ^f	4(3-5.5) ^{a,b,f}
Sepsis+AcraX-Kitosan	1(1-1) ^{a,b,d,f}	1(0.5-1) ^a	0.5(0-1) ^f	1(1-1) ^f	3(2-4) ^{a,c,i,f}
Sepsis+Lab	1(1-1) ^{a,c,e,f}	1(1-1) ^{b,d}	0.5(0-1) ^f	1(1-1) ^f	3(3-4) ^{a,h,j,f}

^a*p*=0.01 Compared with the Control group,

^b*p*=0.01 Compared with the Sham-AcraX group,

^c*p*=0.03 Compared with the Sham-AcraX group,

^d*p*=0.01 Compared with the Sham-Lab group,

^e*p*=0.03 Compared with the Sham-Lab group,

^f*p*=0.01 Compared with the Sepsis group,

^g*p*=0.012 Compared with the Control group,

^h*p*=0.04 Compared with the Sham-AcraX group,

ⁱ*p*=0.02 Compared with the Sham-Lab group,

^j*p*=0.028 Compared with the Sham-Lab group,

Mann Whitney U test with Bonferroni Corrections

Kantitatif analizler

Alveolar-septal duvar kalınlığı ölçümleri sonucunda kontrol grubunda 14.32 ± 2.81 μm olduğu saptadık (Tablo 14, *p*=0.01). Kontrol grubu 14.32 ± 2.81 μm ölçülen alveolar septal duvar kalınlığı ile Sham-AcraX 14.89 ± 2.55 μm 'e arttığı görülmekle beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (*p*=0.01, Tablo 14). Kontrol grubu 14.32 ± 2.81 μm ölçülen alveolar septal duvar kalınlığı ile Sham-Lab 15.42 ± 2.30 μm arttığı gözlemlenmekle beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (*p*=0.01, Tablo 14). Sepsis grubunun, kontrol grubuna 14.32 ± 2.81 μm 'e olan alveolar-septal duvar kalınlığını 44.13 ± 3.64 μm 'ye arttığını gözlemledik (Şekil 22 a-d; Tablo 14; *p*=0.001). Bunun aksine, Sepsis grubunda

44.13±3.64 µm olarak ölçülen alveolar duvar kalınlığı Sepsis+AcraX uygulama grubunda 22.51±2.60 µm düştüğünü gözlemledik ($p=0.01$, Tablo 14). Benzer olarak, Sepsis grubunda 44.13±3.64 µm olarak ölçülen alveolar duvar kalınlığı sırası ile Sepsis+AcraX-Kitosan grubunda 20.87±6.96 µm ve Sepsis+Lab grubunda 19.90±2.06 µm'e düşmüş olduğunu gözlemledik ($p=0.01$, Tablo 14).

Tablo 14. Alveolar wall thickness (µm) Results results (mean+standart deviation).

Group	Alveolar wall thickness (µm)	Alveolar septum thickness (Treatment Group/Control Group)	Matute-Bello et al. modified Alveolar septum thickness Score
Control	14.32±2.81	1.00	1 (<x2)
Sham-AcraX	14.89±2.55	1.00	1 (<x2)
Sham- Lab	15.42±2.30	1.00	1 (<x2)
Sepsis	44.13±3.64 ^a	3.08	3 (≥x2.5)
Sepsis+AcraX	22.51±2.60 ^b	1.57	1 (<x2)
Sepsis+AcraX-Kitosan	20.87±6.96 ^b	1.45	1 (<x2)
Sepsis+Lab	19.90±2.06 ^b	1.41	1 (<x2)

^a $p=0.001$ Compared with the control group,

^b $p=0.001$ Compared with the Sepsis group,

One-Way ANOVA-Tukey HSD test.

İmmunohistiyokimyasal (IHC) analizler

Akciğer dokusuna ait kesitlerde IHC yöntemi ile interstisyel alanlardaki fibrozisi ve ekstraselüler matriksteki artışı analiz gözlemlemek için matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) primer antikorları ile inkübe ettiğimizde; Sham-AcraX ve Sham-Lab gruplarında kontrol grubuna benzer olarak hücrelerin immün-negatif olduğunu saptadık (Tablo 15, Şekil

23 a-c; $p=0.001$; sırası ile; MMP-9 pozitif skoru: 0(0-0), MMP-9 pozitivite skoru: 0(0-1), MMP-9 pozitif skoru: 1(0-1)). Bunun aksine, Sepsis grubunda yoğun MMP-2 pozitivitesi gösteren hücrelerin sayıları kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmış olduğunu gözlemledik (Şekil 23 d; Tablo 15, $p=0.001$; MMP-9 pozitif skoru: 2(2-2)). Diğer taraftan, Sepsis+AcraX tedavi grubunda yoğun MMP-2 pozitivitesi gösteren hücrelerin Sepsis grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmış olduğunu izledik (Şekil 23 e; Tablo 15, $p=0.001$; MMP-2 pozitivite skoru: 1(0-1)). Benzer olarak Sepsis+AcraX-Kitosan ve Sepsis+Lab gruplarında yoğun MMP-2 pozitivitesi gösteren hücrelerin Sepsis grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmış olduğunu gözlemledik (Figure 2e-f; Tablo 15, $p=0.001$; sırası ile; MMP-2 pozitivite skoru: 1(0-1), MMP-2 pozitivite skoru: 0(0-0)).

MMP-9 primer antikoru ile inkübe edilen akciğer dokusuna ait kesitler ışık mikroskopu altında incelendiğinde; Sham-AcraX ve Sham-Lab gruplarında Kontrol grubuna benzer olarak hücrelerin MMP-9-negatif olduğunu saptadık (Tablo 15, Şekil 24 a-c; $p=0.001$; sırası ile; MMP-9 pozitivite skoru: 0(0-0), MMP-9 pozitivite skoru: 0(0-1), MMP-9 pozitivite skoru: 1(0-1)). Ayrıca, Sepsis grubunda yoğun MMP-9 pozitivitesi gösteren hücrelerin sayıları kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmış olduğunu gözlemledik (Şekil 24 d; Tablo 15, $p=0.001$; MMP-9 pozitivite skoru: 2(2-3)). Diğer taraftan, Sepsis+AcraX tedavi grubunda yoğun immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin Sepsis grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmış olduğunu izledik (Şekil 24 e; Tablo 15, $p=0.001$; MMP-9 pozitivite skoru: 0(0.5-1)). Benzer olarak Sepsis+AcraX-Kitosan ve Sepsis+Lab gruplarında yoğun MMP-2 pozitivitesi gösteren hücrelerin Sepsis grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmış olduğunu gözlemledik (Şekil 24 e-f; Tablo 15, $p=0.001$; sırası ile; MMP-9 pozitivite skoru: 0(0-1), MMP-9 pozitivite skoru: 0(0-1)).

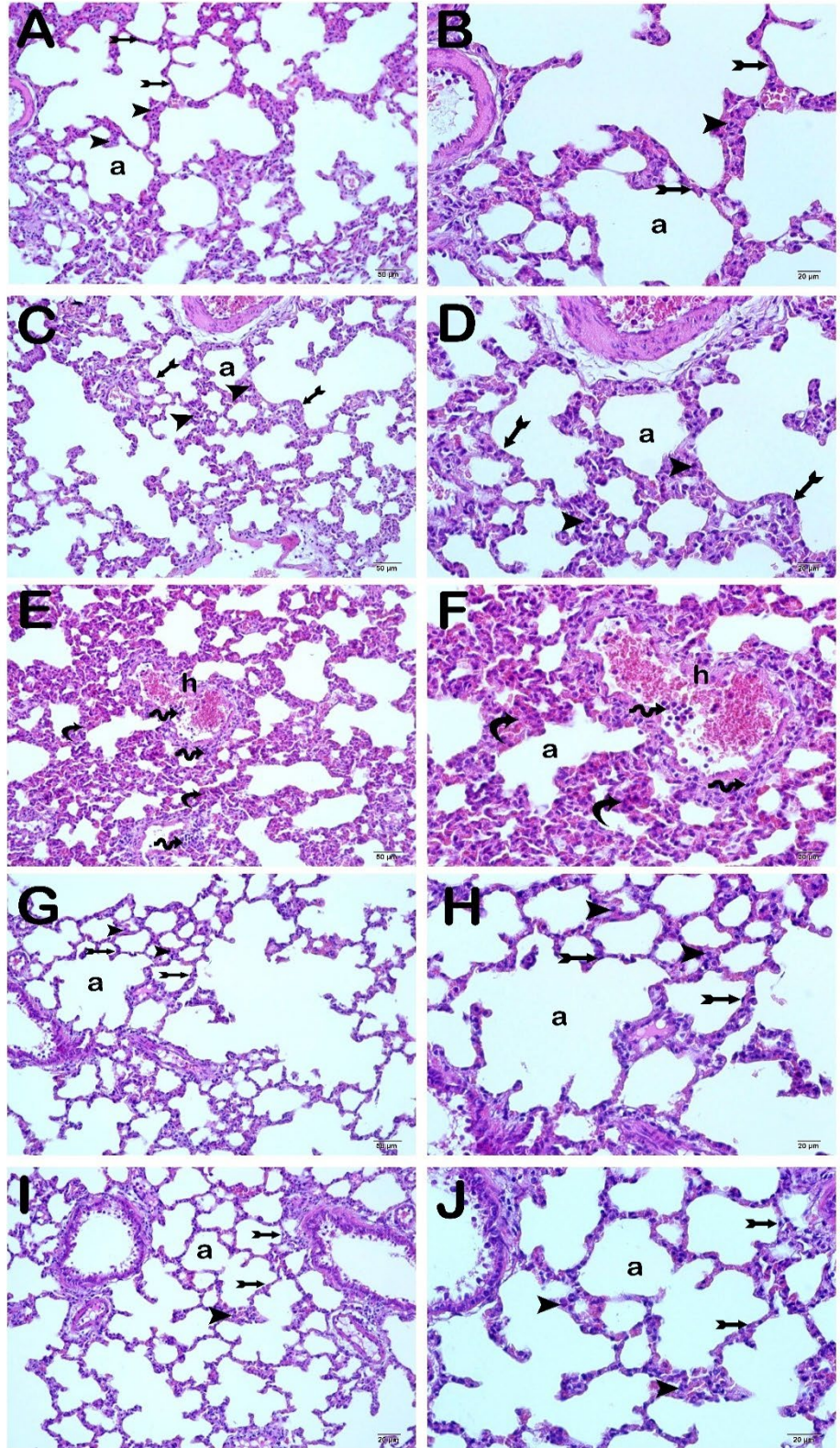
Tablo 15. IHC Positivity Grade Score Results (median with interquartile (25%-75%) range).

Grup	MMP-2 Positivity Score	MMP-9 Positivity Score
Kontrol	0 (0-0)	0(0-0)
Sham-AcraX	0 (0-1)	0(0-0)
Sham-Lab	1 (0-1)	1(0-1)
Sepsis	2(2-2) ^a	2(2-2) ^a
Sepsis+AcraX	1(0-1) ^b	0(0-1) ^b
Sepsis+AcraX-Kitosan	1(0-1) ^b	0(0-1) ^b
Sepsis+Lab	0(0-0) ^b	0(0-1) ^b

^a $p=0.01$ versus to the Control group,

^b $p=0.001$ versus to the Sepsis group,

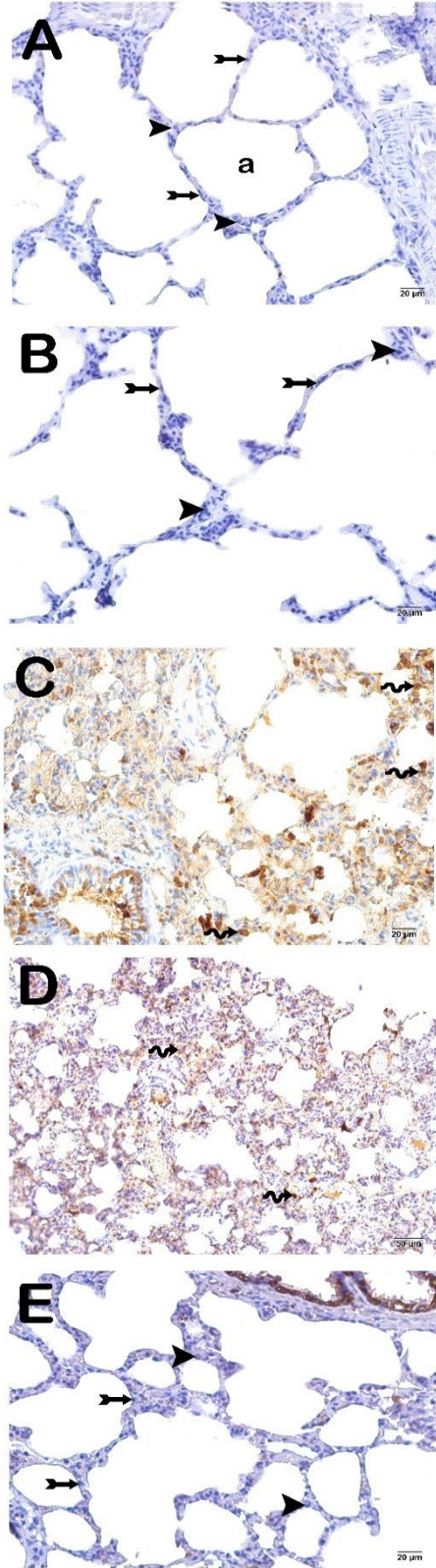
Mann Whitney U test with Bonferroni Corrections



Şekil 22. H&E ile boyanmış akciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.

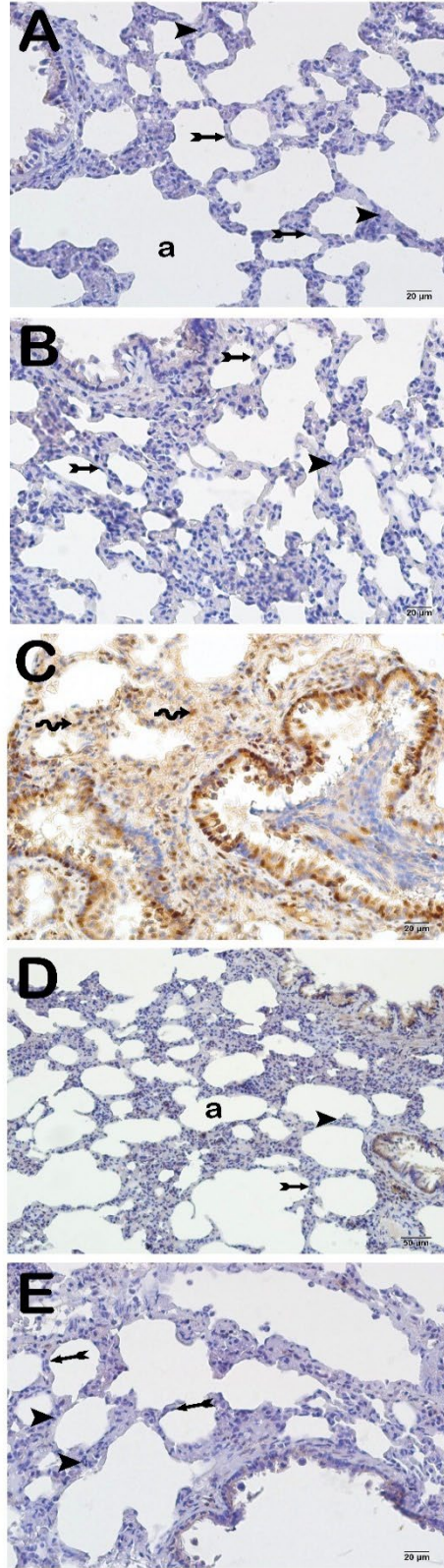
Alveol (a), Tip 1 pnömosit (ince ok), Tip 2 pnömositler (ince ok)

A(x20)-B(x40) Kontrol Grubu: Akciğer dokusu kesitlerinde alveolar keselerde normal yapıdaki tipik Tip 1 pnömosit (ince ok) ve tip 2 pnömositler (ince ok) izlenmekte (LHDS median: 1(1-1)). *C(x20)-D(x40) Sham-AcraX:* Akciğer dokusu kesitlerinde normal yapıdaki tipik Tip 1 pnömosit (ince ok) ve tip 2 pnömositler (ince ok) içeren alveol izlenmekte (LHDS median: 1(1-1)). *E(x20)-F(x40) Sepsis grubu:* Akciğer dokusu kesitlerinde yaygın alveolar inflamasyon ve intersitisyel alanlarda inflamasyonlar a bağlı olarak alveolar-septal duvar yapısında kalınlaşmalar izlenmekte (ok başı). In addition, yaygın hiyalin membran oluşumları (x) izlenmekte (LHDS median: 12(11.5-13)). *I(x20)-J(x40) Sepsis+AcraX tedavi grubu:* Akciğer dokusuna ait kesitlerde alveolar inflamasyonlarda (ok başı) ve alveolar-septal duvar kalınlığında azalma olduğu izlenmekte. Bunun yanında, hiyalin membran yapılarında (x) gözlenmekte (LHDS median: 4(3-5.5)). *K(x20)-L(x40) Sepsis+AcraX-Kitosan:* Akciğer dokusuna ait kesitlerde alveolar inflamasyon, alveolar-septal duvar kalınlığında azalma ve hiyalin membran yapısında azalma olduğu gözlenmekte (LHDS median: 3(2-4)).



Şekil 23. MMP-2 primer antikoru ile inkübe edilmiş akciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.

A(x40) Kontrol grubu: Akciğer dokusu kesitlerinde immün-negatif normal yapıdaki Tip 1 pnömosit (ince ok) ve tip 2 pnömositler (ince ok) içeren alveol yapıları gözlenmekte (MMP-2 pozitif skor: 0(0-0)). *B(x40) Sham-AcraX:* MMP-2 negatif tipik hücrelerden oluşan akciğer dokusu izlenmekte (MMP-2 pozitif skor: 0(0-0)). *C(x40) Sepsis grubu:* Akciğer dokusu kesitlerinde alveolar-septal duvarda yoğun MMP-2 pozitivitesi gösteren hücreler (tailed arrow) izlenmekte (MMP-2 pozitif skor: 2(2-2)). *D(x40) Sepsis+AcraX:* Alveolar-septal duvarda yoğun MMP-2 pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu gözlenmekte (MMP-2 pozitif skor: 1(0-1)). *E(x40) Sepsis+AcraX-Kitosan:* MMP-2 pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu gözlenmekte (MMP-2 pozitif skor: 1(0-1)). Alveolar-septal duvarda yoğun MMP-2 pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış ve yaygın olarak tipik yapıdaki hücrelerin olduğu izlenmekte (MMP-2 pozitif skor: 1(0-1)).



Şekil 24. MMP-9 primer antikoru ile inkübe edilmiş akciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.

A(x40) Kontrol grubu: Akciğer dokusu kesitlerinde alveolar-septal duvarda immün-negatif normal yapıdaki Tip 1 pnömosit (ince ok) ve tip 2 pnömositler (ince ok) içerdiği izlenmekte (MMP-9 pozitif skor: 0(0-0)). *B(x40) Sham-AcraX:* Alveolar-septal duvarda immün-negatif hücrelerin bulunduğu gözlenmekte (MMP-9 pozitif skor: 0(0-0)). *C(x40) Sepsis grubu:* Alveolar-septal duvarda yoğun MMP-9 pozitivitesi gösteren hücreler (tailed arrow) izlenmekte (MMP-9 pozitif skor: 2(2-3)). *D(x40) Sepsis+AcraX:* Alveolar-septal duvarda yoğun immün-pozitivite gösteren hücrelerin azalmış olduğu gözlenmekte (MMP-9 pozitif skor: 0.5(0-1)). *E(x40) Sepsis+AcraX-Kitosan:* MMP-9 pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu gözlenmekte (MMP-9 pozitif skor: 1(0-1)). Alveolar-septal duvarda yoğun MMP-9 pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış ve yaygın olarak tipik yapıdaki hücrelerin olduğu izlenmekte (MMP-9 pozitif skor: 0(0-1)).

3.4. Sitotoksik Analizler (HeLa Hücre Hattı)

Tablo 16. 24 saat diliminde sitotoksik analiz

ÖRNEK		ABSORBANS		ORTALAMA CANLILIK	STANDART SAPMA
AcraX 250 µl	3335	3066	3631	122,587	9,568
AcraX 125 µl	2699	2723	2757	96,977	0,987
AcraX 62,5 µl	2811	2927	2757	101,344	2,941
AcraX 31,25 µl	2991	2904	2680	102,450	5,432
AcraX 15,625 µl	2701	2875	2855	100,460	3,223
Lab 250 µl	1971	2217	2368	74,545	6,784
Lab 125 µl	2749	2548	2699	94,447	3,543
Lab 62,5 µl	2720	2850	2896	100,943	3,090
Lab 31,25 µl	2862	2947	2968	105,242	1,900
Lab 15,625 µl	2889	2860	2801	102,104	1,518
Negatif Kont.	1029	1060	961	27,045	1,714
Pozitif Kont.	2630	2730	2724	100,000	1,899
Blank	394	392	391	0,000	0,052

Tablo 17. 48 saat diliminde sitotoksik analiz

ÖRNEK	ABSORBANS			ORTALAMA CANLILIK	STANDART SAPMA
AcraX 250 µl	1098	1005	1065	136,451	7,883
AcraX 125 µl	1034	1101	1049	137,543	5,879
AcraX 62,5 µl	988	904	966	115,290	7,283
AcraX 31,25 µl	809	832	796	86,553	3,048
AcraX 15,625 µl	999	945	881	113,038	9,877
Lab 250 µl	774	695	609	62,048	13,798
Lab 125 µl	888	801	839	92,765	7,293
Lab 62,5 µl	859	885	928	102,594	5,826
Lab 31,25 µl	916	875	904	104,164	3,524
Lab 15,625 µl	980	1000	1027	125,461	3,944
Negatif Kont.	462	444	456	13,174	1,532
Pozitif Kont.	866	877	891	100,000	2,095
Blank	394	384	391	0,000	0,858

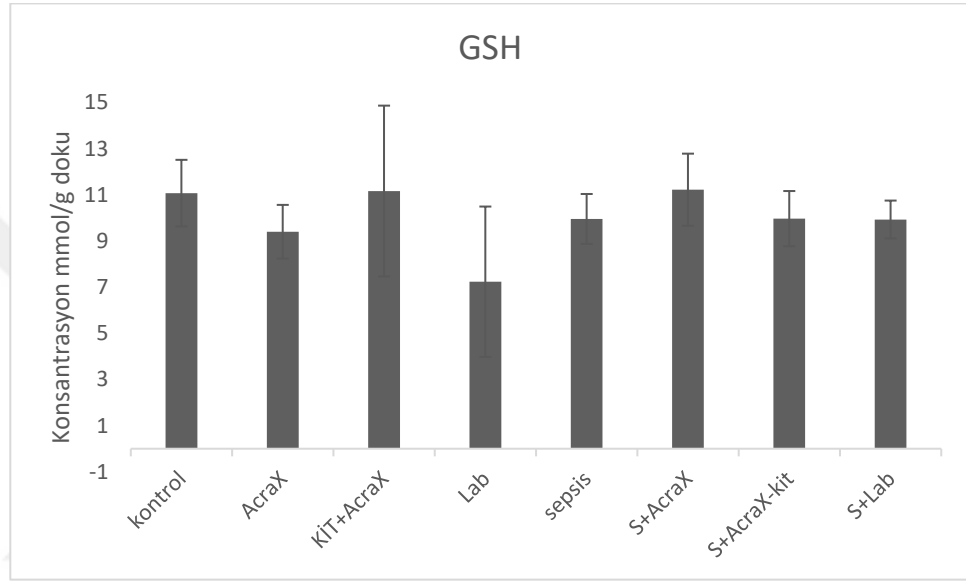
Burada kullanılan 24 saatlik saat diliminde AcraX fraksiyonunda hücre canlılığını koruduğu, fakat *L. abdullahbayramii* venomunun %100 dilüsyonda toksik etki oluşturduğu görülmüştür. Toksik etkisinin 3. dilüsyondan sonra azaldığı tespit edilmiştir.

48 saatlik dilimde yine AcraX fraksiyonunun önemli bir şekilde etkilemediği ancak *L. abdullahbayramii* venomuna ait değerler incelendiğinde %100 dilüsyonda (250 µl) canlılığın çok düşük olduğu ve bunda venomun toksik etkisinden olduğu anlaşılmıştır.

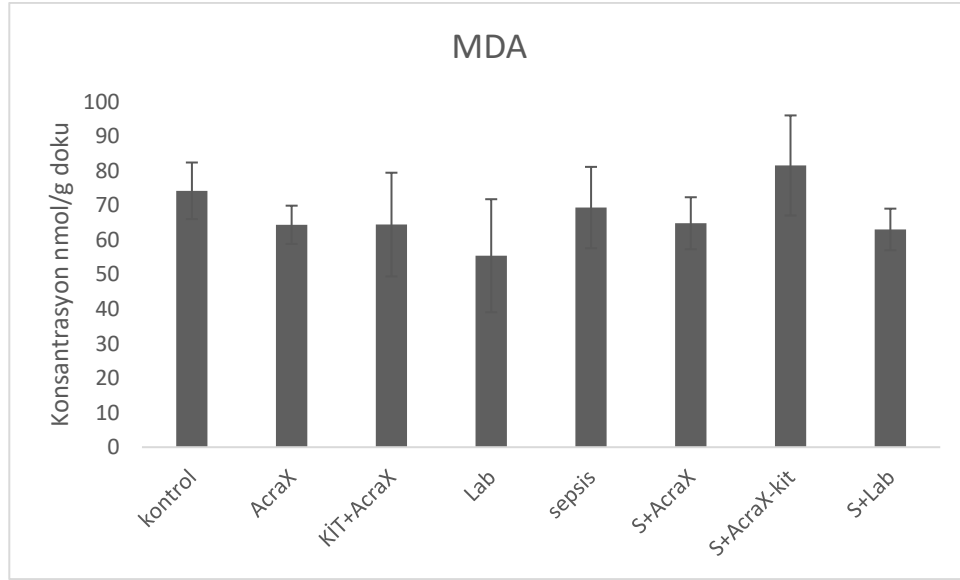
3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. MDA ve GSH Analizleri

GSH analizinde; kontrol grubuna göre yapılan değerlendirmede AcraX, Lab, sepsis, sepsis+kitosan-AcraX ve sepsis+lab gruplarında anlamlı düşüşler olduğu ancak Kitoasan+AcraX ve sepsis+AcraX gruplarında anlamlı değişimler olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. Akciğer Dokusu GSH Değişim Grafiği



Şekil 26. Akciğer Dokusu MDA Değişim Grafiği

MDA’ daki değişimleri kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda; sepsis+Kitosan-AcraX grubunda artış olmuş ancak diğer gruplarda verilerde düşüşler gözlemlenmektedir (Şekil 26).

3.5.2. Sitokin Analizleri

3.5.2.1 TNF- α

Akciğer dokusuna ait örneklerde TNF- α seviyeleri ölçüldüğünde; kontrol grubunda 220.87 ± 6.15 ng/L akciğer dokusu TNF- α seviyesi Sham-AcraX 240.83 ± 9.97 ’a yükselmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 18, $p > 0.05$). Benzer olarak, kontrol grubunda 220.87 ± 6.15 ng/L akciğer dokusu TNF- α seviyesi sırası ile Sham-Lab 237.83 ± 9.84 ’ye ve Sham+AcraX-Kitosan grubunda ise 238.410 ± 2.54 yükselmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 18, $p > 0.05$). Bunun aksine, kontrol grubunda 220.87 ± 6.15 ng/L akciğer dokusu TNF- α seviyesi Sepsis uygulama grubunda 438.47 ± 11.25 ng/L’e yükselmiş olduğunu saptadık (Tablo 18, $p = 0.001$). Sepsis grubun aksine, Sepsis uygulama grubunda 438.47 ± 11.25 ng/L olarak ölçülen akciğer dokusu TNF- α seviyesi Sepsis+AcraX grubunda 320.67 ± 6.95 ’e düşmüş olduğunu gözlemledik (Tablo 18, $p = 0.001$). Benzer olarak, Sepsis uygulama grubunda 438.47 ± 11.25 ng/L olarak ölçülen akciğer TNF- α seviyesi sırası ile Sepsis+AcraX-Kitosan grubunda 227.53 ± 5.13 ’e ve Sepsis+Lab grubunda ise

270.8±4'e düşmüş olduğunu izledik (Tablo 18, $p=0.001$). Bunlarında yanında, Sepsis+AcraX-Kitosan grubu akciğer dokusu TNF- α seviyesi sırası ile Sepsis+AcraX ve Sepsis+Lab gruplarına kıyasla istatistiksel olarak daha düşük olduğunu saptadık (Tablo 18, sırası ile; $p=0.001$ ve $p=0.002$).

3.5.2.2. IL-1 β

Akciğer dokusuna ait örneklerde *IL-1 β* seviyeleri ölçüldüğünde; kontrol grubunda 8.71±0.56 ng/L akciğer dokusu *IL-1 β* seviyesi Sham-AcraX 9.95±0.72 ng/L'e yükselmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 18, $p>0.05$). Benzer olarak, kontrol grubunda 8.71±0.56 ng/L akciğer dokusu *IL-1 β* seviyesi sırası ile Sham-Lab 10.60±1,99 ng/L'ye ve Sham+AcraX-Kitosan grubunda ise 11.6±1.02 ng/L' ye yükselmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 18, $p>0.05$). Bunun aksine, kontrol grubunda 8.71±0.56 ng/L akciğer dokusu *IL-1 β* seviyesi Sepsis uygulama grubunda 15.86±0.97 ng/L'ye yükselmiş olduğunu saptadık (Tablo 18, $p=0.001$). Sepsis grubun aksine, Sepsis uygulama grubunda 15.86±0.97 ng/L olarak ölçülen akciğer dokusu *IL-1 β* seviyesi Sepsis+AcraX grubunda 12.47±1,01 ng/L' ye düşmüş olduğunu gözlemledik (Tablo 18, $p=0.001$). Benzer olarak, Sepsis uygulama grubunda 15.86±0.97 ng/L olarak ölçülen akciğer *IL-1 β* seviyesi sırası ile Sepsis+AcraX-Kitosan grubunda 12.5±0.82 ng/L' ye ve Sepsis+Lab grubunda ise 14.56±0.17 ng/L' ye düşmüş olduğunu izledik (Tablo 18, $p=0.001$). Bunlarında yanında, Sepsis+AcraX-Kitosan grubu akciğer dokusu *IL-1 β* seviyesi sırası ile Sepsis+AcraX ve Sepsis+Lab gruplarına kıyasla istatistiksel olarak daha düşük olduğunu saptadık (Tablo 18, sırası ile; $p=0.001$ ve $p=0.002$).

3.5.2.3. IL-6

Akciğer dokusuna ait örneklerde *IL-6* seviyeleri ölçüldüğünde; kontrol grubunda 3.14±0.14 ng/L akciğer dokusu *IL-6* seviyesi Sham-AcraX 4.25±0.02 ng/L' ye yükselmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 18, $p>0.05$). Benzer olarak, kontrol grubunda 3.14±0.14 ng/L akciğer dokusu *IL-6* seviyesi sırası ile Sham-Lab 4.06±0.27 ng/L'ye ve Sham+AcraX-Kitosan grubunda ise 4.08±0.60 ng/L' ye yükselmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 18, $p>0.05$). Bunun aksine, kontrol grubunda 3.14±0.14 ng/L akciğer dokusu *IL-6* seviyesi Sepsis

uygulama grubunda 8.24 ± 0.31 ng/L'ye yükselmiş olduğunu saptadık (Tablo 18, $p=0.001$). Sepsis grubun aksine, Sepsis uygulama grubunda 8.24 ± 0.31 ng/L olarak ölçülen akciğer dokusu *IL-6* seviyesi Sepsis+AcraX grubunda 4.88 ± 0.16 ng/L'ye düşmüş olduğunu gözlemledik (Tablo 18, $p=0.001$). Benzer olarak, Sepsis uygulama grubunda 8.24 ± 0.31 ng/L olarak ölçülen akciğer *IL-6* seviyesi sırası ile Sepsis+AcraX-Kitosan grubunda 4.90 ± 0.18 ng/L'ye ve Sepsis+Lab grubunda ise 5.90 ± 0.39 ng/L'ye düşmüş olduğunu izledik (Tablo 18, $p=0.001$). Bunlarında yanında, Sepsis+AcraX-Kitosan grubu akciğer dokusu *IL-6* seviyesi sırası ile Sepsis+AcraX ve Sepsis+Lab gruplarına kıyasla istatistiksel olarak daha düşük olduğunu saptadık (Tablo 18, sırası ile; $p=0.001$ ve $p=0.002$).

3.5.2.4. IL-10

Akciğer dokusuna ait örneklerde *IL-10* seviyeleri ölçüldüğünde; kontrol grubunda 65.71 ± 3.43 ng/L akciğer dokusu *IL-10* seviyesi Sham-AcraX 73.37 ± 2.92 ng/L'ye yükselmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 18, $p>0.05$). Benzer olarak, kontrol grubunda 65.71 ± 3.43 ng/L akciğer dokusu *IL-10* seviyesi sırası ile Sham-Lab 74.27 ± 3.25 ng/L'ye ve Sham+AcraX-Kitosan grubunda ise 70.20 ± 1.96 ng/L'ye yükselmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 18, $p>0.05$). Bunun aksine, kontrol grubunda 65.71 ± 3.43 ng/L akciğer dokusu *IL-10* seviyesi Sepsis uygulama grubunda 104.68 ± 1.12 ng/L'ye yükselmiş olduğunu saptadık (Tablo 18, $p=0.001$). Sepsis grubunun aksine, Sepsis uygulama grubunda 104.68 ± 1.12 ng/L olarak ölçülen akciğer dokusu *IL-10* seviyesi Sepsis+AcraX grubunda 96.52 ± 2.99 ng/L'ye düşmüş olduğunu gözlemledik (Tablo 18, $p=0.001$). Benzer olarak, Sepsis uygulama grubunda 104.68 ± 1.12 ng/L olarak ölçülen akciğer *IL-10* seviyesi sırası ile Sepsis+AcraX-Kitosan grubunda 94.42 ± 4.56 ng/L'ye ve Sepsis+Lab grubunda ise 107.9 ± 2.27 ng/L'ye düşmüş olduğunu izledik (Tablo 18, $p=0.001$). Bunlarında yanında, Sepsis+AcraX+Kitosan grubu akciğer dokusu *IL-10* seviyesi sırası ile Sepsis+AcraX ve Sepsis+Lab gruplarına kıyasla istatistiksel olarak daha düşük olduğunu saptadık (Tablo 18, sırası ile; $p=0.001$ ve $p=0.002$).

Tablo 18. Sitokin Analizler (mean+standart deviation).

Group	TNF- α ng/L	IL-1 β ng/L	IL-6 ng/L	IL-10 ng/L
Control	220.87 $\pm$ 6.15	8.71 $\pm$ 0.56	3.14 $\pm$ 0.14	65.71 $\pm$ 3.43
Sham-AcraX	240.83 $\pm$ 9.97	9.95 $\pm$ 0.72	4.25 $\pm$ 0.02	73.37 $\pm$ 2.92
Sham-Lab	237.83 $\pm$ 9.84	10.60 $\pm$ 1.99	4.06 $\pm$ 0.27	74.27 $\pm$ 3.25
Sham+AcraX- Kitosan	238.41 $\pm$ 2.54	11.6 $\pm$ 1.02	4.08 $\pm$ 0.60	70.20 $\pm$ 1.96
Sepsis	438.47 $\pm$ 11.25 ^{a,b,d,f}	15.86 $\pm$ 0.97	8.24 $\pm$ 0.31	104.68 $\pm$ 1.12
Sepsis+AcraX	320.67 $\pm$ 6.95 ^{a,b,d,f,i}	12.47 $\pm$ 1.01	4.88 $\pm$ 0.16	96.52 $\pm$ 2.99
Sepsis+AcraX- Kitosan	227.53 $\pm$ 5.13 ^{ij}	12.5 $\pm$ 0.82	4.90 $\pm$ 0.18	94.42 $\pm$ 4.56
Sepsis+Lab	270.8 $\pm$ 4 ^{a,c,e,g,i,j,k}	14.56 $\pm$ 0.17	5.90 $\pm$ 0.39	107.9 $\pm$ 2.27

^a $p=0.001$ versus to Control group,

^b $p=0.001$ Compared with the Sham-AcraX group,

^c $p=0.005$ Compared with the Sham-AcraX group,

^d $p=0.001$ Compared with the Sham-Lab group,

^e $p=0.002$ Compared with the Sham-Lab group,

^f $p=0.001$ Compared with the Sham+AcraX- Kitosan group,

^g $p=0.002$ Compared with the Sham+AcraX- Kitosan group,

ⁱ $p=0.001$ Compared with the Sepsis group,

^j $p=0.001$ Compared with the Sepsis+AcraX group,

^k $p=0.001$ Compared with the Sepsis+AcraX group,

Mann Whitney U test with Bonferroni Corrections

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Tartışma

Günümüzde bakteriler tarafından direnç mekanizmalarının hızla gelişmesi nedeniyle antibakteriyel ilaçların etkinliği azalmaktadır (Halawa et al., 2024). Bu durumun 2050 yılına kadar 10 milyon insanın ölümüne neden olacağı öngörülmektedir (Murray et al., 2022). Bu çalışmada, direnç oluşturmayan, antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu gösterilen akrep zehirlerinin karmaşık kimyasal yapılarından yararlanılarak, tedavisi zor olan nozokomiyal enfeksiyonlar ile mücadele amaçlanmıştır.

Akrepler zehirlerinde bulunan kimyasal komponentler sayesinde anti-proliferatif, sitotoksik, apoptojenik ve immunsupresif özellikte (Mishal et al., 2013) olmasından dolayı daha detaylı analizleri her geçen gün hızla artmaktadır. Özellikle yapılarında bulundurdıkları AMP kimyasallar sayesinde mikroorganizmalara karşı etkili oldukları gösterilmiştir. Aslında bu yapıları doğada hayatta kalabilmek için bünyelerinde üretmektedirler (Jenner & Undheim, 2017).

Yapılan araştırmalar, akrep zehirlerinin ilk saflaştırılmalarından bu yana 25 akrep türünden elde edilen toplam veya fraksiyone edilmiş zehirde antibakteriyel, antifungal, antiparaziter ve antiviral özelliklere sahip 50' den fazla peptidin tespit edildiğini göstermiştir (Zerouti et al., 2021).

Akrep venomunun *L. tropicalis*' e karşı etkisi üzerine yapılan çalışmada venomun anti-paraziter özellik gösterdiği ve promastigotlar üzerine inhibe edici olduğu (Yıldız Zeyrek, 2021), parazitler üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise kullanılan *Trichuris arvicolae* (Alshammari et al., 2023) etkenine yüksek dozlarda uygulanan akrep venomunun etkili olduğu bildirilmiştir.

Antiviral etkinliği tespit edilen ilk akrep türü *Heterometrus petersii* idi. Bu akrebin venomundan elde edilen cDNA, gen kütüphanesine eklenerek *Hp 1090* geninin *HCV* üzerine olumlu etkisi bulunmuştur (Yan et al., 2011). *Hp 1036* ve *Hp 1239 HSV-1* üzerine morfolojik tahribatlara neden olarak virüse karşı oldukça güçlü bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Ortiz et al., 2015). *Hemiscorpius lepturus* total ve ham akrep venomunun *HIV* üzerinde yapılan çalışmada viral replikasyonun %73 oranında azalttığı bildirilmiştir (Zabihollahi et al., 2016).

Antibakteriyel çalışmalar, çeşitli akrep türlerinde Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerle ilgili olumlu sonuçlar bildirmiştir. Bu yapılan çalışmalarda; *Mesobuthus gibbosus* akrep venomunun *L.monocytogenes*, *Basillus subtilis* ve *Salmonella enteritidis* üzerindeki etkileri (Kaya et al., 2015), *T. Stigmurus* venomundan elde edilen *Stig A6* ve *StigA16* genlerinin çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerine etkisi (Parente et al., 2018), *A. australis* venomundan elde edilen *G-TI* genini *B. cereus* üzerindeki etkileri (Zerouti et al., 2019) incelenmiştir. Başka bir çalışmada akrep türü *Pandinus imparator*’ dan elde edilen *Pin 2* peptiti ile çeşitli ticari antibiyotiklerin *E. coli* ve *S. aureus* bakteri suşları üzerindeki etkileri karşılaştırıldı. Peptidin bu bakteriler üzerinde *Kloramfenikol*, *streptomisin* ve *kanamisin* antibiyotiklerinden daha güçlü bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (Garcia et al., 2013).

Yapılan bir çalışmada *Androctonus mauritanicus* akrep türünün zehir bileşiminde yer alan *Mauriporin* peptitinin Gram pozitif ve Gram negatif bazı bakterilere karşı bakterisidal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca insan eritrositlerine karşı zayıf hemolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu peptitin *P. aeruginosa* suşunun oluşturduğu biyofilm yapısını önleyebildiği gösterilmiştir. Bakterilerde yaptığı bu etkiyi hücre membranlarında oluşturduğu değişikliklerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Akef, 2019; Almaaytah et al., 2013).

A. crassicauda venomunun *S. aureus* suşlarına karşı etkili olduğu bildirmesine rağmen çalışmamızda olumlu bir sonuç gözlemlenmemiştir. Bunun araştırmamızdan farklı olarak kullanılan ham zehirden kaynaklandığını düşünüyoruz (Alajmi et al., 2020). Ancak Salama ve Geasa (2014) ile uyumlu olarak çalışmamızda *K. pneumoniae*’ ya karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Salama & Geasa, 2014). Mevcut araştırmayla tutarlı olarak, ham *A. crassicauda* venomu ile yapılan bir çalışmada *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* üzerinde etkisinin olmadığı bildirilmiştir, ancak çalışmamızın aksine Al-Asmari ve ark. (2017) bu akrep venomu ile ilgili olarak *K. pneumoniae* bakteri suşuna karşı etkisiz olduğunu bildirmişlerdir (Al-Asmari et al., 2017).

Erdeş vd. (2014) yapmış oldukları *L. abdullahbayramii* ham venomunun antimikrobiyal etkinlikleri ile ilgili çalışmada, araştırmamıza benzer olarak *P. aeruginosa* suşuna karşı etkili olduğunu tespit etmiş olmalarına rağmen (Erdeş et al., 2014), araştırmamızda olumlu sonuç alınamamıştır. Bunun nedeni ham venom ve

yüksek doz kullanıldığından kaynaklanmış olabileceği düşünmekteyiz. Ayrıca Suudi Arabistan bölgesinde yoğun olarak bulunan ve *L. abduallahbayramii* ile genetik benzerliği olan *Leiurus quinquestriatus* ile yapılan çalışmalarda farklı olarak *A. baumannii* (%50,6), *K. pneumoniae* (%35,1), *S. aureus* (%36,4) ve *P. aeruginosa* (%31,3) oranlarında etki ettikleri bildirilmiştir (Al-Asmari et al., 2017).

Koç vd (2020) *L. abduallahbayramii* ve *A. crassicauda* akrep türlerinin de içerisinde olduğu 10 adet farklı akrep türleriyle yapmış oldukları çalışmada, araştırmamıza benzer olarak *S. aureus* ATCC suşlarına karşı etkisiz olduğunu tespit etmiştir (Koç et al., 2020).

Ghoorban vd. (2013) *A. crassicauda* total akrep venomunun araştırmamızda uyguladığımız 1:1 oranında kitosan ile kaplama işlemi sonrası yaptığı karakterizasyon analizinde zeta potansiyel ölçümünde PDI değerini 0,400 ve 267 nm olarak, TEM analizinde 150-300 nm olarak ölçülmüştür (Ghoorban et al., 2013). Araştırmamızda bu çalışmadan farklı olarak PDI 0,466 ve nanopartikül boyutumuz 419,1 nm olarak ölçülmüştür. TEM analizinde ise ortalama boyut 25,42 nm olduğunu tespit ettik.

Kitosan nanopartikül uygulamalarının kontrolü için yapılan diğer bir karakterizasyon yöntemi olan FT-IR spektrometre analizinde diğer çalışmalarla yapılan karşılaştırmalarda kapsülasyonun uygun olduğu çıkan sonuçlardan anlaşılmıştır. OH, NH, alifatik C-H grubunun varlığı, C=O bulunduğu frekans aralıkları benzerlik göstermektedir (Magerusan et al., 2018; Shahadat et al., 2022). Yapılan farklı konulardaki çalışmalarda da karışımında bulunan OH ve C-H gruplarının kitosan ile organik bileşiklerin kapsülasyonun gerçekleştiğini gösterir veri olduğu bildirilmiştir (Yılmaz, 2021).

Kitosan ile yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi amid gruplarının varlığı 1655 cm^{-1} pikeinde göstermekte olup bizim çalışmamız da benzer şekilde 1637 cm^{-1} pikeinde varlığı tespit edilmiştir. Hidroksil grubu (OH) çalışmamızda 3272 cm^{-1} pikeinde tespit etmemize rağmen bu çalışmada 3450 cm^{-1} pikeinde tespit edilmiştir (Taher et al., 2019).

Farklı çalışmalarla paralel olarak araştırmamızda UV-NİS analizinde tespit ettiğimiz 278 nm absorbans kitosan yapısındaki proteinlerdeki aminoasitleri göstermektedir (Ahmad et al., 2003). Bu konuda çok fazla araştırma yapılmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır.

L. quinquestriatus ile BALB/c farelerinde ile yapılan *in vivo* çalışmada zehir uygulanan grubun akciğer dokularında oluşan histopatolojik değişimler; bronşiollerde büyük miktarda katmanlara ayrılmış epitel tabakası ve bazı bölümlerinde hemolize olmuş kan hücreleri veya ölü hücreler bulunduğu, alveoller kalın intraalveolar septalar içerdiği, ayrıca arterlerin hücre infiltrasyonlarıyla tıkanmış olduğu bildirilmiştir (Emam & Al-Otaibi, 2022; Ozkan & Alcigir, 2019). Bakır vd (2021) *Aegaeobuthus nigrocinctus* akrep venomu uygulanan farelerin akciğerlerinde de benzer olarak intraalveolar kılcallarda eritrosit ve nötrofil infiltrasyonu bildirilmiştir (Bakır et al., 2021). Bulguların *L. abdullahbayramii* akrep türü *A. crassicauda* akrep türüne göre daha şiddetli patolojilerin oluşturduğunu göstermiştir (Ozkan & Alcigir, 2019).

Patofizyolojik olarak *Hemiscorpius lepturus* akrep venomu ile yapılan LD₅₀ çalışmasında makroskobik olarak karaciğer, böbrek ve dalak da sırasıyla %71, %66,8 ve %26 oranlarında değişiklikler görüldüğü bildirilmiş (Dehghani et al., 2004), fakat araştırmamızda düşük doz ve total venom enjeksiyonu yapılmadığı için makroskobik bir patolojiye rastlanmamıştır.

Dehghani vd (2006) yaptığı çalışmada; *A. crassicauda* ham venom ile zehirlenmelerin patolojik olarak incelenmesi amacıyla oluşturulan rat gruplarına, 1 µl venom uygulaması yapılmıştır. Bu gruplarda organ ve dokular üzerine makroskobik ve mikroskobik incelemeye tabi tutulmuşlardır. Gözlemlerde %88 oranla en çok etkilenen organın akciğerler olduğu bildirilmiştir. Bunu %64,5 ile beyin ve %59,7 ile böbrekler takip etmiştir. Histopatolojik incelemelerin sonucunda organ ve dokularda zehirin obstrüksiyon, hemorajiler, nekroz ve ödem şeklinde makroskobik etkileri gözlemlenmiştir (Dehghani et al., 2006).

A. crassicauda venomu ile yapılan çalışmalar doz ile zehirlenme arasında doğru orantılı olduğu ve ayrıca Çalışkan vd. (2012) ham venom içerisinde bulunan ve zehirlenmeler ile ilişkili kimyasal bileşikler bulunabilmekte olduğunu bildirmiştir. Bunu yaptıkları denemelerde *A. crassicauda* venomunun 32,42. dk fraksiyonunda fareler için toksik olduğunu göstermiştir (Caliskan et al., 2012).

Matriks metalloproteinazları (MMP), patolojik durumlarda inflamasyonu başlatmak için ekprese edilen yardımcı immunoolojik ajanlar olarak görev yapar. Bu MMP' lerin birincil hedefleri; bağışıklık hücreleri tarafından marginasyonu ve

invazyon süreçlerini kolaylaştırmak için extraselüler matriksin parçalanmasını sağlamak (Chen et al., 2013).

El bakery vd (2020) arı zehirinin kanser hücrelerine karşı tedavisi üzerine yapmış olduğu çalışmada MMP-2 ve MMP-9 verilerinde artışın olduğunu bildirmiştir (El Bakary et al., 2020). Bir diğer çalışmada ise *L. quinquestriatus* türü akrep venomunda bulunan *kholorotoxin* etken maddesinin Cl^- iyon kanallarını bloke ettiği ve tümör hücrelerinin ekspresyonu esnasında MMP-2 reseptörlerini hedef protein olduğu öne sürülmüştür. Özellikle MMP-2 glioma hücrelerinin migrasyonu ve invazyonuna engel olduğu bildirilmiştir (Boltman et al., 2023; Lui et al., 2010).

37 aminoasit kalıntısı içeren bir peptit olan, *A. australis hector* türü akrep venomlarından elde edilen *kailotoksin-2* ile *in vivo* yapılan araştırmada fare akciğer dokusunda MMP-2 ve MMP-9 araştırmamıza paralel olarak önemli ölçüde artış olduğu gözlemlenmiştir. Yine çalışmamızdaki aldığımız sonuçlara benzer olarak akciğer dokusunun histolojik kesitlerinde alveolar septalarda kalınlaşma ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın araştırmamızdan farkı; Taibi-Djennah vd (2018) tarafından yapılan çalışma tedavi etmek amaçlı olmayıp, venomun dokudaki etkisinin araştırılmış olmasıdır (Taibi-Djennah et al., 2018).

Yaptığımız *in vivo* çalışma sırasında ratlarda ölüm gözlemlenmemiştir. Ayrıca herhangi bir lezyon veya semptomatik bir bulguyla da karşılaşılmamıştır. Bu AcraX fraksiyonunun non-toksik bir bileşik olduğunu göstermiştir. Ayrıca önceki yapılan LD₅₀ çalışmaları da araştırmamıza yön vermiş olup literatüre göre hesapladığımız doz neticesinde de ratlarımızda AcraX' e bağlı olarak ölüm gerçekleşmediğini düşünmekteyiz.

XTT analizimizde de sitotoksik etkili olduğu ve hücre hattında kanser hücrelerin üzerine etkili olduğu görülmüştür. Diğer yapılan çalışmalarda da bildirildiği üzere; *A.crassicauda* akrep venomu ile ilgili yapılan anti-kanser çalışmalarında venomun hücre döngüsünün S fazında duraklamaya neden olarak anti-proliferasiyona neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca NO üretim artışı ve mitokondriyal membran depolarizasyonu neden olarak apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır. Bu şekilde kanser hücrelerinin gelişmesine engel olmaktadır (Zargan et al., 2011).

Androctonus australis hektor akrep venomundan elde edilen F3 fraksiyonuyla yapılan HCT 116 hücre hattı ile yapılan MTT analizi aracılığıyla yapılan sitotoksitesite çalışmasında bizim çalışmamıza göre daha az yoğunlukta numune kullanılmasına rağmen canlılık %83 dolaylarında olduğu tespit edilmiştir (Louisa et al., 2020).

Erdeş vd. (2014) *L. abduallahbayramii* total akrep venomunun sitotoksik özelliğini araştırmak için MCF-7 insan epitelyal meme adenokarsinom hücresi ile yaptıkları incelemede 200 µg/ml venomun 24 ve 48 saatlik dilimlerde çalışmamıza uygun olarak sitotoksik olduğunu tespit etmişler ayrıca 48 saatlik dilimde proliferatif etki gösterdiğini bildirmiştir.

Araştırmamızda venomun veya sepsisin dokulardaki etkilerini değerlendirmek için MDA ve GSH analizleri yapılmıştır. Nadjia vd (2015) yaptığı çalışmada *A. australis hektor* türü akrep total venomunun GSH değerini değiştirmezken, MDA değerini karaciğer dokusunda düşürdüğü, ancak venoma ait fraksiyon ile yaptığı analizlerde ise GSH değerini azaltırken MDA değerine etki olmadığını bildirmiştir (Nadjia & Fatima, 2015). *A. amoreuxi* türü akrep venomu ile yapılan kanser çalışmasında ise venom ile tedavi edilen grupta karaciğer ve böbrek dokularında GSH verilerini azalttığı ve MDA verilerini eski değerlerine getirdiği gösterilmiştir (Salem et al., 2016).

Salman vd (2017) *L. quinquestriatus* türü akrepler ile ratlar üzerinde yaptığı çalışmada oksidatif stres belirteci olarak MDA' nın serum seviyesinde arttığını buna karşın GSH seviyesinde azaldığını bildirmiştir (Salman & Hammad, 2017). Araştırmamızda bu çalışmaya göre farklı olarak kontrol grubuna göre sadece *L. abduallahbayramii* uygulanan grupta ciddi bir azalışın olduğu görülmüştür.

Khanbashi vd. (2015) çalışmasında akrep sokmaları sırasında da sitokin fırtınası şeklinde etki gösteren interleokinlerin etkilerini araştırmış. Bu şekilde hem enfeksiyonun seyri, venomların enfeksiyona karşı tepkisi açısından hem de in vivo olarak venoma karşı immun sistemin tepkilerinin ölçümü sağlamışlardır (Khanbashi et al., 2015).

Nemati vd. (2023) *A. crassicauda* total venomunun ratlarda uygulamasında enjeksiyondan 4 saat sonra alınan örneklerde IL-10 seviyesinin kontrol grubuna göre artmış olduğunu ve IL-6 değerinde azalma olduğunu, enjeksiyondan 24 saat sonra alınan örneklerde ise IL-6 ve IL-10 değerlerinin stabil olduğu ve kontrol grubuyla

yapılan karşılaştırma sonucu tespit etmişlerdir (Nemati et al., 2023). Bu çalışmada venomların etkinlikleri araştırılmış olup, bizim araştırmamızda venom tedavi etkisi kontrol edilmiştir. Bundan dolayı hem bakteriye karşı hem de venoma karşı organizmanın savunma mekanizması devreye girdiğinden dolayı TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 parametreleri kontrol grubuna göre farklılık göstererek yükseldikleri tespit edilmiştir.

Zerouti vd. (2019) *Androctonus australis hektor* akrep venomunun *B. cereus* patojenine etkisi ile ilgili yapılan araştırmasında bakteriyel grupta beklenildiği gibi TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6 verilerinde yükselme olduğu, venom ile tedavi edilen gruplarda ise bu değerlerin oldukça düştüğü ve normal seviyelere yakın olduğunu bildirmiştir.

Tityus stigmurus akrep zehirinin *Stigmurus* gen bölgesiyle ile yapılan in vivo çalışmada da TNF- α %70 oranında azalttığı ancak IL-1 β , IL-6 ve IL-10 anlamlı bir değişim olmadığını bildirmiştir (Daniele-Silva et al., 2016). Bunun nedeni olarak cerrahi müdahale sonrası verilen venomdan 6 saat gibi kısa bir süre sonrasında sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildiğinden olabildiği düşünmekteyiz.

4.2. Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak çalışmamızda in vitro ve in vivo ortamı arda *A. crassicauda* venomuna ait fraksiyonumuz ve *K. pneumoniae* suşlarına karşı etki olduğu histopatolojik inceleme amacıyla kullanmış olduğumuz MMP-2 ve MMP-9 eliza yöntemleri ile, ayrıca eş zamanlı yapılan sitokin analizleri sonucunda tespit edilmiştir. Ayrıca in vivo ortamda rejenerasyon kabiliyeti de olduğu yapılan incelemelerde tespit edilmiştir. Ancak *L. abduhbayramii* venomunun etkilerini incelediğimiz bakteri suşlarına karşı etkili olmadığı görülmüştür.

Akrep venomu doğanın bize sunduğu önemli biyolojik ürünlerden biri olarak insan sağlığı açısından daha yoğun olarak araştırılması gereken konulardandır. Özellikle analizlerimizde görüldüğü üzere rejenerasyon yeteneği yüksek bir biyolojik maddedir. Bundan dolayı kanser hücreleri veya farklı otoimmün hastalıklarda faydaları incelenmelidir.

HPLC sonucu elde edilen fraksiyonlar dozlar yükseltilerek farklı mikroorganizmalara etkileri incelenmelidir. Ayrıca bu fraksiyonlardan etkili olanları transkriptomik ve proteomik incelemeleri PCR aracılığıyla daha detaylı incelenmelidir.

KAYNAKÇA

- Abd El, F. E.-Z. A., El Shehaby, D. M., Elghazally, S. A., & Hetta, H. F. (2019). Toxicological and epidemiological studies of scorpion sting cases and morphological characterization of scorpions (*Leiurusquin questriatus* and *Androctonus crassicauda*) in Luxor, Egypt. *Toxicology reports*, 6, 329-335.
- Abushaheen, M. A., Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., & Vellappally, S. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971.
- Açikel, Y. S. (2020). Investigation of adsorption of metronidazole on Chitosan-Halloysite nanocomposites and controlled release. *Indian Journal of Chemical Technology (IJCT)*, 27(2), 101-115.
- Adams, M. D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K. M., Lavender, H., Jamison, J. J., MacDonald, I. J., Martin, K. M., Russo, T., & Campagnari, A. A. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, 190(24), 8053-8064.
- Ahire, P. S., Bhambere, D. S., Patil, M. P., & Kshirsagar, S. J. (2020). Recent advances in nanosponges as a drug delivery system. *Indian J Drugs*, 8, 8-17.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 28(4), 313-318.
- Ahmadi, S., Knerr, J. M., Argemi, L., Bordon, K. C., Pucca, M. B., Cerni, F. A., Arantes, E. C., Çalışkan, F., & Laustsen, A. H. (2020). Scorpion venom: Detriments and benefits. *Biomedicines*, 8(5), 118.
- Akef, H. M. (2019). Anticancer and antimicrobial activities of scorpion venoms and their peptides. *Toxin Reviews*, 38(1), 41-53.
- Al-Asmari, A. K., Alamri, M. A., Almasoudi, A. S., Abbasmanthiri, R., & Mahfoud, M. (2017). Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of selected Saudi scorpion venoms tested against multidrug-resistant micro-organisms. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, 14-18.
- Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.-L., Hamze, M., & Kempf, M. (2016). Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 49.
- Alajmi, R., Al-ghamdi, S., Barakat, I., Mahmoud, A., Abdon, N., Al-Ahidib, M., & Abdel-Gaber, R. (2020). Antimicrobial activity of two novel venoms from Saudi arabian scorpions (*Leiurus quinquestriatus* and *androctonus crassicauda*). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 67-74.

- Ali, S. W., Rajendran, S., & Joshi, M. (2011). Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 438-446.
- Almaaytah, A., Tarazi, S., Mhaidat, N., Al-Balas, Q., & Mukattash, T. L. (2013). Mauriporin, a novel cationic α -helical peptide with selective cytotoxic activity against prostate cancer cell lines from the venom of the scorpion *Androctonus mauritanicus*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19, 281-293.
- Alqahtani, F., Aleanizy, F., El Tahir, E., Alhabib, H., Alsaif, R., Shazly, G., AlQahtani, H., Alsarra, I., & Mahdavi, J. (2020). Antibacterial activity of chitosan nanoparticles against pathogenic *N. gonorrhoea*. *International Journal of Nanomedicine*, 7877-7887.
- Alshammari, A., Anwar, F. A., Mohamed, S. A.-A., & Abdelsater, N. (2023). Antihelminthic effect of *Androctonus crassicauda* scorpion venom against *Trichuris arvicolae* isolated from *Psammomys obesus* in Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 103713.
- Angsanakul, J., & Sitprija, V. (2013). Scorpion venoms, kidney and potassium. *Toxicon*, 73, 81-87.
- Anuj, S. A., Gajera, H. P., Hirpara, D. G., & Golakiya, B. A. (2019). Interruption in membrane permeability of drug-resistant *Staphylococcus aureus* with cationic particles of nano-silver. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 127, 208-216.
- Artuso, I., Lucidi, M., Visaggio, D., Capecchi, G., Lugli, G. A., Ventura, M., & Visca, P. (2022). Genome diversity of domesticated *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T strains. *Microbial Genomics*, 8(1), 000749.
- Asif, F., Zaman, S. U., Arnab, M. K. H., Hasan, M., & Islam, M. M. (2024). Antimicrobial Peptides as Therapeutics: Confronting Delivery Challenges to Optimize Efficacy. *The Microbe*, 100051.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., & Qamar, M. U. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645.
- Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., & Rafiee-Tehrani, M. (2010). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 58-63.
- Ayhan, M., Kalem, A. K., Hasanoglu, I., Kayaaslan, B., Ozates, M. O., Izdes, S., Halacli, B., & Guner, H. R. (2021). Intrathecal and intraventricular

- administration of antibiotics in gram-negative nosocomial meningitis in a research hospital in Turkey. *Turkish Neurosurgery*, 31(3), 348-354.
- Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*, 9(3), 119.
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- Bakir, F., Ozkan, O., Alcigir, M. E., & Vural, S. A. (2012). Effects of *Androctonus crassicauda* scorpion venom on the heart tissue. *Journal of animal and veterinary advances*.
- Bakır, F., Ozkan, O., Alcigir, M. E., & Yagmur, E. A. (2021). The lethality, histological, haematological and biochemical alterations in mice envenomated with *Aegaeobuthus nigrocinctus* venom. *Toxicon*, 200, 118-126.
- Barcudi, D., Sosa, E. J., Lamberghini, R., Garnerio, A., Tosoroni, D., Decca, L., Gonzalez, L., Kuyuk, M. A., Lopez, T., & Herrero, I. (2020). MRSA dynamic circulation between the community and the hospital setting: New insights from a cohort study. *Journal of Infection*, 80(1), 24-37.
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context*, 7, 212527. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Bassetti, M., Vena, A., Sepulcri, C., Giacobbe, D. R., & Peghin, M. (2020). Treatment of bloodstream infections due to Gram-negative bacteria with difficult-to-treat resistance. *Antibiotics*, 9(9), 632.
- Bayatzadeh, M. A., Mirakabadi, A. Z., Babaei, N., Doulah, A. H., & Doosti, A. (2020). Characterization, molecular modeling and phylogenetic analysis of a long mammalian neurotoxin from the venom of the Iranian scorpion *Androctonus crassicauda*. *Biologia*, 75(7), 1029-1041.
- Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS microbiology reviews*, 43(2), 123-144.
- Bogdanov, S. (2015). Bee venom: composition, health, medicine: a review. *Peptides*, 1, 1-20.
- Boltman, T., Meyer, M., & Ekpo, O. (2023). Diagnostic and Therapeutic Approaches for Glioblastoma and Neuroblastoma Cancers Using Chlorotoxin Nanoparticles. *Cancers*, 15(13), 3388.
- Bordon, K. d. C. F., Cologna, C. T., Fornari-Baldo, E. C., Pinheiro-Júnior, E. L., Cerni, F. A., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P., Cordeiro, F. A., Wiesel, G. A., & Cardoso, I. A. (2020). From animal poisons and venoms to medicines:

- achievements, challenges and perspectives in drug discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1132.
- Borges, A., & Lomonte, B. (2023). Venomics of *Leiurus abdullahbayrami*, the most lethal scorpion in the Levant region of the Middle East. *Toxicon*, 107548.
- Borges, A., & Yağmur, E. A. (2022). First record of the medically significant scorpion *Leiurus abdullahbayrami* (Scorpiones: Buthidae) for Lebanon. *Arachnologische Mitteilungen: Arachnology Letters*, 63(1), 7-10.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, 48(1), 1-12.
- Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*, 19(8), 419-426.
- Bücherl, W. (1971). Classification, biology and venom extraction of scorpions. *Venomous animals and their venoms. Venomous invertebrates*, 3, 317-347.
- Caliskan, F., García, B. I., Coronas, F. I., Restano-Cassulini, R., Korkmaz, F., Sahin, Y., Corzo, G., & Possani, L. D. (2012). Purification and cDNA cloning of a novel neurotoxic peptide (Acra3) from the scorpion *Androctonus crassicauda*. *Peptides*, 37(1), 106-112.
- Caliskan, F., Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Coronas-Valderrama, F. I., Corzo, G., & Possani, L. D. (2013). Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na⁺-channel α -type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom. *Biochimie*, 95(6), 1216-1222.
- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompart, C. M., Albertí, S., & Bengoechea, J. A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity*, 72(12), 7107-7114.
- Chen, N., Xu, S., Zhang, Y., & Wang, F. (2018). Animal protein toxins: origins and therapeutic applications. *Biophys Rep*, 4(5), 233-242. <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0067-x>
- Chen, Q., Jin, M., Yang, F., Zhu, J., Xiao, Q., & Zhang, L. (2013). Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators of inflammation*, 2013.
- Chen, Y., He, Y., Zhang, W., Huang, Y., Fu, J., Fu, F., & Zhou, Y. (2020). Pathogenic characteristics of nosocomial infections in patients with cerebrovascular diseases and characteristics and treatment of pathogenic bacteria in different seasons. *Journal of Infection and Public Health*, 13(5), 800-805.

- Chippaux, J.-P. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug design, development and therapy*, 6, 165.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K., He, W., Norton, R., & Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal*, 359(Pt 1), 35.
- Çevik, Y. N., & Kanat, M. A. (2022). MALDI-TOFMS ile iki türdeş (*Leiurus abduhbayrami*; Buthidae) akrep zehirindeki peptit ve proteinlerin karşılaştırmalı analizi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 15(2), 186-194.
- Daniele-Silva, A., Machado, R. J., Monteiro, N. K., Estrela, A. B., Santos, E. C., Carvalho, E., Júnior, R. F. A., Melo-Silveira, R. F., Rocha, H. A. O., & Silva-Júnior, A. A. (2016). Stigmurin and TsAP-2 from *Tityus stigmurus* scorpion venom: assessment of structure and therapeutic potential in experimental sepsis. *Toxicon*, 121, 10-21.
- Dehghani, R., & Arani, M. G. (2015). Scorpion sting prevention and treatment in ancient Iran. *J Tradit Complement Med*, 5(2), 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.007>
- Dehghani, R., Khamechian, T., Rafiezadeh, M., & Nasajizavareh, M. (2004). Histopathological assessment of *Hemiscorpius lepturus* venom effects on rats. *Iran J Leg Med*, 10, 202-206.
- Dehghani, R., Khamehchian, T., & Asadi, M. (2006). The Effect of *Androctonus Crassicauda* Venom on Pathological Changes of Rat. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences*, 9(4).
- Denis, O. (2017). Route of transmission of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2), 124-125.
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., & Kisich, K. O. (2009). The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Current pharmaceutical design*, 15(21), 2377-2392.
- Díaz-García, A., & Varela, D. (2020). Voltage-Gated K⁺/Na⁺ Channels and Scorpion Venom Toxins in Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 913.
- Dokur, M., Dogan, M., & Yagmur, E. A. (2017). Scorpion-related cardiomyopathy and acute pulmonary edema in a child who is stung by *Leiurus abduhbayrami*. *Turkish journal of emergency medicine*, 17(3), 104-108.
- Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), 351-368.
- Dubos, R. J. (1939). Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 70(1), 1.

- Ealia, S. A. M., & Saravanakumar, M. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. IOP conference series: materials science and engineering,
- El Bakary, N. M., Alsharkawy, A. Z., Shouaib, Z. A., & Barakat, E. M. (2020). Role of bee venom and melittin on restraining angiogenesis and metastasis in γ -irradiated solid ehrlich carcinoma-bearing mice. *Integrative cancer therapies*, 19, 1534735420944476.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.
- Emam, N. M., & Al-Otaibi, A. M. (2022). Protective Effects of Ambrosia maritima and Allium sativum Plant Extracts on Different Tissues of Envenomed mice with Leiurus quinquestriatus Scorpion Venom. *Journal of Bioscience and Applied Research*, 8(1), 57-76.
- Emel Uyanıkgil, Ö. Ç., & Salmanoğlu, D. S. (2020). Metalik nanopartiküllerin hedeflendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 59(1), 71-81.
- Erdeş, E., Doğan, T. S., Coşar, İ., Danişman, T., Kunt, K. B., Şeker, T., Yücel, M., & Özen, C. (2014). Characterization of Leiurus abdullahbayrami (Scorpiones: Buthidae) venom: peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20, 1-8.
- Erkmen, O. (2012). *Türkiye'deki Mesobuthus gibbosus' un (Ordo: Scorpiones) morfometrik analizi* Niğde Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Filazi, A., & Özkan, Ö. (2021). Türkiye'de akrep serumunun tarihi. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 78(1).
- Gaddy, J. A., & Actis, L. A. (2009). Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation.
- Galindo-Rodriguez, S. A., Allemann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2005). Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Critical reviews™ in therapeutic drug carrier systems*, 22(5).
- Garcia, F., Villegas, E., Espino-Solis, G. P., Rodriguez, A., Paniagua-Solis, J. F., Sandoval-Lopez, G., Possani, L. D., & Corzo, G. (2013). Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. *The Journal of antibiotics*, 66(1), 3-10.
- Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M. D., & Heifets, L. (2005). The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172(12), 1487-1490.

- Ghoorban, D. O., MIR, M. S. A., Farhangi, N., Forouhar, N., Mohammadpour, N., & Avadi, M. R. (2013). Preparation, characterization and in vitro studies of chitosan nanoparticles containing *Androctonus Crassicauda* scorpion venom.
- Gordon, N. C., & Wareham, D. W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 219-226.
- Gwee, M. C., Nirthan, S., Khoo, H. E., Gopalakrishnakone, P., Kini, R. M., & Cheah, L. S. (2002). Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 29(9), 795-801.
- Halawa, E. M., Fadel, M., Al-Rabia, M. W., Behairy, A., Nouh, N. A., Abdo, M., Olga, R., Fericean, L., Atwa, A. M., & El-Nablaway, M. (2024). Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1305294.
- Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J., & Bakar, M. A. (2018). Health care-associated infections—an overview. *Infection and Drug Resistance*, 11, 2321.
- Harada, S., Aoki, K., Yamamoto, S., Ishii, Y., Sekiya, N., Kurai, H., Furukawa, K., Doi, A., Tochitani, K., & Kubo, K. (2019). Clinical and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bloodstream infections in Japan: occurrence of hypervirulent infections in health care. *Journal of clinical microbiology*, 57(11), e01206-01219.
- Harman, R., & Günseren, F. (2021). Uygunsuz antibiyotik kullanımı ve antibiyotik kullanımına bağlı advers olayların araştırılması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 78(1), 3-14.
- Haro Girón, S., Monserrat Sanz, J., Ortega, M. A., Garcia-Montero, C., Fraile-Martínez, O., Gómez-Lahoz, A. M., Boaru, D. L., de Leon-Oliva, D., Guijarro, L. G., & Atienza-Perez, M. (2023). Prognostic value of malondialdehyde (MDA) in the temporal progression of chronic spinal cord injury. *Journal of Personalized Medicine*, 13(4), 626.
- Hasan, H. F., Galal, S. M., & Ellethy, R. A. (2022). Mitigative impact of bradykinin potentiating factor isolated from *Androctonus amoreuxi* scorpion venom and low doses of γ -irradiation on doxorubicin induced hepatotoxicity through ang II/AMPK crosstalk. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 32(7), 518-529.
- Hashemzadeh, M., Furukawa, M., Goldsberry, S., & Movahed, M. R. (2008). Chemical structures and mode of action of intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor blockers: a review. *Experimental & Clinical Cardiology*, 13(4), 192.
- Hassan, A. K., Elfeky, E. M., Abbas, O. A., & Hefny, M. A. (2019). Potential Anti-Inflammatory Effects of the Egyptian Scorpion (*Androctonus amoreuxi*)

Venom in Rheumatoid Rat Model. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 11(2), 85-102.

- Hayat, S., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, Z., Hussain, S. Z., Sabri, A. N., & Jamil, S. (2018). In vitro antibiofilm and anti-adhesion effects of magnesium oxide nanoparticles against antibiotic resistant bacteria. *Microbiology and immunology*, 62(4), 211-220.
- He, X., Lu, F., Yuan, F., Jiang, D., Zhao, P., Zhu, J., Cheng, H., Cao, J., & Lu, G. (2015). Biofilm formation caused by clinical *Acinetobacter baumannii* isolates is associated with overexpression of the AdeFGH efflux pump. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 4817-4825.
- Herasimenka, Y., Benincasa, M., Mattiuzzo, M., Cescutti, P., Gennaro, R., & Rizzo, R. (2005). Interaction of antimicrobial peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens. *Peptides*, 26(7), 1127-1132.
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., & Severin, J. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), E3574-E3581.
- Hormozi, S. F., Vasei, N., Aminianfar, M., Darvishi, M., & Saeedi, A. A. (2018). Antibiotic resistance in patients suffering from nosocomial infections in Besat Hospital. *European journal of translational myology*, 28(3).
- Hu, L., Sun, Y., & Wu, Y. (2013). Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. *Nanoscale*, 5(8), 3103-3111.
- Huang, G., Liu, Y., & Chen, L. (2017). Chitosan and its derivatives as vehicles for drug delivery. *Drug Delivery*, 24(2), 108-113.
- Jaisankar, A. I., Girija, A. S., Gunasekaran, S., & Priyadharsini, J. V. (2020). Molecular characterisation of *csgA* gene among ESBL strains of *A. baumannii* and targeting with essential oil compounds from *Azadirachta indica*. *Journal of King Saud University-Science*, 32(8), 3380-3387.
- JAVED, M., HUSSAIN, S., KHAN, M. A., TAJAMMAL, A., FATIMA, H., AMJAD, M., ZAHID, A., UMER, M., ALI, S. A., & YAQOOB, M. (2022). Potential of Scorpion Venom for the treatment of various diseases. *International Journal of Chemistry Research*, 1-9.
- Jenner, R., & Undheim, E. (2017). *Venom: the secrets of nature's deadliest weapon*. Smithsonian Institution.
- Jhaveri, J., Raichura, Z., Khan, T., Momin, M., & Omri, A. (2021). Chitosan nanoparticles-insight into properties, functionalization and applications in drug delivery and theranostics. *Molecules*, 26(2), 272.

- Jolodar, A. (2019). Molecular Characterization of a Three-disulfide Bridges Beta-like Neurotoxin from *Androctonus crassicauda* Scorpion Venom. *Archives of Razi Institute*, 74(2), 135-142.
- Juan, C.-H., Chuang, C., Chen, C.-H., Li, L., & Lin, Y.-T. (2019). Clinical characteristics, antimicrobial resistance and capsular types of community-acquired, healthcare-associated, and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1-9.
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *The International journal of artificial organs*, 34(9), 737-751.
- Karruli, A., Catalini, C., D'Amore, C., Foglia, F., Mari, F., Harxhi, A., Galdiero, M., & Durante-Mangoni, E. (2023). Evidence-Based Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Critical Reappraisal. *Antibiotics*, 12(2), 399.
- Kaya, M., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y. S., Tozak, K. O., Mol, A., Montes, A., & Sezen, G. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20, 168-179.
- Kazemi, S. M., & Sabatier, J.-M. (2019). Venoms of Iranian scorpions (Arachnida, Scorpiones) and their potential for drug discovery. *Molecules*, 24(14), 2670.
- Khalili, H., Soltani, R., Gholami, K., Rasoolinejad, M., & Abdollahi, A. (2010). Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospitalized patients in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 125-132.
- Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 478-482.
- Khanbashi, S., Khodadadi, A., Assarehzadegan, M.-A., Pipelzadeh, M. H., Vazirianzadeh, B., Hosseinzadeh, M., Rahmani, A. H., & Asmar, A. (2015). Assessment of immunogenic characteristics of *Hemiscorpius lepturus* venom and its cross-reactivity with venoms from *Androctonus crassicauda* and *Mesobuthus eupeus*. *Journal of immunotoxicology*, 12(3), 217-222.
- Khodadadi, A., Pipelzadeh, M. H., Vazirianzadeh, B., Pipelzadeh, M., & Sharifat, M. (2012). An in vitro comparative study upon the toxic properties of the venoms from *Hemiscorpius lepturus*, *Androctonus crassicauda* and *Mesobuthus eupeus* scorpions. *Toxicon*, 60(3), 385-390.
- Kiaie, N., Aghdam, R. M., Tafti, S. H., & Emami, S. H. (2016). Statistical optimization of chitosan nanoparticles as protein vehicles, using response surface methodology. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 14(4), 413-422.

- KILIÇ, G. B., & Karahan, A. G. (2010). Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin tanısında kullanılması. *Gıda*, 35(6), 445-452.
- King, G. (2013). Venoms to drugs: translating venom peptides into therapeutics. *Australian Biochemist*, 44(3).
- Koç, H., Avşar, C., & Bayrakçı, Y. (2020). Antimicrobial Activity of Hemolymph and Venom Obtained from Some Scorpion Species Bazı Akrep Türlerinden Elde Edilen Hemolenf ve Zehrin Antimikrobiyal Aktivitesi.
- Kosar, I., Dinc, G., Eren, E., Aykemat, Y., Kilic, M., Kilic, H., & Doganay, M. (2021). Investigation of double-carbapenem efficiency in experimental sepsis of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Northern Clinics of Istanbul*, 8(2), 113.
- Kościuczuk, E. M., Lisowski, P., Jarczak, J., Strzałkowska, N., Jóźwik, A., Horbańczuk, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., & Bagnicka, E. (2012). Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Molecular biology reports*, 39, 10957-10970.
- Krämer, J., Lüddecke, T., Marner, M., Maiworm, E., Eichberg, J., Hardes, K., Schäberle, T. F., Vilcinskas, A., & Predel, R. (2022). Antimicrobial, insecticidal and cytotoxic activity of linear venom peptides from the pseudoscorpion *Chelifer cancrivorus*. *Toxins*, 14(1), 58.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4.
- Kuş, H., Arslan, U., & Findık, D. (2017). Investigation of various virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from nosocomial infections. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 51(4), 329-339.
- Lacey, K. A., Gonzalez, S., Yeung, F., Putzel, G., Podkowik, M., Pironti, A., Shopsis, B., Cadwell, K., & Torres, V. J. (2022). Microbiome-Independent Effects of Antibiotics in a Murine Model of Nosocomial Infections. *mBio*, e01240-01222.
- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*, 30(3), 131-141.
- Lakoh, S., Li, L., Sevalie, S., Guo, X., Adekanmbi, O., Yang, G., Adebayo, O., Yi, L., Coker, J. M., & Wang, S. (2020). Antibiotic resistance in patients with clinical features of healthcare-associated infections in an urban tertiary hospital in Sierra Leone: a cross-sectional study. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 1-10.
- Latifi, M., & Tabatabai, M. (1979). Immunological studies on Iranian scorpion venom and antiserum. *Toxicon*, 17(6), 617-620.

- Lee, S., Li, J., Zhou, X., Yin, J., & Yoon, J. (2018). Recent progress on the development of glutathione (GSH) selective fluorescent and colorimetric probes. *Coordination Chemistry Reviews*, 366, 29-68.
- Lev, A. I., Astashkin, E. I., Kislichkina, A. A., Solovieva, E. V., Kombarova, T. I., Korobova, O. V., Ershova, O. N., Alexandrova, I. A., Malikov, V. E., & Bogun, A. G. (2018). Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathogens and global health*, 112(3), 142-151.
- Lin, M.-F., Lin, Y.-Y., Tu, C.-C., & Lan, C.-Y. (2017). Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(2), 224-231.
- Longo, L. G., de Sousa, V. S., Kraychete, G. B., Justo-da-Silva, L. H., Rocha, J. A., Superti, S. V., Bonelli, R. R., Martins, I. S., & Moreira, B. M. (2019). Colistin resistance emerges in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 54(5), 579-586.
- Louisa, B., Fatima, L.-D., & Djelila, H.-T. (2020). Cytotoxic activity Characterization of Scorpion Venom Components on Cancer Cell line. *Algerian Journal of Health Sciences*, 51.
- Lourenço, W. R. (2014). A historical approach to scorpion studies with special reference to the 20 th and 21st centuries. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20, 1-9.
- Lourenço, W. R. (2018). The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 24.
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 111(9), 1265-1273.
- Lui, V. C. H., Lung, S. S. S., Pu, J. K. S., Hung, K. N., & Leung, G. K. K. (2010). Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including ClC-3. *Anticancer Research*, 30(11), 4515-4524.
- Ma, R., Wong, S. W., Ge, L., Shaw, C., Siu, S. W., & Kwok, H. F. (2020). In vitro and MD simulation study to explore physicochemical parameters for antibacterial peptide to become potent anticancer peptide. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 16, 7-19.
- Mączyńska, B., Paleczny, J., Oleksy-Wawrzyniak, M., Choroszy-Król, I., & Bartoszewicz, M. (2021). In vitro susceptibility of multi-drug resistant *klebsiellapneumoniae* strains causing nosocomial infections to fosfomycin. A comparison of determination methods. *Pathogens*, 10(5), 512.

- Magerusan, L., Pogacean, F., Coros, M., Socaci, C., Pruneanu, S., Leostean, C., & Pana, I. O. (2018). Green methodology for the preparation of chitosan/graphene nanomaterial through electrochemical exfoliation and its applicability in Sunset Yellow detection. *Electrochimica Acta*, 283, 578-589.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Harbarth, S., Hindler, J., Kahlmeter, G., & Olsson-Liljequist, B. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194.
- Mashaly, G. E.-S., & Badr, D. (2022). Adhesins Encoding Genes and Biofilm formation as Virulence Determinants in Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Causing Hospital Acquired Infections. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 31(3), 125-133.
- Matuschek, E., Brown, D. F., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical microbiology and infection*, 20(4), O255-O266.
- Matute-Bello, G., Downey, G., Moore, B. B., Groshong, S. D., Matthay, M. A., Slutsky, A. S., & Kuebler, W. M. (2011). An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 44(5), 725-738.
- Mikušová, V., & Mikuš, P. (2021). Advances in chitosan-based nanoparticles for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9652.
- Millar, B., Loughrey, A., Elborn, J., & Moore, J. (2007). Proposed definitions of community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA). *Journal of Hospital Infection*, 67(2), 109-113.
- Mishal, R., Tahir, H. M., Zafar, K., & Arshad, M. (2013). Anti-cancerous applications of scorpion venom. *Int J Biol Pharm Res*, 4(5), 356-360.
- Monahan, C., Nag, R., Morris, D., & Cummins, E. (2021). Antibiotic residues in the aquatic environment—current perspective and risk considerations. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 56(7), 733-751.
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. (2017). Pseudomonas aeruginosa lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39.

- Mureed, S., Naz, S., Haider, A., Raza, A., Ul-Hamid, A., Haider, J., Ikram, M., Ghaffar, R., Irshad, M., & Ghaffar, A. (2021). Development of multi-concentration Cu: Ag Bimetallic nanoparticles as a promising bactericidal for antibiotic-resistant bacteria as evaluated with molecular docking study. *Nanoscale Research Letters*, 16(1), 1-12.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., & Wool, E. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The lancet*, 399(10325), 629-655.
- Mwangi, J., Hao, X., Lai, R., & Zhang, Z.-Y. (2019). Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zoological research*, 40(6), 488.
- Nadjia, B., & Fatima, L.-D. (2015). Beneficial effects of *Androctonus australis* hector venom and its non-toxic fraction in the restoration of early hepatocyte-carcinogenesis induced by FB1 mycotoxin: involvement of oxidative biomarkers. *Experimental and molecular pathology*, 99(2), 198-206.
- Naser, M. D., Rezvan, Y., & Hossein, Z. (2015). A new antigen delivery vehicle candidate: *Orthochirus iran* scorpion venom entrapped in chitosan nanoparticles. *J. Pharmaceut. Res*, 7(4), 264-275.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 252-275.
- Nejati, J., Saghaifipour, A., Rafinejad, J., Mozaffari, E., Keyhani, A., Abolhasani, A., & Kareskh, A. T. (2018). Scorpion composition and scorpionism in a high-risk area, the southwest of Iran. *Electronic physician*, 10(7), 7138.
- Nemati, M., Mohammadpour, N., Zare Mirakabadi, A., Salabi, F., & Khosravi, M. (2023). Effects of *Androctonus crassicauda* scorpion venom on the release of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rats. *Veterinary Research & Biological Products*, 36(1), 73-82.
- Nichol, K. A., Adam, H. J., Golding, G. R., Lagacé-Wiens, P. R., Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., & Zhanel, G. G. (2019). Characterization of MRSA in Canada from 2007 to 2016. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(Supplement_4), iv55-iv63.
- Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, 93, 125-135.
- Ozel, S., Demirel, M. A., ERCAN GOKAY, N., & Ozkan, O. (2019). The Effects of *Androctonus crassicauda* Venom on Pregnant Rats and Their Offsprings. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 25(6).

- Ozkan, O., Adiguzel, S., Kar, S., Kurt, M., Yakistiran, S., Cesaretli, Y., Orman, M., & Karaer, Z. (2007). Effects of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807)(scorpiones: buthidae) venom on rats: correlation among acetylcholinesterase activities and electrolytes levels. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 13, 69-81.
- Ozkan, O., Adigüzel, S., Yakiştiran, S., CESARETLİ, Y., Orman, M., & Karaer, K. Z. (2006). *Androctonus crassicauda* (Olivier 1807) scorpionism in the Sanliurfa provinces of Turkey. *Head and Neck*, 6(2), 0.
- Ozkan, O., & Alcigir, M. E. (2019). A Comparative pathomorphological findings between *Leiurus abdullahbayrami* and *Androctonus crassicauda* (Scorpion: Buthidae) envenomation in rabbit animal model. *Journal of arthropod-borne diseases*, 13(1), 104.
- Ozkan, O., & Carhan, A. (2008). The neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Toxicon*, 52(2), 375-379.
- Ozkan, O., Yagmur, E., & Ark, M. (2011a). A newly described scorpion species, *Leiurus abdullahbayrami* (Scorpion: Buthidae), and the lethal potency and in vivo effects of its venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17(4), 414-421.
- Ozkan, O., Yagmur, E., & Ark, M. (2011b). A newly described scorpion species, *Leiurus abdullahbayrami* (Scorpion: Buthidae), and the lethal potency and in vivo effects of its venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17, 414-421.
- Özkan, Ö. (2008). Akrep antivenom üretimi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65(2), 97-108.
- Özkan, Ö., & Karaer, K. Z. Akreplerin biyolojisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(1), 51-60.
- ÖZKAN, Ö., & KARAER, K. Z. (2004). Akreplerin Vücut Yapıları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 28, 54-58.
- Özkan, Ö., & Karaer, K. Z. (2007). Akreplerin biyolojisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(1), 51-60.
- Özlu Ekmekçioğlu, G. (2019). ÇOKLU İLAÇ DİRENCİNE SAHİP BİYOFİLM OLUŞTURAN NOZOKOMİAL BAKTERİLERE KARŞI AKREP (SCORPIONIDAE) ZEHİRİNİN ETKİLERİ [Kastamonu Üniversitesi].
- Pachori, P., Gothwal, R., & Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & diseases*, 6(2), 109-119.

- Pan, Y., Li, Y.-j., Zhao, H.-y., Zheng, J.-m., Xu, H., Wei, G., & Hao, J.-s. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International journal of pharmaceutics*, 249(1-2), 139-147.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177-192.
- Panteleev, P., Bolosov, I., Balandin, S., & Ovchinnikova, T. (2015). Structure and biological functions of β -hairpin antimicrobial peptides. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 7(1 (24)), 37-47.
- Parente, A. M., Daniele-Silva, A., Furtado, A. A., Melo, M. A., Lacerda, A. F., Queiroz, M., Moreno, C., Santos, E., Rocha, H. A., & Barbosa, E. G. (2018). Analogs of the scorpion venom peptide stigmurin: structural assessment, toxicity, and increased antimicrobial activity. *Toxins*, 10(4), 161.
- Park, E., Ryu, J. H., Lee, D., & Lee, H. (2021). Freeze–thawing-induced macroporous catechol hydrogels with shape recovery and sponge-like properties. *ACS biomaterials science & engineering*, 7(9), 4318-4329.
- Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(10), 3471-3484.
- Polis, G. A. (1990). *The biology of scorpions*.
- Porras Gómez, M., Vega Baudrit, J., & Núñez Corrales, S. (2012). Overview of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and novel therapeutic approaches.
- Possani, L. D., Becerril, B., Tytgat, J., & Delepierre, M. (2001). High affinity scorpion toxins for studying potassium and sodium channels. In *Ion Channel Localization* (pp. 145-165). Springer.
- Raja, Z., André, S., Abbassi, F., Humblot, V., Lequin, O., Bouceba, T., Correia, I., Casale, S., Foulon, T., & Sereno, D. (2017). Insight into the mechanism of action of temporin-SHa, a new broad-spectrum antiparasitic and antibacterial agent. *PLoS One*, 12(3), e0174024.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates*, 13(6), 151-171.
- Rammelkamp, C. H., & Weinstein, L. (1942). Toxic effects of tyrothricin, gramicidin and tyrocidine. *The Journal of Infectious Diseases*, 71(2), 166-173.
- Ranjbar, R., Kelishadrokh, A. F., & Chehelgerdi, M. (2019). Molecular characterization, serotypes and phenotypic and genotypic evaluation of antibiotic resistance of the *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from

- different types of hospital-acquired infections. *Infection and Drug Resistance*, 12, 603.
- Revelas, A. (2012). Healthcare-associated infections: A public health problem. *Nigerian medical journal: journal of the Nigeria Medical Association*, 53(2), 59.
- Rocha, A. J., Barsottini, M. R. d. O., Rocha, R. R., Laurindo, M. V., Moraes, F. L. L. d., & Rocha, S. L. d. (2019). Pseudomonas aeruginosa: virulence factors and antibiotic resistance genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62.
- Rodríguez-Baño, J., Martí, S., Soto, S., Fernández-Cuenca, F., Cisneros, J. M., Pachón, J., Pascual, A., Martínez-Martínez, L., McQueary, C., & Actis, L. (2008). Biofilm formation in Acinetobacter baumannii: associated features and clinical implications. *Clinical microbiology and infection*, 14(3), 276-278.
- Rubio, T., Gagné, S., Debruyne, C., Dias, C., Cluzel, C., Mongellaz, D., Rousselle, P., Göttig, S., Seifert, H., & Higgins, P. G. (2022). Incidence of an Intracellular Multiplication Niche among Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. *Msystems*, 7(1), e00488-00421.
- Saadi, S., Assarehzadegan, M.-A., Pipelzadeh, M. H., & Hadaddezfuli, R. (2015). Induction of IL-12 from human monocytes after stimulation with Androctonus crassicauda scorpion venom. *Toxicon*, 106, 117-121.
- Sakoulas, G., & Moellering Jr, R. C. (2008). Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. *Clinical infectious diseases*, 46(Supplement_5), S360-S367.
- Salabi, F., & Jafari, H. (2022). Differential venom gland gene expression analysis of juvenile and adult scorpions Androctonus crassicauda. *BMC genomics*, 23(1), 636.
- Salama, W., & Geasa, N. (2014). Investigation of the antimicrobial and hemolytic activity of venom of some Egyptian scorpion. *J Microbiol Antimicrob*, 6(1), 21-28.
- Salem, M. L., Shoukry, N. M., Teleb, W. K., Abdel-Daim, M. M., & Abdel-Rahman, M. A. (2016). In vitro and in vivo antitumor effects of the Egyptian scorpion Androctonus amoreuxi venom in an Ehrlich ascites tumor model. *Springerplus*, 5, 1-12.
- Salman, M. M., & Hammad, S. (2017). Oxidative stress and some biochemical alterations due to scorpion (Leiurus quinquestriatus) crude venom in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 1017-1021.
- San Millan, A. (2018). Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends in microbiology*, 26(12), 978-985.

- Sanz-García, F., Hernando-Amado, S., & Martínez, J. L. (2018). Mutation-driven evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of either ceftazidime or ceftazidime-avibactam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(10), e01379-01318.
- Sarshar, M., Behzadi, P., Scribano, D., Palamara, A. T., & Ambrosi, C. (2021). *Acinetobacter baumannii*: an ancient commensal with weapons of a pathogen. *Pathogens*, 10(4), 387.
- Schwarz, S., Cloeckert, A., & Roberts, M. C. (2005). Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*, 73-98.
- Shahadat, M., Jha, A., Adnan, R., Ali, S. W., Ismail, I. M., Oves, M., & Ahammad, S. Z. (2022). Recent advances in chitosan-polyaniline based nanocomposites for environmental applications: a review. *Polymer*, 254, 124975.
- Shoukry, N. M., Salem, M. L., Teleb, W. K., Abdel Daim, M. M., & Abdel-Rahman, M. A. (2020). Antinociceptive, antiinflammatory, and antipyretic effects induced by the venom of Egyptian scorpion *Androctonus amoreuxi*. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s41936-020-00191-x>
- Sikora, A., & Zahra, F. (2022). Nosocomial infections. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Stryjewski, M. E., & Corey, G. R. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clinical infectious diseases*, 58(suppl_1), S10-S19.
- Suetens, C., Latour, K., Kärki, T., Ricchizzi, E., Kinross, P., Moro, M. L., Jans, B., Hopkins, S., Hansen, S., & Lyytikäinen, O. (2018). Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Eurosurveillance*, 23(46), 1800516.
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2066.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., & Carmeli, Y. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327.
- Taher, F., Ibrahim, S. A., Abd El-Aziz, A., Abou El-Nour, M. F., El-Sheikh, M. A., El-Husseiny, N., & Mohamed, M. M. (2019). Anti-proliferative effect of chitosan nanoparticles (extracted from crayfish *Procambarus clarkii*,

- Crustacea: Cambaridae) against MDA-MB-231 and SK-BR-3 human breast cancer cell lines. *International journal of biological macromolecules*, 126, 478-487.
- Taibi-Djennah, Z., Martin-Eauclaire, M.-F., & Laraba-Djebari, F. (2018). Evaluation of neuroprotective effects of insulin on immuno-inflammatory and systemic disorders induced by kalitoxin, a Kv1. 3 channel blocker. *Inflammation Research*, 67, 863-877.
- Testing, E. C. o. A. S. (2013). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. *EUCAST*, Basel, Switzerland: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
- Theocharidi, N. A., Balta, I., Houhoula, D., Tsantes, A. G., Lalliotis, G. P., Polydera, A. C., Stamatis, H., & Halvatsiotis, P. (2022). High prevalence of *Klebsiella pneumoniae* in Greek meat products: detection of virulence and antimicrobial resistance genes by molecular techniques. *Foods*, 11(5), 708.
- Tu, A. T. (1984). *Handbook of natural toxins. Vol. 2. Insect poisons, allergens, and other invertebrate venoms*.
- Tünay, H., DemİrDAL, T., & DemİrTürK, N. (2012). Acinetobacter enfeksiyonlarında dirençe ilgili değişen tanımlamalar ve dirençe güncel durum. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 42(4), 123-126.
- Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, 86(1), 271-278.
- Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World journal of biological chemistry*, 6(2), 28.
- Vachon, M. (1952). Etudes sur les scorpions.
- Van de Voort, F. (1992). Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International*, 25(5), 397-403.
- Vanamala, K., Tatiparti, K., Bhise, K., Sau, S., Scheetz, M. H., Rybak, M. J., Andes, D., & Iyer, A. K. (2021). Novel approaches for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Using nanoparticles to overcome multidrug resistance. *Drug discovery today*, 26(1), 31-43.
- Vila, J., Martí, S., & Sanchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1210-1215.
- Vincent, J.-L. (2003). Nosocomial infections in adult intensive-care units. *The lancet*, 361(9374), 2068-2077.

- Volschenk, E. S. (2005). A new technique for examining surface morphosculpture of scorpions. *The Journal of Arachnology*, 33(3), 820-825.
- Williams, S. C. (2009). Scorpions. In *Encyclopedia of Insects* (pp. 904-909). Elsevier.
- Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., & Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections: a century of challenges. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), 409-447.
- Wright, M. S., Haft, D. H., Harkins, D. M., Perez, F., Hujer, K. M., Bajaksouzian, S., Benard, M. F., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A., & Adams, M. D. (2014). New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen Acinetobacter baumannii from genomic analysis. *mBio*, 5(1), e00963-00913.
- Xia, Y., Ma, Z., Wu, X., Wei, H., Zhang, H., Li, G., Qian, Y., Shahriari-Khalaji, M., Hou, K., & Cao, R. (2024). Advances in stimuli-responsive chitosan hydrogels for drug delivery systems. *Macromolecular bioscience*, 24(5), 2300399.
- Yacoub, T., Rima, M., Karam, M., Sabatier, J.-M., & Fajloun, Z. (2020). Antimicrobials from venomous animals: An overview. *Molecules*, 25(10), 2402.
- Yağmur, E. (2005). Gaziantep akrepleri (Ordo: Scorpiones) ve zoocoğrafik dağılışları. *Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Gaziantep*.
- Yağmur, E. A. (2021). Androctonus turkiyensis sp. n. from the Şanlıurfa Province, Turkey (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius*, 2021(341), 1.
- Yağmur, E. A., Özkan, Ö., & Karaer, K. Z. (2015). Determination of the median lethal dose and electrophoretic pattern of Hottentotta saulcyi (Scorpiones, Buthidae) scorpion venom. *Journal of arthropod-borne diseases*, 9(2), 238.
- Yan, R., Zhao, Z., He, Y., Wu, L., Cai, D., Hong, W., Wu, Y., Cao, Z., Zheng, C., & Li, W. (2011). A new natural α -helical peptide from the venom of the scorpion Heterometrus petersii kills HCV. *Peptides*, 32(1), 11-19.
- Yildiz, I. E., Topcu, A., Bahceci, I., Arpa, M., Tumkaya, L., Mercantepe, T., Baticik, S., & Yildiz, Y. (2021). The protective role of fosfomycin in lung injury due to oxidative stress and inflammation caused by sepsis. *Life Sciences*, 279, 119662.
- Yıldız Zeyrek, F. (2021). Kara Akrep (Androctonus crassicauda) Venomunun Leishmania tropica Promastigotları Üzerindeki In Vitro Etkinliği. *Mikrobiyol Bul*, 55(4), 635-641.
- Yılmaz, E. (2021). Sol-Jel Yöntemi ile Sentezlenen Antibakteriyel Kalsiyum Fosfat/Kitosan/Çinko Kaplamanın İncelenmesi. *El-Cezeri*, 8(2), 942-950.

- Yoon, E.-J., Balloy, V., Fiette, L., Chignard, M., Courvalin, P., & Grillot-Courvalin, C. (2016). Contribution of the Ade resistance-nodulation-cell division-type efflux pumps to fitness and pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 7(3), e00697-00616.
- Zabihollahi, R., Bagheri, K. P., Keshavarz, Z., Motevalli, F., Bahramali, G., Siadat, S. D., Momen, S. B., Shahbazzadeh, D., & Aghasadeghi, M. R. (2016). Venom components of Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* inhibit the growth and replication of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Iranian biomedical journal*, 20(5), 259.
- Zargan, J., Sajad, M., Umar, S., Naime, M., Ali, S., & Khan, H. A. (2011). Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. *Experimental and molecular pathology*, 91(1), 447-454.
- Zeng, X. C., Corzo, G., & Hahin, R. (2005). Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB life*, 57(1), 13-21.
- Zerouti, K., Khemili, D., Laraba-Djebari, F., & Hammoudi-Triki, D. (2019). Nontoxic fraction of scorpion venom reduces bacterial growth and inflammatory response in a mouse model of infection. *Toxin Reviews*.
- Zerouti, K., Khemili, D., Laraba-Djebari, F., & Hammoudi-Triki, D. (2021). Nontoxic fraction of scorpion venom reduces bacterial growth and inflammatory response in a mouse model of infection. *Toxin Reviews*, 40(3), 310-324.
- Zhou, X., Liu, Y., Gao, Y., Wang, Y., Xia, Q., Zhong, R., Ma, C., Zhou, M., Xi, X., Shaw, C., Chen, T., Wu, D., Kwok, H. F., & Wang, L. (2020). Enhanced Antimicrobial Activity of N-Terminal Derivatives of a Novel Brevinin-1 Peptide from The Skin Secretion of *Odorrana schmackeri*. *Toxins (Basel)*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/toxins12080484>
- Zimet, P., Mombrú, Á. W., Faccio, R., Brugnini, G., Miraballes, I., Rufo, C., & Pardo, H. (2018). Optimization and characterization of nisin-loaded alginate-chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef. *LWT*, 91, 107-116.
- Yeşilyurt F (2005). Anadolu'daki Bazı Akreplerin Sistematiği ve Biyoekolojisi (Arachnida: Scorpionida). Yüksek lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale.

EKLER

EK-1. Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
(Republic of Turkey Recep Tayyip Erdogan University Local Ethics Committee for Animal Experiments)

BAŞVURU BİLGİLERİ (Application Information)	ETİK KURUL DOSYA NO(REFERENCE):40		
	ÇALIŞMANIN ADI	Androctonus crassicauda ve Leiurus abdullahbayrami Türü Akrelerin Zehirlerinden Elde Edilen Antimikrobiyal Peptitlerin Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus ve Acinetobacter baumannii Bakterileri Üzerine İn vitro ve İn vivo Etkilerinin Araştırılması	
	Title	The Research Of The İn vitro and İn vivo Effects Of Antimicrobial Peptides That Are Obtained From Androctonus crassicauda ve Leiurus abdullahbayrami Type Of Scorpions Venoms, Against Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Metisiline Resistant Staphylococcus aureus ve Acinetobacter baumannii Bacteria	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (Director of Project)	Doç.Dr.Kazım ŞAHİN	
	DİĞER GÖREVLİLER (Researchers)	Doktora Öğrencisi Burak OKAY	
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez Ulusal	☐ Çok Merkezli Ulusal	☐ Çok Merkezli Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	Karar No(Decision No):2022/04		Tarih (Date): 24.03.2022
	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden, Doç.Dr.Kazım ŞAHİN'in sorumluluğunda yürütülen ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Hayvan Deneyleri Araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına katılan üyelerin oy birliğiyle karar verilmiştir.		
Decision Information	The study above has been approved by the Local Ethics Committee of R.T.E.University.		
	☒ Accepted		☐ Rejected

ÜYELER (Members)						
Ünvanı/ Adı/ Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof.Dr. Fikri BALTA (Başkan, Müdür)	Su Ürünleri (Veteriner Hekim)	R.T.E. Üniversitesi Su Ürünleri Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Levent TÜMKAYA (Başkan Vekili)	Histoloji Embriyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Ayşe ERTÜRK (Üye)	Enfeksiyon Hast. Ve Klinik Mikr.	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr. Serkan GÜL (Üye)	Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr.Kazım ŞAHİN (Üye)	Tıbbi Mikrobiyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr. Hülya KILIÇ YILMAZ (Üye)	Tıbbi Biyokimya	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	
Doç.Dr. Murat ALKURT (Üye)	Protetik Diş Tedavisi	R.T.E. Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Dr.Öğr.Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN (Üye)	Tıbbi Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Şenay ÇAKIROĞLU (Üye)	Veteriner Hekim	R.T.E. Üniversitesi Deney Hay.Uy.ve Arş.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Şevket ÇAKMAKÇI (Üye)	Sağlık Çalışanı	Sendika Üyesi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Rukiye ÜLGER (Üye)	Serbest Çalışan	Sivil Üye	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	

EK-2. Girişimsel Olmayan Etik Kurul



T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı



Sayı : E-40465587-050.01.04-386
Konu : Etik Kurul

29.03.2022

Sayın Doç. Dr. Kazım ŞAHİN

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “*Androctonus crassicauda* ve *Leiurus abduhbayrami* Türü Akrelerin Zehirlerinden Elde Edilen Antimikrobiyal Peptitlerin *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Acinetobacter baumannii* Bakterileri Üzerine *In vitro* ve *In vivo* Etkilerinin Araştırılması” isimli başvurunuz etik kurulumuz yönergesine göre 24.03.2022 tarihinde yapmış olduğu toplantıda incelenmiş olup, 2022/78 karar numarası ile bilimsel ve etik yönden uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU
Başkan

Bu belge güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : 584651a16678

Belge Takip Adresi: <http://ebys.erdogan.edu.tr/EBYS/cimzadogrulama>

Fener Mah. Zihni Derin Yerleşkesi 53100 Rize / TÜRKİYE

Telefon No : +90 (464) 223 61 26 Faks No : +90 (464) 223 53 76

e-Posta : Internet.Adresi:http://www.erdogan.edu.tr/

Kan Adresi:

Bilgi için: BURAK HANKAYA

