

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Parazitoloji Anabilim Dalı**

***LUCILIA SERICATA* 'NIN FARKLI HAYAT
DÖNEMLERİNDE LUCIFENSİN VE CHYMOTRYPSİN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Ahmet GÜRCEL**

**Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

Doktora Tezi

**Kasım 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Parazitoloji Anabilim Dalı**

***LUCILIA SERICATA*'NİN FARKLI HAYAT
DÖNEMLERİNDE LUCIFENSİN VE CHYMOTRYPSİN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Ahmet GÜRĞEL**

**Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

**Kasım 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

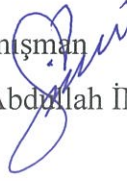
Ahmet GÜRCEL



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"*Lucilia sericata*'nın farklı hayat dönemlerinde lucifensin ve chymotrypsin ekspresyonunu araştırılması" adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.


Hazırlayan
Ahmet GÜRCEL


Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ


Parazitoloji ABD Başkanı
Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU

KABUL ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Abdullah İNCİ danışmanlığında **Ahmet GÜRĞEL** tarafından hazırlanan "**Lucilia sericata**'nın farklı hayat dönemlerinde lucifensin ve chymotrypsin ekspresyonunu araştırılması" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

05 /11 /2018

JÜRİ:

İmza

Danışman : Prof. Dr. Abdullah İNCİ

(ERÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD)

Üye : Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU

(ERÜ Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD)

Üye : Prof. Dr. Uğur USLU

(Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Mehmet DOĞANAY

(ERÜ Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, AD)

Üye : Doç. Dr. Kerem ÖTER

(İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa. Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /..... / 2018

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenciliğim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak desteklerini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Abdullah İNCİ' ye teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli emeklerini ve katkılarını esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM' a ve Sayın Doç. Dr. Önder DÜZLÜ' ye teşekkür ederim.

Destek ve yardımlarından dolayı Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı ve Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince değerli emeklerini ve katkılarını esirgemeyen bölümümüzün doktora ve yüksek lisans öğrencilerine ve Erciyes Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ederim.

Ayrıca bana her konuda destek olan sevgisini ve şefkatini esirgemeyen sevgili anneme ve babama minnet ve şükranlarımı sunarım. Son olarak çalışmam süresince sevgileri ile sürekli yanımda olan aileme, eşime ve sevgili çocuklarıma teşekkür ederim.

Ahmet GÜRCEL

Ekim 2018, KAYSERİ

LUCILIA SERICATA’NIN FARKLI HAYAT DÖNEMLERİNDE LUCIFENSİN VE CHYMOTRYPSİN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Ahmet GÜRCEL

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Kasım 2018
Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

ÖZET

İyileşmeyen kronik yaralar bütün dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Bakteriyel kolonizasyon tedavisinde antibiyotik kullanımının artması ile birlikte ilaçlara karşı direnç sorunu ortaya çıkmaktadır. Antibiyotiğe yanıt vermeyen kronik yara tedavisinde etkili stratejilerin tanımlanıp desteklenmesine acil ihtiyaç vardır. Günümüzde bu amaçla kullanılan Maggot Debridman Tedavi başarılı uygulama etkinliği ile dikkat çekmektedir.

Kurtçuklar ekstrakorporal sindirim ile proteolitik tripsin ve chymotrypsin benzeri enzimleri ile yaraları temizler. Ayrıca ilaca dirençli patojenlerin ortadan kaldırması yara tedavisi açısından önem arz etmektedir. Kurtçuk tedavisine katılan bileşikler ve mekanizmalarının belirlenmesi açısından antibakteriyel karakterizasyonun araştırılması gerekmektedir.

Lucilia sericata yumurta ve larva üretimi yaygın olarak karaciğer ortamında yapılmaktadır. Karaciğer dışında farklı bir besi ortamının kullanılıp kullanılmayacağı, kullanılabilirse ne kadar etkin olacağı, bu ortamlarda gelişen yumurta ve larvalardan lucifensin ve chymotrypsin ekspresyon seviyeleri hakkında detaylı araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışma Maggot Debridman Tedavi’de kullanılan *Lucilia sericata*’nın farklı beslenme ortamlarında geliştirilerek söz konusu ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Beyin dokusu ve sığır eti dokusunda yetiştirilen yumurta ve larvaların, lucifensin ve chymotrypsin ekspresyonlarının diğerlerinden yüksek olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Lucilia sericata*, lucifensin, chymotrypsin, ekspresyon

**INVESTIGATION OF EXPRESSION OF LUCIFENCIN AND
CHYMOTRYPSIN IN DIFFERENT LIFE CYLCLES OF *LICILIA SERICATA***

Ahmet GÜRCEL

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Parasitology
PhD. Thesis, November 2018
Supervisor: Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

ABSTRACT

Healing of chronic wounds is a major health problem throughout the world. With increasing use of antibiotics for bacterial colonization treatment the drug resistance problem arises. Effective strategies in the treatment of chronic wounds that do not respond to antibiotics, need to be identified and promote. Today Maggot Debridement Therapy used for this purpose is notable for its successful application activity. The worms are extracorporeal proteolytic digestion with trypsin and cleaning wounds with chymotrypsin-like enzymes.

Also the elimination of drug-resistant pathogens is of great importance for the treatment of wounds. For the identification of compounds and mechanisms involved in the treatment it has to be investigated worm antibacterial characterization.

Lucilia sericata larvae and eggs are produced in the liver commonly. Used and not used in a different environment than the liver fattening, how effective can be used, you lucifen the developing eggs and larvae in the environment and there is no detailed research on chymotrypsin expression levels.

In this study the expression levels of developing *Lucilia sericata* in different nutritional medium are evaluated. Expression levels of lucifensin and chymotrypsin for brain tissue and beef tissue grown eggs and larvae were determined higher than others.

Key words: *Lucilia sericata*, lucifensin, chymotrypsin, expression

İÇİNDEKİLER

LUCILIA SERICATA'NİN FARKLI HAYAT DÖNEMLERİNDE LUCIFENSİN VE CHYMOTRYPSİN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
KISA ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>Lucilia Sericata</i> 'nın Özellikleri.....	4
2.1.1. Morfolojisi.....	4
2.1.2. Sınıflandırma.....	4
2.1.3. Dağılımı ve Özellikleri.....	5
2.1.4. Hayat Döngüsü.....	5
2.1.5. Yumurta.....	7
2.1.6. Larva.....	7
2.1.7. Pupa.....	8
2.2. Maggot Tedavinin Önemi.....	9
2.2.1. Adli Önemi.....	9
2.2.2. Veterinerlik Önemi.....	9
2.2.3. Tıbbi Önemi.....	9

2.2.4. Maggot Tedavinin Önemi	10
2.3. Maggot Tedavinin Tanımı, Tarihi ve Etki Mekanizmaları	10
2.3.1. Tanımı	10
2.3.2. Tarihçe	11
2.3.3. Etki mekanizmaları	12
2.3.3.1. Debridman	12
2.3.3.2. Dezenfeksiyon	13
2.3.3.3. Büyüme Stimulasyon	16
2.4. Maggot Tedavinin Klinik Kullanımı	17
2.4.1. Endikasyonları	17
2.4.2. Kontrendikasyonları ve Yan Etkileri	17
2.4.3. Larvaların Klinik Kullanımında Yaşanan Problemler	18
2.5. Yaranın Özellikleri ve Debridman Yöntemleri	21
2.5.1. Yara Nedir	21
2.5.2. Debridman Yöntemleri	21
2.5.3. Yaralarda Bulunan Enfeksiyon Etkenleri	22
2.5.4. Biyofilm Oluşumu	23
2.6. Yara Tedavisinde Kullanılan Maggotların Üretimi ve Sterilizasyonu	24
2.6.1. Yumurta Eldesi	24
2.6.2. Yumurtaların Sterilizasyonu ve Steril Maggot Üretimi	25
2.7. Maggot Tedavinin Geleceği ve Dünyada, Ülkemizdeki Yeri	25
2.7.1. Maggot Tedavinin Dünyadaki Kullanımı	25
2.7.2. Maggot Tedavinin Türkiye'deki Kullanımı	25
2.7.3. Maggot Tedavinin Geleceği	26
2.8. Maggot Sekresyonları	26
2.8.1. Maggot Salgısında Bulunan Enzimler	26
2.8.2. Defensinler	27
2.8.3. Lucifensin	29
2.8.4. Cymotrypsin	31

3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	33
3.2. Metod.....	35
3.2.1. İnsektaryum ve <i>Lucilia sericata</i> Kolonilerin Oluşturulması	35
3.2.2. <i>Lucilia sericata</i> Üretimi.....	36
3.2.3. Steril Maggot Üretimi	36
3.2.3.1. Sterilizasyon için Kullanılacak Malzemeler	36
3.2.3.2. Solüsyonlar.....	36
3.2.3.3. Steril Maggot Üretimi	37
3.2.4. Çalışma Gruplarının Hazırlanması	37
3.2.4.1. Grup 1: Steril Kanlı Agarda Üretim.....	38
3.2.4.2. Grup 2: Karaciğer Dokusunda Üretim	38
3.2.4.3. Grup 3: Beyin Dokusunda Üretim	39
3.2.4.4. Grup 4: Sığır Eti Dokusunda Üretim	40
3.2.4.5. Grup 5: <i>Escherichia coli</i> Eklenmiş Tryptone Soya Agarda Üretim	40
3.2.4.6. Grup 6: <i>Enterococcus faecalis</i> Eklenmiş Kanlı Agarda Üretim	41
3.2.4.7. Grup 7: <i>Staphylooccus aureus</i> Eklenmiş Tryptone Soya Agarda Üretim	42
3.2.4.8. Grup 8: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Eklenmiş Tryptone Soya Agarda Üretim	42
3.2.5. Total Genomik DNA İzolasyonu.....	41
3.2.6. <i>Lucilia sericata</i> Lucifensin, Chymotrypsin Gen Primerleri ve PCR	46
3.2.7. Lucifensin ve Chymotrypsin DNA'sının Agaroz Jelden Saflaştırılması.....	47
3.2.8. <i>Lucilia sericata</i> Lucifensin ve Chymotripsin Gen Parçalarının pJET1.2 Plazmitine klonlanması.....	48
3.2.9. Rekombinat Plazmidin Kompetan <i>E.coli</i> Hücrelerine Transformasyonu	49
3.2.10. Klonlanmanın doğrulanması.....	49

3.2.10.1. PCR Screening ile Doğrulama	50
3.2.10.2. Miniprep ve PCR ile Doğrulama	50
3.2.11. Örneklerden Total RNA İzolasyonu	51
3.2.12. cDNA sentezi	51
3.2.13. Standartların Hazırlanması ve cDNA'dan Real-Time PCR	52
3.2.14. İstatistiksel Analiz	53
4. BULGULAR	54
4.1. <i>Lucilia sericata</i> Larvasından Total Genomik DNA İzolasyonu	54
4.2. Lucifensin gen ekspresyonu için Real-Time PCR standardizasyonu	63
4.3. Chymotripsin Gen Ekspresyonu için Real-Time PCR standardizasyonu	65
4.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları	67
4.4.1. Lucifensin Gen Ekspresyonlarının Analiz Sonuçları	67
4.4.2. Chymotrypsin Gen Ekspresyonlarının Analiz Sonuçları	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	84
6. KAYNAKLAR	94
EKLER	109
EK 1: İNTİHAL RAPORU	109
ÖZ GEÇMİŞ	110

KISALTMALAR

μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
Aap	: Accumulation associated protein
AMP	: Antimikrobiyal Peptit
Bap	: Biofilm associated protein
bp	: Baz çifti
BF	: Bioflim
BNHS	: British National Health Service
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
Embp	: Estramustine binding protein
ES	: Sekresyon
FDA	: Food and Drug Administration
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
icaADBC	: İntercellular adhesinADBC
kDa	: Kilodalton
L1	: 1. Dönem larva
L2	: 2. Dönem larva
L3	: 3. Dönem larva
MDT	: Maggot Debridman Tedavi
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MRSA	: Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisiline Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
MT	: Maggot Tedavi

PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	: Polyethylene
PIA	: Polisakkarit İnterselüler Adhesini
PNAG	: PolymericN-asetilglukosamin
RNA	: Ribo Nükleik Asit
SasG	: <i>Staphylococcus aureus</i> surface protein
SSS	: Surgical Stainless Steel= Paslanmaz çelik
TI	: Titanium
TYBÜKS	: Türkiye Yara Bakım Ürünleri Kodlama Sistemi

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar	34
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan malzemeler	35
Tablo 3.3. <i>L.sericata</i> 'nın üretiminde kullanılan besi yeri ortamları ve etiketlenen örnekler.....	44
Tablo 4.1. Real-Time PCR analizlerde kullanılan dilüsyonlar, Ct değerleri ve DNA düzeyleri	63
Tablo 4.2. Çeşitli ortamlarda üretilen yumurtalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri	67
Tablo 4.3. Çeşitli ortamlarda üretilen yumurtalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri karşılaştırılması.....	69
Tablo 4.4. Çeşitli ortamlarda üretilen larvalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri	70
Tablo 4.5. Çeşitli ortamlarda üretilen larvalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri karşılaştırılması.....	71
Tablo 4.6. Çeşitli ortamlarda üretilen pupalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri	72
Tablo 4.7. Çeşitli ortamlarda üretilen pupalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri karşılaştırılması.....	72
Tablo 4.8. Çeşitli ortamlarda üretilen erişkinlerden eksprese edilen lucifensin seviyeleri	73
Tablo 4.9. Karaciğer dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri.....	73
Tablo 4.10. Karaciğer dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması	74
Tablo 4.11. Sığır eti dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri.....	74
Tablo 4.12. Sığır eti dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması	75

Tablo 4.13. Beyin dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri.	75
Tablo 4.14. Beyin dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması.....	76
Tablo 4.15. Kanlı agarda üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri	76
Tablo 4.16. Kanlı agardadokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması	77
Tablo 4.17. Çeşitli ortamlarda üretilen yumurtalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması.....	77
Tablo 4.18. Çeşitli ortamlarda üretilen yumurtalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması.....	78
Tablo 4.19. Çeşitli ortamlarda üretilen larvalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması.....	79
Tablo 4.20. Çeşitli ortamlarda üretilen larvalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması.....	80
Tablo 4.21. Çeşitli besi yerlerinden üretilen pupalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri	81
Tablo 4.22. Çeşitli ortamlarda üretilen pupalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması.....	81
Tablo 4.23. Çeşitli ortamlarda üretilen erişkinlerden eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması.....	82
Tablo 4.24. Çeşitli ortamlarda üretilen erişkinlerden eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması.....	82

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	<i>Lucilia sericata</i> türünün erişkin dönemi	5
Şekil 2.2.	<i>Lucilia sericata</i> türünün hayat döngüsü	6
Şekil 2.3.	<i>Lucilia sericata</i> türünün yumurta dönemi	7
Şekil 2.4.	<i>Lucilia sericata</i> türünün larva dönemi	8
Şekil 2.5.	<i>Lucilia sericata</i> türünün pupa dönemi	8
Şekil 2.6.	<i>Lucilia sericata</i> türünün kafeslerde yetiştirildiği ortam	24
Şekil 3.1.	pJET1.2/blunt vektör haritası.	49
Şekil 4.1.	<i>L.sericata</i> chymotrypsin PCR ürününün agaroz jelde elektroforezde görünümü	55
Şekil 4.2.	<i>L.sericata</i> lucifensin PCR ürününün agaroz jelde elektroforezde görünümü	56
Şekil 4.3.	<i>L.sericata</i> chymotrypsin saflaştırılma işlemi sonrası görüntüsü	57
Şekil 4.4.	<i>L.sericata</i> lucifensin saflaştırılma işlemi sonrası görüntüsü	58
Şekil 4.5.	Transformasyon sonrası oluşan koloniler (<i>L.sericata</i> chymotripsin).....	59
Şekil 4.6.	Transformasyon sonrası oluşan koloniler (<i>L.sericata</i> lucifensin).....	59
Şekil 4.7.	<i>L.sericata</i> chymotrypsin için kolonilerdeki rekombinant plazmit varlığının PCR screening ile doğrulanması.....	60
Şekil 4.8.	<i>L.sericata</i> lucifensin için kolonilerdeki rekombinant plazmit varlığının PCR screening ile doğrulanması.....	61
Şekil 4.9.	<i>L.sericata</i> chymotrypsin miniprep sonrası görüntüsü	62
Şekil 4.10.	<i>L.sericata</i> lucifensin miniprep sonrası görüntüsü	62
Şekil 4.11.	<i>L.sericata</i> lucifensin Real-Time PCR için standart eğri	64
Şekil 4.12.	<i>L.sericata</i> lucifensin seri dilüsyonları ile Real-Time PCR	64
Şekil 4.13.	Real-Time PCR ürünlerinin Melting curve analizinde ise non spesifik bantlar	65
Şekil 4.14.	<i>L.sericata</i> chymotrypsin Real-Time PCR için standart curve.....	66
Şekil 4.15.	<i>L.sericata</i> chymotrypsin seri dilüsyonları ile Real-Time PCR	66
Şekil 4.16.	Farklı ortamlarda gelişen pupa uzunlukları.....	83

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lucilia sericata (Meigen), Calliphoridae ailesinin en yaygın türlerinden birisidir. *Lucilia sericata* (*L. sericata*) sineği leş, çöp, dışkı etrafında yoğun şekilde bulunur (1). *L. sericata* tıp, adli tıp ve veterinerlik biliminde önemli bir rol oynar. Adli Bilimde, kolluk ekiplerin yürüttükleri soruşturmalarda ölüm zamanının belirlenmesinde kurtçuk kolonizasyonu önemli rol oynar. Veterinerlik alanında, *L. sericata* larvaları hayvan üretiminde önemli kayıplara neden olur (2). Tıbbi tedavi olarak kullanılan kurtçuklar, yaralarda bulunan nekrotik dokuları ve enfeksiyonları yok ederek yara iyileşmesine yardımcı olur (3). Yaygınlık ve ekonomik veriler, kronik yaraların yönetiminin, sağlık kuruluşlarına önemli ölçüde mali yükler getirdiğini gösterir (4). Tıbbi literatürde fikir birliği şudur ki, yaraya debridman ile müdahale iyileşme oranını artırmaktadır (5). Dekübitis ülseri, venöz bacak ülseri ve diyabetik ayak ülserleri gibi kronik, iyileşmeyen yaraların tedavilerinin İngiltere Ulusal Sağlık Hizmetlerine yıllık maliyetinin yaklaşık olarak 1 milyon £ olacağı tahmin edilmektedir. Bu maliyetin, çok zor iyileşen cerrahi yaraların gelecekte artırılabilir olmasından dolayı rakamsal olarak çok daha fazla olması bekleniyor. Bu gider artışına yol açan faktörler arasında, artan cerrahi karmaşıklık, hastane enfeksiyonlarındaki artış, uzun ömürlülük gösterilebilir. Ayrıca, çok zor iyileşen yaralardaki mevcut nekrotik dokunun, bakteri üremesini desteklediği, antibiyotik etkinliğini inhibe ettiği, re-epitelizasyon oluşumunu destekleyen granülasyon dokusunu engellediği düşünülmektedir. Bu nedenle, birçok klinisyen, debridman olarak adlandırılan ölü derinin yaralardan ayrılmasını, yara yönetiminde önemli bir klinik adım olarak görür (6). Debridman cerrahi olarak yapılabilir, ya da bakteriyel kolajenaz (Santyl®) gibi enzimler içeren topikal aktif maddelerin kullanımı ile yapılabilir. Yeşil şişe sineği (Greenbottle fly) olarak adlandırılan *L. sericata* larvası kullanımı ile biyocerrahide etkin bir yara debridman yöntemi olduğu düşünülmektedir (7,8). İyileşmeyen kronik yaralar dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Tüm

kronik yaralarda dokuların polimikrobiyal flora ile kolonize olması iyileşmeyi geciktiren faktördür. İyileşmeyen yaralarda klinik enfeksiyonları tedavi için sistemik ve topikal antibiyotikler veya antiseptikler kullanılır. Bununla birlikte son yıllardaki çalışmalarda yara iyileşmesinde antibiyotiklerin istenilen sonucu desteklemediği belirtilmiştir. Antibiyotik kullanımının artması ile beraber bakteriyel kolonizasyon tedavisinde bakteriyel direnç sorunu ortaya çıkmaktadır (9). Antibiyotiğe yanıt vermeyen kronik yara tedavisinde etkili stratejilerin desteklenmesine ve tanımlanmasına acil ihtiyaç bulunmaktadır. Günümüzde Maggot Debridman Tedavinin (MDT) başarılı bir şekilde uygulanması çok dikkat çekmektedir. İlaça dirençli patojenlerin ortadan kaldırması yara tedavisinde önemli yere sahiptir. Bu nedenle kurtçuk tedavisine katılan bileşikleri ve mekanizmalarını tanımak için antibakteriyel karakterizasyonunu araştırmak gerekmektedir (10). Bu bileşenler içinde lucifensin gibi antibakteriyel, lucimycin gibi antifungal peptitlerin yanı sıra chymotrypsin yer almaktadır.

MDT etkili olsa da, bazı uygulayıcılar tarafından genel olarak kabul görmemektedir. Raf ömrünün sınırlı olması ve nihai tüketiciler için larva üretimi özel şartlar gerektirmesi yönünden sınırlamalar oluşturmaktadır. Bu sınırlamalar yönünden dezavantajlıdır. Genel kabul gören etkinliğine rağmen, larva debridman tedavisi yaygın kullanımında kısıtlayıcı durumlar vardır. Bunlar hastanın gizliliği, maliyet ve tedavinin zamanında yapılması için lojistik karışıklıklar ile sınırlıdır. Bunu aşmak için olası bir çözüm, doğal *L. sericata* enzimlerini bir cihazdan saf olarak elde etmek olabilir. Ancak böyle bir teknolojinin potansiyel klinik ihtiyacını karşılaması zordur. Gerekli kalitede ve nitelikte vahşi tür enzimlerin saflaştırılması gerçekçi değildir. Bu nedenle son zamanlarda rekombinant *L. sericata* chymotrypsin üretimi için başarılı bir yöntem geliştirilmiş ve gözlemlenmiştir (11).

Bu çalışmada *L. sericata* hayat döngüsündeki farklı hayat formlarında eksprese edilen lucifensin ve chymotrypsin düzeylerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla *L. sericata* sineklerinin laboratuvar ortamında, insektaryum şartlarında hayat döngüsü ile sağlandı. Böylece sineklerin; erişkin, yumurta, larva ve pupa dönemleri elde edildi. *L. sericata*'nın yumurta, larva, pupa ve erişkin dönemlerinde eksprese edilen lucifensin ve chymotrypsin düzeyleri ölçüldü. Ayrıca ikinci dönem larvaların beslenmesinde farklı besinlerde lucifensin ve chymotrypsin ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Böylece *L.*

sericata larva üretimi için daha uygun şartların elde edilmesi için daha etkin ortamların tespiti sağlanmaya çalışıldı. Larvaların beslenmesinde farklı bakterilerin kullanımı ile de larva tedavisi için hangi enfeksiyonlarda katkı sağlanabileceği araştırıldı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Lucilia Sericata*'nın Özellikleri

2.1.1. Morfolojisi

Erişkin *L. sericata*, metalik yeşil veya mavimsi yeşil renktedir. Erişkinleri 5 ile 10 mm büyüklüğünde olup ön femurları koyu mavimsi metalik renktedir. Abdominal sternitler üzerinde bulunan kılların uzunluğu ile tibia ve femurda bulunan kılların uzunluğu aynıdır (12). Yetişkin *L. sericata*'nın belirlenmesinde mezothorax'da bulunan kılların varlığı önemli rol oynar. Kanatları açık kahverengi, bacaklar ve antenler siyah renklidir (13). Yumurtaları küme halinde bırakırlar. Yumurtaları soluk sarımsı beyaz renktedir. MDT kullanılan larvaların boyları ise 1-2 mm arasında değişmektedir. Muscid form larva özelliği gösterir. Larvalarda anterior stigmalar 7-8 kolludur. Posterior stigmalarda peritrem dar ve kapalıdır (14). Olgun larvaları 16 mm kadar uzunluğa erişebilmektedir. Larvaların vücutları 12 segmentten oluşmaktadır (15). Erkek ve dişileri bireyleri vardır. Dişiler, et, balık, dışkı, hayvan cesetleri, insanların ve hayvanların enfekte yaraları üzerine yumurtlarlar. Yumurtadan larva oluşur. Oluşan larvalar dokuları ayrıştırarak beslenirler (13).

2.1.2. Sınıflandırma

L. sericata, Insecta sınıfı, Diptera takımı, Cylorrhapha alt takımı, Caliphoridae ailesi, *Lucilia* cinsine ait sinek türüdür (15).



Şekil 2.1. *Lucilia sericata* türünün erişkin dönemi (orijinal)

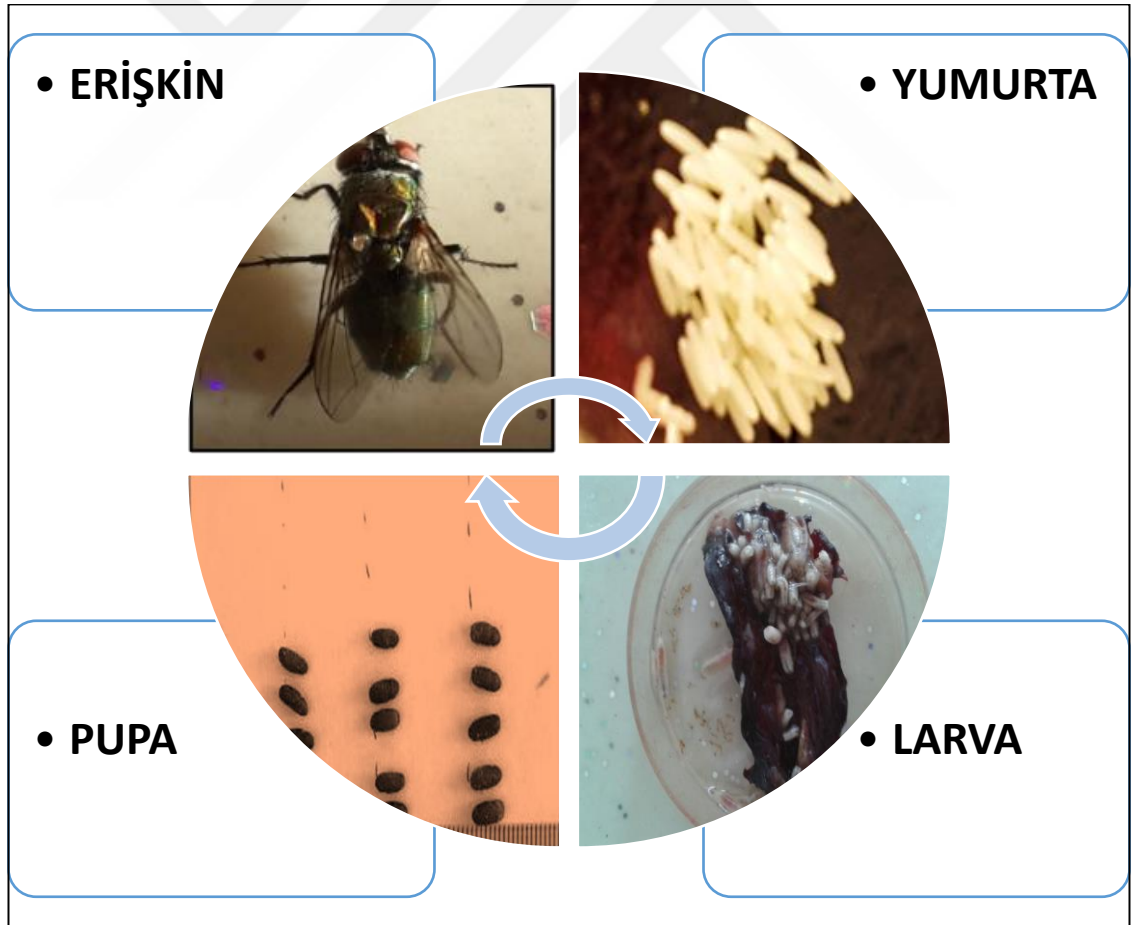
2.1.3. Dağılımı ve Özellikleri

L. sericata dünyada geniş alana yayılmasına rağmen özellikle holoartik bölgede daha fazla dağılım gösterir. ABD ve Güney Kanada'da yaygın şekilde görülmektedir. Avustralya ve birçok Güney ve Orta Amerika kıyılarında nemli iklimleri tercih ederek dağılım gösterir (3). *L. sericata*'nın yeryüzünün ılıman tropikal bölgelerinde yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir. Yoğun olarak güney yarımkürede bulunmaktadır. Sıcak ve nemli iklimlerde yaygındır. Buna bağlı olarak kıyı bölgelerinde yoğundur. Koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yapıldığı yerlerde yaz aylarında miyaz olguları artmaktadır. Sarcophagidae ve Calliphoridae ailesinde bulunan *Sarcophaga*, *Wohlfahrtia*, *Calliphora* ve *Lucilia* cinsi sinekler yaygın görülen miyaz etkenleridir. Türkiye'de ergin sineklere nisan ve eylül ayları arasında rastlanmaktadır (15).

2.1.4. Hayat Döngüsü

Hayat döngüsü yumurta, larva, pupa ve erişkinden oluşmaktadır. Dişiler yumurtaları küme halinde ceset ya da nekrotik veya çürüyen doku üzerine bırakır. *L. sericata* türünün dişi bir bireyi toplu halde 150-200 yumurta bırakır. Yaşamları boyunca 2000-3000 yumurta üretebilirler. Sıcak havalarda yumurtadan larva bir gün içerisinde gelişebilir. Soğuk havalarda larva gelişimi 3 gün sürebilir. Yumurtadan soluk grimsi

larva meydana gelir. Bu larvalar 10 ila 14 mm uzunluğundadır. Larvalar ölü veya nekrotik doku üzerinde sıcaklık ve besin kalitesine bağlı olarak 3 ila 10 gün boyunca beslenir. Larva L1 (1. Dönem larva), L2 (2. Dönem larva), L3 (3. Dönem larva) olmak üzere 3 evre geçirir. 16°C’de birinci dönem 53 saat, ikinci ve üçüncü dönem 98 saat sürmektedir. 27°C’de de birinci dönem 31 saat, ikinci dönem 12 saat, üçüncü dönem 40 saat sürmektedir (16). *L. sericata* koyun yara miyazının primer etkeni olarak bilinir. *L.sericata* yumurtalarını koyunların kuyruk altı ve karın gibi ter ve idrarla bulaşık yerlerine bırakır. Buldukları yarıdaki nem ve sıcaklık etkeni ile bir kaç saat içinde yumurtadan larva çıkar. Deride bulunan yaralarla beslenen larvalar kısa sürede L2 ve L3 formlarına ulaşır. İki günde olgunlaşan larvalar toprağa düşer. Kış aylarını inaktif biçimde pupa şeklinde toprakta geçirir (12, 14).



Şekil 2.2. *Lucilia sericata* türünün hayat döngüsü (orijinal)

2.1.5. Yumurta

L. sericata yumurtaları genellikle beyaz veya soluk sarı renklidir. Genellikle gruplar veya kümeler halinde yumurtlarlar. Yumurta, bir ucu hafifçe konik şeklinde uzamış ve 1,5 mm uzunluğundadır (17). Erişkin dişiler bir yumurtlamada 200 yumurta bırakabilir. Yaşamları boyunca bir sinek yaklaşık olarak 3000 yumurta yumurtlar (18).



Şekil 2.3. *Lucilia sericata* türünün yumurta dönemi (orijinal)

2.1.6. Larva

Larvaların vücutları 12 segmentten oluşur, boyları 16 mm uzunluğuna kadar uzayabilir (15). Yumurtadan 12 ile 24 saat içerisinde larva oluşur. Çıkan larvalar bir hafta içinde pupaya dönüşürler (19). Larva, sıcaklık ve gıda kalitesi bağlı olarak, 3-10 gün boyunca, ölü ya da nekrotik doku üzerine beslenir. Bir larva günde 0,3 gr dokuyu tüketir. Başka bir kaynaktan 200 maggotun 15 gr nekrotik dokuyu veya doku sıvısını bir günde tüketebildiği bildirilmiştir(19).



Şekil 2.4. *Lucilia sericata* türünün larva dönemi (orijinal)

2.1.7. Pupa

Pupa, genellikle sertleştirilmiş bir kabuk içinde bulunur. Sırasıyla kırmızımsı kahverengi, açık kahverengi veya siyah renk alır. Pupalar 9-10 mm uzunluğu ve 3-4 mm genişliği arasında değişen bir boyuta sahiptir. Başlangıçta, pupa rengi beyaz olmakla birlikte birkaç saat içinde hızla koyulaşır (17).



Şekil 2.5. *Lucilia sericata* türünün pupa dönemi (orijinal)

2.2. Maggot Tedavinin Önemi

2.2.1. Adli Önemi

L. sericata adli entomologlar için çok önemli bir türdür. *L. sericata*, cesedin durumu hakkında çok şey gösterebilir. *L. sericata* cesede kolonize olan ilk böceklerden birisidir. Kolonizasyon cesedin yaklaşık zamanını belirlemede tercih edilir. Gelişim, ilerleme, larva yaşam döngüsü uzunluğu ve ağırlığı ölçülerek göreceli olarak olayın ne kadar süre önce olduğu tespit katkı sağlar (20).

2.2.2. Veterinerlik Önemi

L. sericata ve *Lucilia cuprina* (*L. cuprina*) gibi benzer türler İngiltere ve Avustralya' da miyaz etkeni olarak koyunlara zarar verdikleri bilinmektedir. Bu yüzden *L. sericata* koyun darbe sineği olarak adlandırılır (2). Miyaz etkeni olan sinek larvaları canlı dokuları işgal ederler. Genellikle koyunların arkasına yakın yerlerde görünürler. Yün üzerinde, dışkı ve idrarda bulunabilir. Hayvancılıkta büyük ekonomik zararlara neden olur. *L. sericata* ile mücadelede kimyasal tedavi etkili olabilir. Ancak bu yöntem pahalıdır ve zaman kaybına sebep olur (21).

2.2.3. Tıbbi Önemi

L. sericata'nın larva evreleri insanların ve hayvanların doku ve organlarına yerleşerek miyaz denilen hastalıklara neden olurlar. *L. sericata* tıbbi entomolojide miyaz sinekleri olarak bilinir. Miyaz sinekleri doğada hayvan leşleri ve bitkisel besinlerle beslenerek madde döngüsünde rol alırlar. Bazen insan ve hayvanların açık yaralarına yumurta veya larvalarını bırakarak miyaza neden olurlar (22). Aynı zamanda *L. sericata* yara tedavisinde kullanılan bir sinek türüdür (3). MDT kullanılan larvalar canlı dokuyu bozmadan ölü dokuları seçerek beslenir (23). *L. sericata* larvaları nekrotik doku üzerine yerleştirilir ve sarılır. Larvalar ölü doku ve bakterilerle beslenir (24). Larvalar dokuları ayrıştırır ve besin olarak kullanır. Aynı zamanda antimikrobiyal enzimler salgılayarak mikroorganizmaları ortadan kaldırır (23). Bu nedenle *L. sericata* larvaları enfekte yaraların tedavisinde önerilmektedir (25).

2.2.4. Maggot Tedavinin Önemi

L. sericata larvası, geleneksel yöntemler ile iyileşmeyen kronik yaralara uygulanmaktadır. Maggot tedavisinin klinik gözlemlerde etkili olması, maggotların nekrotik dokuyu kaldırdığını, enfeksiyondan arınma sağladığını ve granülasyon doku oluşumunu hızlandığını göstermektedir (7, 26).

MDT'nin kullanım ve yaygınlığı son yıllarda artmaktadır. 1990'ların başında ABD'de ve 1995'den itibaren de Kanada, Avustralya, İngiltere, Almanya, İsviçre, İsveç, Finlandiya, Fransa, Avusturya, Danimarka, Ukrayna, Hollanda, Mısır, Tayland ve İsrail gibi 20'den fazla ülkede 3000'den fazla hekimin kronik ve iyileşmeyen yaraların tedavisinde yaygın olarak kullandığı bir yöntem olmuştur. Sadece İngiltere'de beş yıllık bir dönem içerisinde 600 merkezde 8000 kişiye MDT uygulanmıştır. Bu nedendir ki; artan talepler doğrultusunda ABD, İngiltere ve Almanya'da ticari şirketler kurulmuştur (22). Gerek laboratuvar gerekse klinik uygulamalardan alınan sonuçlar neticesinde kabul gören MDT, biyolojik ve ekonomik olmasının yanı sıra kronik, klasik ilaçlarla iyileşmeyen ve amputasyona giden hastalarda yara iyileşmesinde alternatif tedavi olarak kabul görmüştür (12, 14).

2004 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA: Food and Drug Administration) tarafından onaylanan MDT'nin yine aynı yıl İngiliz Ulusal Sağlık Servisi (BNHS: British National Health Service) tarafından MDT'nin reçete edilmesine izin verilmiştir (3).

2.3. Maggot Tedavinin Tanımı, Tarihi ve Etki Mekanizmaları

2.3.1. Tanımı

L. sericata sineğinin steril larvalarının kronik yara tedavisinde kullanılmasına maggot tedavi denir. Maggot tedavi uygulaması tarifi için çeşitli isimler kullanılmaktadır. Tedaviyi tanımlayan bu isimler, "Maggot Debridman Tedavisi", "Larva Tedavisi", "Terapötik Miyaz", "Biyocerrahi Debridman" ve "Biyocerrahi" şeklinde kullanılmaktadır (14, 26-28).

2.3.2. Tarihçe

Bazı kavimlerde enfekte yaraların iyileşmesinde sinek larvalarının kullanıldığına dair bazı kanıtlara rastlanmıştır. Hintliler güneş altında bırakılmış kanlı etleri kullanmışlar. Kurtlanan etleri yara üzerine sürerek iyileşmesini gözlemlemişlerdir. Avustralya’da bulunan yerli kabileler yaraları kurtçuklarla temizlemişlerdir (29, 30). Yüzyıllar boyunca yaralara musallat olan kurtçukların, azalmış enfeksiyon ve daha hızlı iyileşme ile ilişkili bulunmuştur. Bu konu ile ilgili ilk yazılı kaynak Ambroise Pare’dir. Fransa’da baş cerrah olan Pare larvaların yaralara faydalı olduğunu gözlemledi. Napolyon ordularında başhekim olan Baron Larrey ve Amerikan iç savaşında cerrah olan Dr. Joseph Jones askerler üzerinde çalışırken kurtçukların canlı dokuyu bozmadan nekrotik dokuları temizlediğini gözlemlediler. Konfederasyon cerrahlarından biri olan J.F. Zacharias Amerikan iç savaşı sırasında kurtçukların sepsisi azalttığı ve yara iyileşmesinin hızlandığını gözlemledi (31). John Hopkins Üniversitesinde bulunan Ortopedi cerrahi şefi William S. Baer, 1. Dünya savaşı sırasında askeri cerrah olarak yaralara musallat olan kurtçukların faydalı etkilerine tanık oldu. Kronik osteomyelit hastalığı bulunan çocuklarda, kemik enfeksiyonları ve yumuşak doku yaralarında kurtçukların etkilerini gözlemledi. Pratik yöntemler geliştirerek yaralar üzerinde bulunan larvaların debridman, dezenfeksiyon, stimülasyon gibi eylem mekanizmalarını belgeledi (32). Kısa süre sonra cerrahlar Baer’in kurtçuk tedavi modelini kullanarak yara tedavisinde % 90’ın üzerinde memnuniyet sağladılar (33). 1940’lara kadar kullanılan kurtçuk tedavisi büyük olasılıkla antibiyotiklerin etkisiyle terk edildi (34). Sülfonamidlerin ve penisilinin bulunmasıyla maggot tedavi tamamen unutulmuştur. Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi sonrasında 1990’ların başında ABD’de 1990’ların ortasında İngiltere ve İsrail’de kronik yara tedavisinde larvalar kullanılmaya başlanmıştır (35). 1996 yılında yara tedavisinde kullanılan kurtçukların kullanımının ve kurtçuklar tarafından üretilen salguların araştırılması ve geliştirilme amacıyla ‘Uluslararası Biyoterapi Topluluğu’ kurulmuştur. Maggot tedavinin dünyadaki başarılı uygulanmasına rağmen, bildirilerin ve olgu sunumlarının kısa hikâyelerle sınırlı olduğuna dikkat çekilmektedir. MDT ile ilgili ciddi araştırmaların ve klinik deneylerin yapılmasının gerekliliğine vurgu yapılmaktadır (7, 36, 37).

2.3.3. Etki mekanizmaları

Maggot tedavi için kullanılan larvalar, yaralar üzerinde yapılan klinik ve laboratuvar çalışmalarında, faydalı bir etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu etkiler; debridman, dezenfeksiyon ve granülasyon oluşumunun hızlandırılmasıdır (7).

2.3.3.1. Debridman

Biyolojik debridman olan MDT'de, steril sinek larvaları nekrotik dokunun uzaklaştırılmasında kullanılır. Larvalar salgıladıkları enzimler sayesinde nekrotik dokuyu parçalar ve sindirim sistemlerinde sindirirler (38).

Dekubitus ülseri, venöz bacak ülseri ve diyabetik ayak ülserleri gibi kronik, iyileşmeyen yaraların tedavilerinin BNHS maliyetinin yıllık maliyetinin yaklaşık olarak 1 milyon £ olacağı tahmin ediliyor ki bu ekonomi için büyük bir mali yük getirmektedir (39). Bu maliyetin, artan cerrahi karmaşıklık, hastane enfeksiyonlarındaki artış, yaşanan nüfus artışı, iyileşmeyen ameliyat yaralarının sayısının gelecekte artabileceği düşünüldüğünden yükselmesi bekleniyor. Bu iyileşmeyen yaralarda mevcut nekrotik dokular; bakteri üremesini destekler, antibiyotik sızmasını inhibe eder, granülasyon dokusu ve daha sonraki re-epitelizasyon oluşumunu önler ve ara kontraksiyonunu engeller (39, 40).

Bu yaralar içindeki nekrotik dokunun, iyileşmenin başlaması için kaldırılması gerekir (6). Bu cerrahi debridman ya da bakteri kolajenazı içeren Santyl® merhem (Advance Biofactures Corp. , Lynbrook, NY, ABD) , maddesi gibi topikal madde kullanımı şeklinde olabilir. Ancak, Santyl® yalnızca ABD'de vardır ve henüz hiçbir klinik çalışma verisi mevcut değildir. Papain/urea, fibrinolisin/deoxyribonuclease veya streptodornase/streptokinase (Varidase®; Wyeth, Madison, NJ, ABD) karışımlarını içeren diğer topikal maddelerin etkinliği sınırlıdır veya geri çekilmişlerdir. Son olarak, greenbottle fly *L. sericata*'nın birinci dönem larvalarının kullanıldığı biyocerrahinin yara debridmanında etkili bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır (7). Mevcut debridman yöntemleri, keskin cerrahi, otolitik, hidrodinamik, biyoterapi ve enzimatik ürünleri kapsamaktadır (41). Biyoterapi etki mekanizması eksojen enzimatik debridman ürünleri arasında örtüşme (larva debridman tedavisi) vardır. *L. sericata* larvası, bazı insan

anologları dâhil, ortak enzimler spektrumu içeren sindirim salgıları kullanarak cansız dokuyu degrade eder (42). İlginç bir şekilde, bu enzimlerin bazıları, alkalın pH optimumuna sahiptir. Özel debridman ürünlerindeki streptokinaz ve kolajenaz ise, fizyolojik pH (43) papine yakın maksimum aktiviteye sahiptir. Bu da başka bir debridman madde olarak kabul edilmiş geniş bir pH aralığında aktifliğe sahiptir (44). Enzimatik debridman için önemli bir teknik engel, kontrollü ve güvenilir bir şekilde, yara yüzeyine bir enzim sağlamaktadır. (45). Maggot tedavi en belirgin faydası, tıbbi kurtçukların nekrotik dokuları ortadan kaldırmasıdır. Bu işlem hem fiziksel hem de kimyasal olarak gerçekleştirilir. Kurtçuklar ekstrakorporal sindirim ile proteolitik enzimler salgılayarak yaraları temizler. Salgılanan kolejenazlar, tripsin, chymotrypsin benzeri enzimler sayesinde (42, 46) her bir kurtçuk 24 saat içerisinde 25 mg nekrotik dokuyu kaldırma kapasitesine sahiptir (47).

2.3.3.2. Dezenfeksiyon

L. sericata, dışkı, yara, çürüyen organik madde, ceset ve benzeri besinlerle beslenir. Kurtçukların mikrobik saldırılara karşı dayanıklı olması gerekir. Kurtçukların antibakteriyel aktiviteleri ile ilgili ilk çalışmalar William Bear (1931) tarafından başlandı. Elde edilen ilk veriler kurtçukların bakterileri yiyerek öldürdüğü şeklindeydi (48). Bu çalışmalarda kurtçukların bağırsağının içinde bakterileri öldürdüğü gösterildi. Erdmann ve arkadaşları *L. sericata*'nın sindirim sistemi içerisinde *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) isimli gram negatif bakterinin metabolik ürünleri olduğunu kanıtladı ve antibakteriyel özelliğini tanımlamaya çalıştı (49). *P. mirabilis* tarafından üretilen fenilasetik asit ve fenilasetaldehit *Cochliomyia hominivorax* (*C. hominivorax*) sineğinin bağırsağından izole edildi (47). *L. sericata*'nın sindirim sisteminde göç eden *Escherichia coli* (*E.coli*) bakterilerinin ürettiği proteinler incelenmiştir. Lazer konfokal tarama mikroskobu kullanarak bakterinin ürettiği yeşil flüoresanlı proteinler incelenmiştir. *E. coli* bakterisinin sindirim sistemi göçü sırasında en fazla flüoresan proteinler kursak ve ön bağırsakta olduğu tespit edilmiştir. Orta ve arka bağırsak ucunda önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Kursakta % 66,7, orta bağırsakta % 55,6 ve arka bağırsakta ise % 17,8 canlı bakteri bulunmuştur (37).

Kurtçuklar antibakteriyel özelliklerinin dışında bakterileri sindirebilen çeşitli proteolitik enzimlere de sahiptir (50, 51). Sindirim kanalının değişen PH bakteri lizisine neden

olmaktadır (48). Maggotlar dış ortamda da bakterileri tahrip edebilmektedir (52). Bakteri öldürmede yaranın alkali değişimlerinin de rolü vardır (53-55). Larvaların salgıladıkları amonyum ürünleri ortamı alkali hale getirmektedir (56). Kronik yaralarda larvanın ekzoenzimleri biyofilm tabakasını inhibe ettiği gibi oluşan biyofilm tabakasını bozmaktadır (55). Yara tedavisinde enfeksiyon ciddi problemlere yol açmaktadır. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) diyabetik ayak ülserlerinde iyileşmeyi engelleyen en önemli etkenlerden biridir. MRSA antibiyotiğe karşı dirençlidir. Larvalar, MRSA enfekte yaraların iyileşmesinde ve dezenfeksiyonunda oldukça etkilidir (57-59). Bir çalışmada, *in vitro* steril *L. sericata* larvalarının sekresyonlarında (ES) antibakteriyel maddeler izole edilmiştir. İzole edilen iki antibakteriyel faktör elde edilmiştir. < 5000 Da olan küçüğü MRSA'ya karşı etkili, 0,5-3 kDa olan büyüğü *Staphylococcus aureus*'a (*S. aureus*) daha etkilidir (59, 60). Gram pozitif MRSA, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) ve daha az ölçüde etkili gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*'ya (*P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivesi 194, 152 ve 138 Da olan üç molekül izole edildi. Kurtçuklardan salgılanan bu moleküllerin patojen ve patojen olmayan çok sayıda bakteriye karşı etkili olduğu bildirilmiştir (61, 62).

Bir çalışmada virüslü ortamlarda yetiştirilen ve yaralanarak enfekte edilen steril olmayan kurtçuklar ile steril kurtçuklar karşılaştırıldı. Yaralı ve steril olmayan kurtçukların, steril kurtçuklara göre daha fazla antibakteriyel maddeler salgılandığı gözlemlendi. Yine bu çalışmada MSSA, MRSA ve Gram negatif bakterilerden *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) bulunan yaralarda düşük molekül ağırlığına sahip peptitler bulundu. Bu bulgularla kurtçuk salgılarının bakterileri nötralize ettiğini konusunda fikir birliğine varıldı. Kurtçuklar tarafından, *E. coli*, *P. aeruginosa*, MSSA, MRSA gibi bakterilere karşı 2 dakika sonra düşük moleküller salgılanmaya başlandı. 15 dakika içerisinde bakterilerin %90'ı imha edildi. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda; membranda görülen hızlı K⁺ değişimleri ve düşük moleküle sahip peptitler hücrelerin yok olmasına neden oldukları gösterildi (61, 62).

Steril böceklerde bulunan antibakteriyel peptitler herhangi bir bakteri işgaline karşı hemen sentezlenip ve uzun süre antibakteriyel aktivite göstermektedir (60). Bir

çalışmada *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakteri içeren test tüplerine steril *L. sericata* larvaları uygulandı. Larva özeleri toplanarak Phosphate Buffered Saline (PBS) içeren test tüpüne aktarıldıktan sonra santrifüj edildi. Sonuç olarak enfekte larvaların, steril larvalara göre antibakteriyel kapasitelerinin daha iyi olduğu gösterildi. *S. aureus* 12 ve 24 saat içinde azaldı ve 36 saat sonra ortadan kayboldu. Antibakteriyel peptitler *S. aureus*'a karşı etkili ancak *P. aeruginosa*'ya karşı etkili değildi (63). İzole edilen antibakteriyel bileşikler iki grup şeklinde dışarı atılır. Bunlar 6,5-9 kDa büyük ve 130-700 Da küçük moleküllerdir. Değişen moleküller ağırlıklı polipeptitler içerir (64). *L. sericata*'da 40 amino asit dizisi içeren defensin benzeri peptitlere ilk olarak lucifensin denildi. Daha sonraki araştırmacılar farklı yöntemlerle (65) lucifensini sentezlemeyi başardılar. Hemolenfde mevcut olan 6.5, 6.6, 5.8 ve 8.6 Da ile moleküler ağırlığı büyük bileşikler arasında antimikrobiyal peptitlerin analogları bulunmaktadır. Bu küçük moleküllerin yapısının detaylı bir şekilde aydınlatılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. *L. sericata* salgılarında keşfedilen antimikrobiyal maddeler, çevrelerine yerleşen bileşiklerin çeşitliliği, bakteri ve diğer mikroorganizmalarla mücadele etmede kurtçuklara çok yönlü bir strateji göstermektedir. Böcek bağışıklık yanıtı sonucu oluşan antibakteriyel salgılar hem kendisine hem de organizma dışında bulunan mikroplara karşı antibakteriyel işlev görmektedir. Leşlerle beslenen böcek larvaların salgıları incelenmiştir. İncelenen böcek türleri *Dermetes maculatus* (*D. maculatus*), *Tenebrio molitor* (*T. molitor*), *Calliphora vicina* (*C. vicina*) ve *L. sericata*'dır. Larvaların salgılarının *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *P. aeruginosa* ve *P. mirabilis* üzerine zaman ve öldürme etkilerini incelenmiştir. İki sinek larvasının Gram negatif bakterilere daha etkili olduğu bildirilmiştir (66). Kurtçukların ürettiği salgıların aktivitelerinde sadece bakteriler öldürmek değil aynı zamanda biyofilm çözülmesini ve büyümesini önleyen moleküller ihtiva ettiği tespit edilmiştir (67, 68). *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu iki biyofilm test edilmiştir. Biyofilm; canlı vücudunda bakterilerin, bağışıklık sisteminden ve antibiyotik aktivitesinden kaçmasına neden olan önemli bir mekanizma olarak görülmektedir. Antibiyofilm çok önemli bir keşiftir. Bowling ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, MRSA kolonize olmuş üç diyabetik ayak ülserli hastaya kurtçuk terapisi uygulandı. Uygulama sonrası bir vaka hariç diğerlerinde MRSA'nın elimine edildiği gösterildi (69). Tantawi ve arkadaşları

larva tedavisi sonrası mikrobik canlı türlerinin sayısında önemli bir azalma olduğunu gösterdiler (70).

Armstrong ve arkadaşları huzur evinde yaşayan hastalarda bulunan alt ekstremitte yaralarında kurtçuk tedavisi ile vaka-kontrol çalışması kurarak tedavinin klinik önemi gösterildi. Kurtçuk tedavisinin klinik değerlendirmelerinde; daha az enfeksiyon, daha az antibiyotik kullanımı ve daha az ampütasyona gereksinim vurgulandı (71).

2.3.3.3. Büyüme Stimulasyon

William Bear, yaraların kurtçuklar tarafından debride edilmesi sonrası normal iyileşme görülmekle birlikte debridman sonrası kurtçuk tedavisi devam ettirilirse beklenenden daha hızlı ve daha iyi bir iyileşme olduğunu bildirmiştir (53). Birçok teori kurtçuk tedavisinin granülasyon dokusunun ve yara kapanması ile ilişkisini açıklamak için ortaya atılmıştır. Bazı araştırmacılar kurtçukların sadece yara enkazını ve enfeksiyonunu kaldırarak iyileşmeyi kolaylaştırdığını iddia etti (56). Diğerleri kurtçukların yaralar üzerinde sürünerek yaptıkları basit eylemlerin iyileşme sürecine katkıda bulunduğunu iddia etti (57). Bu şekilde fiziksel uyarımlar yara yatağında büyüme faktörlerinin salınımına neden olduğu için Buchman ve Blair'in (57) yazdıkları makul bir açıklama olarak değerlendirilmiştir. Ancak yıllardır araştırmacılar MDT'de kullanılan kurtçukların yara yatağında hareket ederek hızlı iyileşme sürecine katkıda bulunduğu tezini günümüze kadar devam etmiştir. Klinik olarak, kurtçuk tedavisinde granülasyon dokusu oluşumundaki artış (18, 73), hızlı yara kapanması (73) kontrollü deneyleriyle gösterildi. Böylelikle debridman sonrası iyileşme oranları Baer'in gözlemlerini kanıtlamış oldu. 1930'larda kurtçuk ile muamele edilmiş yaraların alkalitesinin, izole edilmiş allantoin ve üre ihtiva eden bileşiklerden kaynaklandığı ve yara iyileşmesinde etkili olduğu düşünülüyordu (74). Bugün bile allantoin ve üre birçok kozmetik ürünün içinde bulunmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmada, kurtçuk salgıları doku kültüründe fibroblast ve endotel doku çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir (75). Tedavi edilen yaralardan alınan biyopsi örneklerinde, anjiyogenez ve granülasyon dokusu ortaya çıkmaktadır (23). Wolina ve diğerleri, tedavi öncesi ve kurtçuk tedavisi sonrası hastaları transfer spektroskopisi kullanarak değerlendirdiler. Kurtçuk tedavisi edilen hastalarda vasküler perfüzyon ve doku oksijenlenmesinin artmış olduğunu gösterdiler (26). Üç boyutlu jel bazlı yara modellerinde, kurtçuk salgıları yara yüzeyi üzerinde

artmış fibroblastların taşınımına neden olmaktadır (46, 73). Larva salgıları laminin, fibronektin ve kollajen tip I-II gibi ekstraselüler matriks komponentlerinde azalmaya sebep olur ve yarada iyileşmeyi hızlandırır. Ayrıca ekstraselüler matriks komponentleri ve fibrinin yıkımı yarada fibroblastların göçüne, proliferasyona, anjiogenesis ve lökosit invazyonuna neden olmaktadır (42, 46, 76).

2.4. Maggot Tedavinin Klinik Kullanımı

2.4.1. Endikasyonları

ABD’de tıbbi kurtçukların üretimiyle ilgili standartlar FDA tarafından düzenlenmektedir. Bu düzenlemelere göre; cilt ve yumuşak doku yaraları, bası ülserleri venöz dolaşım bozukluğundan kaynaklanan ülserler, diyabetik ayak ülseri nöropatik ayak ülserleri, travma veya cerrahi sonrası oluşan yaralarda kurtçuklar kullanılmaktadır. Kurtçuk tedavisi ayrıca yanıklar, burger hastalığı, selülit, postoperatif yaralar, ülseratif deri kanserleri, lenfostaz, nöropatiler, osteomyelit, mastoidit, talasemi, polisitemi, nekrotik tümörler dahil geniş bir patolojik yelpazede iyileşmeyen yaralardan nekrotik dokuyu temizleyerek yara iyileşmesine neden olmaktadır (18, 19, 26-28, 30, 52, 69, 7377-89). Larval tedavi diyabetik ayak ülserasyonu, osteomyelit, kronik bacak ülserleri, dekübit ülserler gibi kronik ve enfekte yaralarda uygulanır (90). Kronik yaralarda en fazla vakayı diyabetik ayak ülserleri oluşturmaktadır (91). Diyabet hastalarının, diyabete bağlı olarak gelişen ayak ülserlerinin gelişme riski % 12-25 oranındadır. Diyabete bağlı oluşan ayak ülserleri, hastanede kalma süresinin artışına, tedavide yüksek maliyete ve alt ekstremitte amputasyonuna neden olmaktadır (92-94). Diyabetik ayak ülserleri nontravmatik amputasyonların % 40-60’ını oluşturur (95). Diyabete bağlı gelişen ayak ülserlerinde Gürlek ve arkadaşları tarafından ülkemizde yapılan bir çalışmada amputasyon oranı % 36,7 bulunmuştur (96). Yeşil ve arkadaşları 1998-2008 yılları arasında diyabetik ayak ülserli 574 hasta üzerinde yaptığı çalışmada amputasyon oranı % 37 olarak bildirilmiştir (97).

2.4.2. Kontrendikasyonları ve Yan Etkileri

Maggot tedavisi;

- Kanama oluşturabilecek yaralara,

- Büyük kan damarlarına yakın yaralara,
- İç organlara yakın yaralara,
- Vücut kaviteleri ile ilgili yaralara uygulanmamalıdır (55).

Kurtçuk tedavisi güvenli olmakla birlikte komplikasyonları da vardır. Hastaların en sık bildirdiği şikâyet tedavi sırasında meydana gelen ağrıdır. İlk uygulandığında kurtçuklar çok küçük olduğu için hissedilmezler. Kurtçuklar büyüdükçe ağrı hissedilir. Kurtçukların iskelet ve hareket için kullandıkları kanca benzeri dişler bazı yaralarda ağrı meydana getirebilir (98). MDT ile ağrı arasındaki ilişki yaranın üzerinde uzun süre bırakılan pansumanla ilişkilidir (8). Ağrı genellikle iyi analjezik ile kontrol edilebilir. Kontrol edilemiyorsa kurtçuklar ve pansuman, yaradan uzaklaştırılarak tedaviye son verilir (98). İsrail’de yapılan bir çalışmada yüzeysel yaraları bulunan hastaların % 30-35’inde MDT sırasında ağrılarının arttığı ama analjezik ile başarılı bir şekilde tedavi edildiği bildirilmiştir (52, 99). Sherman ve arkadaşları (7) MDT sırasında en sık hasta şikâyetinin bedensel rahatsızlıklar olduğunu bildirmişlerdir. Wollina ve arkadaşları (26) çeşitli nedenlerle kronik bacak ülseri olan 30 hastanın yaralarını debride etmek için MDT kullanmıştır. 12 hastadan (% 40) geçici ağrı rapor edilirken sadece iki hasta için analjezik tedavi gerektiği bildirilmiştir. Wolf ve Hansson (28) farklı nedenlerle nekrotik ya da kabuklu ülserli 74 hastayı MDT ile tedavi etti. Kurtçuklar tek bir uygulama ile % 86’sını debride etti. Bu uygulamanın hastaların üçte ikisinde faydalı olduğu görüldü. Hastaların % 41’i ağrıyı hissetmez iken % 25’i az ağrı yaşadı ve % 34’ü ağrıya artış olmasına rağmen tedaviye devam etmek istedi. Steenvoorde ve arkadaşları (89) MDT uygulanan hastalarda görsel analog skala kullanarak ağrı seviyelerini tespit etti. Bu hastalara parasetamol ve fentanil yama kullanarak polinikte ağrı kesici verildi.

Topikal ve sistemik sitotoksik ilaçlarla beraber MDT uygulanmamalıdır. Çünkü bu ilaçlar larvalara zarar vereceğinden veya ölümüne sebep olacağından birlikte kullanılması uygun değildir. Ayrıca Propiien glikol içeren pansuman malzemeleri lavra gelişimini engellediği için kullanılmamalıdır (55).

2.4.3. Larvaların Klinik Kullanımında Yaşanan Problemler

Larvaların vücutları kutikula tabakası ve üzerinde diken benzeri tüylerle kaplıdır. Kurtçuklar, ağız kancası kullanarak vücudun öne doğru çekilmesini sağlarlar. Yara yüzeyinde kurtçuk hareketleri ile oluşan ağrılar muhtemelen dikensi tüyler ve ağız kancasıyla ilişkilidir. Buna ek olarak kurtçuk ES ürünleri proteolitik enzimler içerir. Proteolitik enzimlerin yaranın sinir veya sinir uçlarının iltihaplanmasına karşı etki etmesinden dolayı ağrı oluşabilir (99). MDT ile ilişkili ağrı eğilimli hastalar kolayca tespit edildiği (MDT yapılmadan öncede yara ağrısı bulunur) için tedavi sırasında çeşitli müdahalelerle ağrıyı önlemek veya aza indirmeyi sağlayan uygulamalar vardır. Bu uygulamalar; Gündüz 6-8 saat gibi kısa süreli kurtçuk uygulaması yapmak, poşet benzeri paketlerle uygulama yapmak, küçük ve az sayıda kurtçuk kullanarak tedavi etmek (98). Bazen kurtçuklar yara üzerinde 48 saat bırakılır ve gevşek pansuman yapılabilir. Bu durumda kaçmaya yönelen larvalar mobilya altına veya minder arasına girerek pupa oluşturabilirler. 1-2 hafta sonra gizlendikleri yerden yetişkin olarak çıkar ve uçarlar (98). Karşılaşılan ve tartışılan bir diğer sorun ise hasta kaygısı “iğrenç faktör” dur. Kronik yarası bulunan hastaların büyük çoğunluğu MDT’yi kabul etmektedirler (88, 89). Larval kurtçuklara alerjisi olan hastalara MDT uygulanmamalıdır. Kurtçuklarla ilgili herhangi bir alerjik reaksiyon şu ana kadar tarif edilmemiştir. Kurtçuk tedavisi agresif ilerleyen yaralarda (anaerobik ya da aerobik-anaerobik yumuşak doku enfeksiyonları ve fasiit gibi) kullanılmamalıdır. Uzuvarı tehdit eden enfeksiyonlar acil olduğu için cerrahi drenaj daha uygun tedavidir. Tüm cerrahi müdahaleler yapıldıktan sonra MDT yardımcı tedavi olarak uygulanabilir (98). Bir açıklığın (periton veya göğüs boşluğu açıklığı) olduğu yerde kurtçuk terapisi kullanılması tavsiye edilmez. Bu durumlarda kurtçuk tedavisinin başarılı olduğu bildirilmiş olmasına rağmen uygulanmamalıdır (80). Terapistler tıbbi yardım olarak 24 saat/gün telefon erişimi sağlayarak ayakta tedavi gören hastaların kaygılarını azaltabilirler. Kaçan kurtçuklar hastalar, hasta yakınları ve sağlık personeli için sıkıntılı bir durum olabilir. Bakım için uygun pansumanlar kullanılmalıdır. Kurtçukların bulunduğu yara alanının kısıtlanması için önlem alınmalıdır. Kaçan kurtçuklar hassas yapılara zarar verebilir (göz veya ağıza yakın yaralar). Bu durumda çevreleme pansuman kullanımı yararlı olabilir. Kurtçukların sindirim enzimleri eritem veya selülite neden olabilir. Bu nedenle yara yatağında bulunan kurtçuklar sınırlı sayıda olmalıdır. Yara çevresi sıvı veya hidrokolloid pansuman ile korunmalıdır. Kurtçuklar

her zaman besin kaynağı olarak nekrotik dokuyu arayacaktır. Fakat kaçmak veya nekrotik dokuyu temizlemek için çaba gösterirken canlı dokuya da zarar verebilir. Ayak tabanı yaraları olan hastalar için özel bir mekanizmayla kurtçukların ezilmesi önlenmelidir (98). Kurtçuklar tarafından amonyum tuzları üretilebilir (54). Şayet amonyum tuzları kurtçuk pansuman malzemeleri tarafından emilmezse hastanın vücut sıcaklığında artış olabilir. Nadir durumlarda yaranın kanaması MDT sırasında gözlemlenmiştir. Kurtçuk tedavisi sırasında özellikle cerrahi debridmandan kısa bir süre sonra kanama oluşabilir. Steril olmayan kurtçuklar kullanıldığında bakteriyemi veya sepsis tehlikesi vardır (100). Kötü koku birkaç hastada terapistler tarafından gözlemlenmiştir. Muhtemelen nekrotik doku sıvılaşması ve buharlaşması sonucu kokuşma oluşur. Kurtçuklar ve *Pseudomonas* gibi bakteriler tarafından salgılanan amonyum tuzları kötü kokuya katkıda bulunur. Kurtçuk bulunan gazlı bezleri sık sık değiştirerek kötü koku ortadan kaldırılabilir veya en aza indirilebilir (37). Kemik enfeksiyonu için standart tedavi çoğunlukla cerrahi rezeksiyondur. Uygulanmadığı durumlarda MDT makul bir seçenek olabilir. MDT, nekrotik dokuyu erittiğinden dolayı arter duvarını etkileyebilir. Böyle bir durum ortaya çıkarsa özellikle baskı altında kalan kan damarlarından kan sızabilir veya delinebilir. Pıhtılaşma bozukluklarında (doğal veya uyarılmamış) kanama riski daha da artar (101). Genellikle büyük damar içeren nekrotik bir yara için tercih edilen tedavi şekli cerrahidir. Çünkü debridman sırasında damarların görülmesini sağlar. Bu durumun mümkün olmadığı durumlarda hasta, hastane veya yoğun bakım ünitesinde gözlem altında kurtçuk tedavi yapılabilir. Yeterli kan akışı olmadan iyi debridman yapılsa bile yara iyileşmesi oluşamaz. Kabuk tarafından korunmalı bir yara mikrobiyal invazyon ve yayılması için daha hassas olduğu ileri sürülmektedir. Ancak kan akımının kritik seviyesinin kesin tanımı veya değerlendirme belirsizliği vardır. Arteriyel yetmezlikle veya amputasyon planlanan yaraların tedavileri ile ilgili çalışmalarda, MDT son çare olarak yapıldığında % 40-60 oranında iyileştiği ve amputasyon önlendiği bildirilmektedir (52, 71, 86, 88, 102). Bu nedenle şiddetli arteriyel yetmezlik olan hastalarda, kurtçuk tedavisi denenebilir. Bakteriyemi, selülit ya da cerrahi müdahale gibi durumlarda debridman öncesi antibiyotik tedavi gerekebilir. Kurtçuk tedavisinde kanıtlanmamış ya da yetersiz dezenfekte larva olmamalıdır. Laboratuvarlarda yetersiz işlem ve yeterli dezenfeksiyon olmaması sonucu olarak hastalarda enfeksiyon komplikasyonları gözlenmiştir (100).

Sistemik antibiyotik verilmesi MDT için bir kontrendikasyon değildir (103, 104). Antibiyotikler bitişik deri (selulit) veya kan (bakteriyemi) yoluyla enfeksiyonların yayılmasını önlemek için gerekli olabilir. Topikal antibiyotik olarak merhemler kullanılmalıdır. Terapistler her zaman dezenfekte kurtçukların ambalaj bilgilerini okuyarak takip etmelidir. Herhangi bir tedavide olduğu gibi, kurtçuk tedavisi ile potansiyel yaralara karşı riskler ve alternatif stratejiler düşünülmelidir (98).

2.5. Yaranın Özellikleri ve Debridman Yöntemleri

2.5.1. Yara Nedir

Dış bir etki ile deri bütünlüğünün bozulmasına yara denir (105). Yaradan ölü dokuların ve kontamine yabancı maddelerin çıkarılmasına debridman denir (106). Geç veya hiç iyileşmeyen yaralara kronik yara adı verilir. Bir yaranın üç ay süre içerisinde tamamen iyileşmemesi o yaranın kronik olduğunu gösterir (107).

Akut yara iyileşmesinde üç devre bulunmaktadır.

1. İnflamasyon devresi. Hemostaz, nötrofil işlevlerinin bulunduğu devre ve makrofaj işlevlerinin bulunduğu geç dönemden meydana gelir ve yaklaşık dört gün sürer.
2. Proliferasyon devresi. Granülasyonun ve epitelizasyonun tamamlandığı devredir ve yaklaşık bir ay sürer.
3. Olgunlaşma ve şekillenme devresi (108).

2.5.2. Debridman Yöntemleri

Yaraların üzerinde veya kenarında bulunan canlılığını kaybetmiş dokuların ve kontamine maddelerin kaldırılmasına debridman denir (109). Debridman uygulaması ile birlikte bakteriyel yük azalır, enfeksiyonun kontrol altına alınması ve önlenmesine imkân verilir, yara duvarının ve canlı dokunun görünmesini sağlar (110). Cerrahi, otolitik, mekanik, enzimatik ve biyolojik olmak üzere beş temel debridman yöntemi vardır. Her bir debridman yönteminin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (111). Biyolojik debridman olarak larval tedavi hastanelerde ve dışarıda rahatlıkla kullanılabilir. Maliyeti düşük, MRSA'ya karşı etkili ve sağlıklı dokuya zarar vermeden

debridman yapar (112). MDT Yara Bakım ve Doku Onarımı Derneği tarafından sınıflandırılmıştır. Türk Yara Bakım Ürünleri Kodlama Sistemi (TYBÜKS) ile larva tedavisi numaralandırılmıştır (113).

2.5.3. Yaralarda Bulunan Enfeksiyon Etkenleri

Bakteri türleri deri altı dokusuna dışarıdan gelerek kolonize olabilirler (114). Yara oluşumu ile birlikte enfeksiyon gelişimi olabilir. Mikroorganizmalara ait virülans faktörleri bağışık yanıtı yenerek yara bölgesine invaze olurlar (115). Yara bölgesine de yayılan mikroorganizmalar akıntı, eritem, ağrı ve selülit oluşumuna sebep olur (115). Cerrahi yaralarda en sık rastlanan anaerobik bakteriler *Peptostreptococcus*, *Clostridium* ve *Bacterioides* türleri olduğu bildirilmiştir. Yanık yaralarında *Peptostreptococcus*, *Clostridium* ve *Bacterioides* türleri olduğu bildirilmiştir (116). Diyabete bağlı ülserlerde gelişen en sık rastlanan patojen enfeksiyon etkenleri *Peptostreptococcus*, *Prevotella* ve *Bacterioides* türleri olduğu bildirilmiştir (117, 118, 119). Dekübit ülserlerde *Peptostreptococcus*, *Bacterioides* türleri en sık rastlanan patojenler olarak bildirilmiştir (116). Bazı diyabetik ayak enfeksiyonlarında *S. aureus*, *Streptococcus* türleri görülür. Daha ileri diyabetik ayak enfeksiyonlarında Gram pozitif koklarla birlikte *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* ve zorunlu anaerobik bakteriler görülmektedir (91). Bası yarası enfeksiyonlarında en sık rastlanan aerobik bakteriler *Stafilokoklar*, *Entrokoklar*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*'dır. Bası yarası enfeksiyonlarında en sık rastlanan anaerobik bakteriler *Peptostreptokoklar*, *Bacterioides fragilis* (*B. fragilis*) ve *Clostridium* türleridir (120). Osteomyelite birçok mikroorganizma sebep olabilir. Olguların büyük çoğunluğundan sorumlu *S. aureus*'tur (121, 122). Hematojen endojen osteomyelite en sık rastlanan *S. aureus*'tur (123). *S. pyogenes* diyabetik hastalarda nekrotizan fasiite neden olur (124). MRSA, diyabetik ayak enfeksiyonlarda kötü prognozla ilişkilidir (91).

Yanık yaralarında en erken kolonize olan *S. aureus*'tur (125). Akut ve kronik yanık yaralarında izole edilen gram negatif patojenler arasında *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) bulunur (126).

2.5.4. Biyofilm Oluşumu

Kronik yaralarda oluşan bakteriler genellikle biyofilm içinde bulunurlar. Biyofilm içinde bulunan bakteriler antibiyotik ve bağışıklık sisteminden korunurlar. Kronik yaralarda biyofilm ile ilişkili *S. aureus* ve *P. aeruginosa* en uygun türlerdir. Kurtçuk salgıları, *S.aureus* ve *P.aeruginosa*'nın oluşturdukları biyofilmlere karşı etkilidir (127). Biyofilm bozulması sonucu, bakteri antibiyotiklere, immün sistem faaliyetlerine kurtçuk eylemlerine daha duyarlı hale gelir. Kurtçuk sekresyonları, antibiyotik kombinasyonları ile biyofilm bozulmasını sağlayabilir. Böylece matrikste kalan bakteriyel oluşumun önlenmesi ve biyofilme karşı antibiyotik aktivesitesi oluşur (128).

Kronik enfeksiyonlar, genel olarak, *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) gibi stafilokoklar tarafından oluşturulan biyofilmler ile ilişkilendirilir (129). Stafilokok biyofilm oluşumu birkaç adım içerir: ilk olarak, hücre duvarı ile ilişkili adezinler aracılığı ile bakteriler biyomateryale bağlanır (130) daha sonra çok bakterili bir tabaka oluşturarak birikirler. *S. aureus* ve *S. epidermidis*, biyofilm biriktirmek ve meydana getirmek için icaADBC lokusu tarafından sentezlenen polymericN-asetilglukosamin (PNAG) olarak da adlandırılan Polisakkarit İnterselüler Adhesini (PIA) hücreler arası adezini gibi birkaç farklı hücreler arası yapışkan mekanizmaları kullanırlar (131-134). icaADBC ve PIA'dan bağımsız proteinli faktörler alternatif olarak ortaya çıkmıştır ve yüzey proteini G (SasG) (135) ve *S. aureus*'ta biyofilm ile ilişkili protein (Bap) (136) ve birikim ile ilişkili protein (Aap; homolog to SasG) (137) ve *S. epidermidis*'te hücre dışı matris bağlayıcı protein (Embp) içerir (138). Yapılan bir çalışmada *S. aureus* ve *S. epidermidis* tarafından PE (Polyethylene), TI (Titanium), SSS (Surgical stainless steel=Paslanmaz çelik) üzerine biyofilm oluşturulmuştur. Oluşturulan biyofilmlere maggot salgılarının etkileri araştırılmıştır. Bakterilerin 7 gün sonunda PE, TI, SSS üzerinde biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. Biyofilm oluşumu 5. günden sonra artmaya başladı ve 7. günde pik yaptı. Farklı konsantrasyonlarda biyofilim üzerine maggot sekresyonları uygulandı. SSS üzerinde *S.aureus*'un oluşturduğu biyofilm 0,31 mg maggot salgısı uygulanması sonucunda % 59,5 inhibisyon oluşturarak maksimum etkiye ulaşmıştır. PE üzerinde *S. aureus*'un oluşturduğu biofilme 0,83 mg maggot salgısı uygulanması sonucunda % 60,8 inhibisyon ile maksimum etkiye ulaşmıştır. TI üzerinde *S. aureus*'un oluşturduğu

biyofilm 8,33 mg maggot salgısı uygulanması sonucunda inhibisyon oluşturduğu gözlenmiştir. SSS üzerinde *S. epidermidis*'in oluşturduğu biyofilme 25 mikrogram maggot salgısı uygulanması sonucunda % 67,7 inhibisyon oluşturduğu gözlenmiştir. PE üzerinde *S. epidermidis*'in oluşturduğu biyofilme 0,33 mg maggot salgısı uygulanması sonucunda % 92,2 inhibisyon oluşturarak maksimum etkiye ulaşmıştır. TI üzerinde *S. epidermidis*'in oluşturduğu biyofilme 0,31-0,93 mg maggot salgısı uygulanması sonucunda biyofilme azalma görülmüştür. Sonuç olarak maggot sekresyonu var olan biyofilm tabakasını bozmaktadır (68).

2.6. Yara Tedavisinde Kullanılan Maggotların Üretimi ve Sterilizasyonu

2.6.1. Yumurta Eldesi

MDT'de *L. sericata* sineğinin larvaları kullanılır. Kafeslerde bulunan sineklerin beslenmesi için % 20'lik şeker solüsyonu verilir. Yumurtlamayı sağlamak için et veya karaciğer parçacıkları kullanılır (30). Karaciğer veya et üzerinde toplanan yumurtalar önce birbirinden ayrıştırılır. Ayrıştırılan yumurtaların yüzeyleri dezenfekte edilir. Dezenfekte edilen yumurtalar steril besi yerine aktarılır. Steril besi yerine aktarılan yumurtalardan 2-36 saat sonra larvalar oluşur. Larvalar 5-8°C arasında canlılıklarını kaybetmeden beş gün yaşayabilirler (52).



Şekil 2.6. *Lucilia sericata* türünün kafeslerde yetiştirildiği ortam (orijinal)

2.6.2. Yumurtaların Sterilizasyonu ve Steril Maggot Üretimi

Kafes içinde bulunan karaciğer üzerine sinekler tarafından yumurta bırakılır. Bırakılan yumurtalar toplanır. Yapışık halde bulunan yumurtaları ayırmak için % 0,05'lik sodyum hipoklorit kullanılır. Sodyum hipoklorit içinde yumurtalar 15 dakika çalkalanır. Sodyum hipoklorit döküldükten sonra ayrışan yumurtalar % 5'lik formaldehit içinde 15 dakika çalkalanır. Böylece yumurtalar steril hale getirilir. Steril hale gelen yumurtalar süzülür ve steril izotonik sıvıda yıkanarak formaldehit uzaklaştırılır. Steril yumurtalar kanlı plak besi yerine aktarılır. Besi yerinde bulunan yumurtalar gece boyunca 25-30 °C'de inkübe edilir. Yumurtadan çıkan larvalar tiyoglikolatlı broth, kanlı agar, çikolatamsı agar gibi besi yerlerine ekilerek steril olup olmadığı kontrol edilir. Larvalar steril ise kullanılır. Steril değilse -20°C bir gece tutulduktan sonra çöpe atılır (52). İngiltere, Almanya ve Amerika da bir çok özel şirket tarafından steril larva üretilmekte ve ticari olarak piyasaya verilmektedir (139).

2.7. Maggot Tedavinin Geleceği ve Dünyada, Ülkemizdeki Yeri

2.7.1. Maggot Tedavinin Dünyadaki Kullanımı

Yirminci yüzyılın sonu kurtçuk tedavisi (biyoterapi) için yeni bir dönemin başlangıcı oldu. Bu konuda yapılan kontrollü ve karşılaştırmalı klinik çalışmalar sonucu 2004 yılında FDA tarafından yasal olarak pazarlama ve kullanım izni verildi (18, 73). 1995 yılında tıbbi kurtçuklar ABD, İsrail ve İngiltere'de üretildi. Tahmini olarak, 2011 yılına kadar 24 laboratuvar tarafından üretilen 50.000 adet larva 30 ülkede bulunan hastalara sevk edildi. İlk üretiminden 20 yıl sonra 80.000 den fazla hastayı tedavi ettiğini tahmin edilmektedir (99). Maggot tedavi yakın zamanda tıbbi ve cerrahi eğitim programlarda öğretilen bir yöntem oldu. Maggot tedavi basit, güvenilir ve maliyeti düşük yara bakım yöntemi olması nedeniyle artan bir ilgi ile yayılmaktadır (85, 140).

2.7.2. Maggot Tedavinin Türkiye'deki Kullanımı

Ülkemizde 2002 yılından itibaren Gülhane Askeri Tıp Akademisinde (GATA) uygulanmaktadır (14). Maggot tedavi 2008 yılından beri de Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında da uygulanmaya başlanmıştır (141).

2.7.3. Maggot Tedavinin Geleceği

Burger hastalığına bağlı ülserler ile ateşli silah yaralanmaları gibi doku kaybı taşıyan olgularda maggotların yararlı olduğu gözlenmiştir (14). MDT uygulama kolaylığı ve hızlı iyileşme sürecinden dolayı; ekonomik kazanç sağlaması, hastane yatış süresini azaltması ve buna bağlı olarak enfeksiyon riskini önlemektedir (14).

William Baer'dan günümüze kadar, birçok araştırmacı proteolitik, antimikrobiyal ve larva tedavisi iyileşmeye teşvik faaliyeti altında yatan yara iyileştirici molekülleri izole etmek için çalıştılar. Kurtçuklar olmadan kurtçuk debridman salgıları konusunda, Baer şunları söylüyor: "Biz aktif kökenin bir enzim olup olmadığını, kurtçukların olmadan bu enzim dışarı almak ve tedavi yapılıp yapılmayacağını bilmiyoruz; ama ben kurtçuk tedavisini kronik osteomyelit için en başarılı ve en kolay yol olduğunu biliyorum" (121). Kurtçuk tedavisinde en yaygın sorun, kullanacak larvaların geç teslimat edilmesidir. Teslimat gecikmeleri sonucu genç larvalar, aşırı sıcaklık ve açlığa karşı hayatta kalmaları güçleşmektedir. Nakliye konteynerleri hava geçirmez yalıtkan maddelerden tasarlandığı için oksijen erişimini kısıtlayabilir. Tıbbi kurtçuklar kurye ile gönderilmiş olsa da (24 saat içinde kullanımı tasarlanmış), ABD'de % 1-2'sinin geç veya ölü olarak geldiği gösterilmiştir (98).

Kurtçuklar, fiziksel hareketler ve ağız kancaları vasıtasıyla nekrotik dokuyu törpüleyerek enzimlerin derin dokuya ulaşmasına sağlarlar. Bu durum debridmanın hızlanmasına katkıda bulunur. Bu gerçeği ifade anlamında FDA MDT'yi tıbbi cihaz kategorisinde düzenlemiştir. Tıbbi kurtçuklardan çıkarılan moleküller bir gün, iyileşmeyen yaralarda MDT yerini alacak mı? Belki (142).

2.8. Maggot Sekresyonları

2.8.1. Maggot Salgısında Bulunan Enzimler

Proteolitik enzimler enfekte ölü dokunun çıkarılmasından büyük ölçüde sorumludur (42). Larvalar, proteolitik enzimler salgılayarak sıvı hale gelen nekrotik dokuyu besin olarak kullanırlar (87). Yapılan çalışmalarda, larvaların salgıladıkları üç proteolitik enzim tespit edilmiştir. Bunlar serin proteinaz, aspartil proteinaz, metallo- proteinazdır (42). *L. sericata* salgılarında, tripsin ve chymotrypsin benzeri serin proteazlar baskın

aktivite göstermektedirler. Larva proteozları geniş pH aralığında (pH 10.00, pH 5.0) aktiftirler. (143). Birçok çalışmada araştırmacılar, *L. sericata* sineğinden oluşan bileşiklerin insanlar üzerinde olumlu antimikrobiyal etkilerini aydınlatmaya odaklanmıştır (54, 62, 72). Antibakteriyel faktörlerin sekresyon ürünleri üç kategoride rapor edilmiştir: molekül ağırlığı sırasıyla 0,5 kDa'dan küçük 0,5-10 kDa arasından olanlar ve 10 kDa'dan büyüktür (58, 59, 62). *L. sericata* hemolenf ekstraterinden izole edilen düşük molekül ağırlıklı bileşikler p-hidroksi benzoik asit (138 Da), p-hidroksifenilasetik asit (152 Da), oktahidro-dipirolo (195 Da) (46). Son zamanlarda MDT kullanılan larvaların bağırsaklarında, tükürük bezlerinde, hemolenf ve vücut yağlarında bulunan antibakteriyel ajan olarak bulunan bir defensin bulunmuştur. Defensin olan lucifensin molekül ağırlığı daha büyük olduğu bildirilmiştir (64).

2.8.2. Defensinler

Defensinler uyarılabilir antimikrobiyal peptitlerin en yaygın grubunu temsil eder ve en çok yumuşakça, akar, örümcekgiller, böcekler, memeliler ve bitkilerden izole edilmiştir. Defensinler, küçük, katyonik, sistein bakımından zengin, 3-6 disülfür bağları bulunan ve 29-46 amino asitten oluşan peptitlerdir. Böcek defensinleri ilk olarak *Sarcophaga peregrina* (*S. peregrina*) sinek türünün et kültüründe bildirildi. Daha sonra böcek türlerinin büyük çoğunluğunda defensin gösterilmiştir. Böceklerin peptit dizileri belirli bir düzen içinde büyük benzerlik gösterir, fakat etki karşısındaki tepkileri oldukça farklıdır. Genel olarak C-terminal bölgeleri daha az korunumludur (144). Böcek defensinleri en çok alfa helix, beta tabaka olmak üzere iki bağlantısı ve disülfid bağ ihtiva eder. Dromomycin gibi birkaç böcek defensini dört sülfid köprüsü ile sonuçlanan sekiz sistein kalıntısı içerir (145). Böcek defensinleri orta zincir konumunda glikosilat treonin ihtiva eder. Fakat bir şeker kalıntısının mevcudiyeti biyolojik aktive için gerekli değildir (144). Sesropin aktivitesi için ön şart olan amidasyon nadiren böcek defensinlerinde görülür. Böcek defensin aktivitesi iki gruba ayrılabilir: antibakteriyel, antifungal. Antibakteriyel etki Gram pozitif bakterilerle sınırlıdır. Defensinler Gram negatif bakteriler, lifli mantarlar ve mayalara karşı daha az hassastır. Gram pozitif bakteriler genellikle μM miktarının altında antibakteriyel peptit uygulamasından birkaç dakika içinde (en az önleyici konsantrasyon) etkilenir. İn vitro çalışmalar, antibakteriyel aktivitenin, fizyolojik şartlar altında ve kültür ortamında önemli ölçüde azaldığını

göstermiştir. Böylece defensinin antibakteriyel etkisi böceklerin fizyolojik özelliği olup olmadığı sorgulanır hale gelmiştir (146). Antibakteriyel defensinin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Dağılmış teikoik asit polimerleri ile peptidoglikan birden fazla tabakadan oluşur ve bakterilerin asidik hücre duvarı ile etkileşimini kolaylaştırır (145). *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) hücrelerinde *Phormia terraenovae* (*P. terraenovae*) sineğinden izole edilen defensin etki mekanizması aydınlatılmaya çalışıldı. Defensin sitoplazmik potasyum kaybı, iç zarda kısmi polarizasyon, sitoplazmik ATP'de azalma, solunum sonunda inhibisyon oligomerleri ve sitoplazmik geçirgenliği bozar.

Böcek defensinlerin antifungal grubu olarak *Pseudocanthotermes springer* (*P. springer*) termitinden gelen termicin, *Galerin mellonella* (*G. mellonella*) güvesinden gelen gallerimycin, tütün tomurcuk kurdu *Heliothis virescens*'den (*H. virescens*) gelen heliomycin, meyve sineği *Drosophila melanogaster*'den (*D. melanogaster*) gelen dromomycin, alacalı böcek *Acrocinus longimanus*'dan (*A. longimanus*) gelen Alo 13 içerir. Bu defensinler içinde sadece termicin Gram pozitif bakterilerin büyümesini etkileyen kapasiteye sahiptir. Diğerleri antifungal olarak spor çimlenmesini inhibe eder veya hifal delinmesine yol açar (146). Thevisan ve arkadaşları 2004 yılında heliomycin'in *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) mantar glucosylceramides ile etkileşimi ile birlikte membran geçirgenliğine neden olduğu gösterilmiştir. Bugüne kadar böcek defensinlerinin ökaryotik ve prokaryotik hücreli sistemlerde protein sentezini engellediği bilinmemektedir. Heliomycin, dromomycin ve gallerimycin mantar patojenlerine karşı direncin belirlenmesinde transjenik tütün kullanılmıştır (147). Heliomycin ve dromomycin 44 amino asit uzunluğundadır. *G. mellonella* 76 amino asit taşıyan defensin benzeri gallerimycin peptidini salgılar. Gallerimycin, *M.luteus*, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *E.coli*, *Saccharomyces cerevisiae*(*S. cerevisiae*) gibi mikroorganizmalar üzerinde in vitro etkisi gösterildi. Ayrıca entomopatojenik mantar olan *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae*) karşı aktif olduğu gösterir (111). Hayat döngüleri boyunca böcekler, genellikle insan standartlarına göre oldukça sağlıklı kabul edilen doğal ortamlarda bakterilere karşı inanılmaz bir direnç geliştirirler. Böcekler, Gram pozitif, Gram negatif bakterilere ve mantarlara karşı hızlı bir şekilde geniş spektruma sahip antimikrobiyal peptitler (AMP) salgılayabilmektedir. Bu peptitler enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattını oluşturan korunmuş birleşenlerdir. 2000'den fazla AMP tanımlanmıştır. Bu peptitlerin büyük bir çoğunluğu, 5 kDa altındaki

moleküler ağırlıklı katyonik AMP sınıfına dahildir. Böceklerden izole edilen AMP'ler yapısal özelliklerine göre üç kategoride sınıflandırılmaktadır (148):

I-Linear peptitler. Sesropinler gibi sistein kalıntıları içermeyen bir α -sarmal yapısından oluşurlar.

II-Defensin en tipik örneği olan disülfid köprülerini ihtiva eden siklik peptitlerden oluşurlar.

III-Bir veya iki aminoasit kalıntısının fazla olduğu lineer peptitlerdir.

Böceklerden izole edilen defensinler birkaç istisna dışında 33-46 aminoasit büyüklüğündedir. Bunlar % 58-95 arasında değişen sekans benzerliği göstermektedirler.

2.8.3. Lucifensin

Lucifensin 40 amino asit ve molekül içi üç disülfid bağı ile köprü yapan defensindir. Lucifensin böcek defensinlerinden küçük (yaklaşık 5 kDa) sistein bakımından zengin bir antibakteriyel peptittir. Lucifensin Gram pozitif bakterilere karşı etkili, Gram negatif bakterilere, maya, filamentli mantarlara karşı az duyarlıdır (145, 149, 150). Defensinler sitoplazmik zar geçirgenliği bozarak bakteri hücrelerinin ölümüne yol açarlar (144, 145, 151). *Streptococcus* türleri, *S. epidermidis* ve *Enterococcus faecalis*'e (*E.faecalis*) karşı antibakteriyel etkinlik sergiledikleri ancak 128 mg/l konsantrasyonunda *E. coli* ve *P. aeruginosa*'nın üremesini inhibe etmede başarısız olduğu bildirilmiştir (72). Lucifensinin Gram negatif yara patojenlerine karşı tedavi edici etkinliği bazı endişeler uyarmaktadır. Lucifensin, diğer antimikrobiyal peptitler gibi bazı dokularda eksprese edilmektedir. *L. sericata* hemolenfinde lucifensin bağışıklık cevabı olarak düzenli bir şekilde üretilir. Maggot kurtçuklarının organlarında lucifensin peptidi belirlenmiştir (64). Lucifensin, *L. sericata* türünün kurtçuklarının larva tedavisinde kullanılan iyi karakterize edilmiş antibakteriyel maddedir (64). Lucifensin kurtçuk salgı ürünlerinde bulunmuş olup, yara patojenlerinin önlenmesinde rol aldığı varsayılmaktadır. Lucifensin başlangıçta larva bağırsağında izole edilmiş ve daha sonra tükürük bezlerinde, vücut yağlarında, hemolenfte saptanmıştır (64).

Ivana Valachová çalışmasında larva evrelerinin tükürük bezlerinde lucifensin ekspresyonunu doğruladı. Ekspresyon tükürük bezlerinin yağ bağlayıcı köprüleri ve

vücut yağ hücrelerinde tespit edildi. Şaşırtıcı bir şekilde lucifensin ekspresyonu bağırsaklarda tespit edilemedi. Bu çalışmada ayrıca lucifensinin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu da gösterildi (10).

Gram pozitif bakteriler, özellikle *Streptococcus* türleri ve *Staphylococcus* türlerine karşı etkili olduğu gösterilmişti. Ayrıca MRSA klinik izolatlarına karşı antibakteriyel aktive sergiler. MRSA'ya karşı düşük önleyici, MSSA'ya daha yüksek ölçüde önleyicidir (8-128 mg/l)(8 mg/l) (72). Bununla birlikte MDT uygulamasında MRSA dahil bakteri ile ilişkili kronik yaralarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (25). Lucifensin *L.sericata* ve diğer sinek larvalarından karakterize edilmiş antibakteriyel maddedir (64). Lucifensin, ilk olarak larvaların bağırsaklarında izole edildi. Daha sonra tükürük bezleri yağ ve hemolenfde tespit edilmiş olup yara inhibisyonunda rol oynadığı varsayılmaktadır (64). Larva aşamalarında hibridzasyon kullanarak lucifensin ekspresyonu tükürük bezlerinde gösterilmiştir. Lucifensin, tükürük salgılamasından sonra gıda ile birlikte yutulur ve sindirim sistemi yoluyla bağırsağa geçer (10). Bakteriyel stimülasyon üzerine anti-bakteriyel aktive genellikle ekspresyon ya da induktif ifade ile sağlanır. Daha önceleri larvaların bağışıklık sisteminin enfeksiyöz ortamında hayatta kalmak için antibakteriyel maddelerin üretimini sağlayarak aktif olabileceği belirtilmiştir (152). Larva enfeksiyöz ortamında hayatta kalabilmek için bağışıklık sisteminin aktif olabileceği ve antibakteriyel madde üretimi yapacağı (63) daha önce anlatılmıştı.

Lucifensin son birkaç yıl içinde *L. sericata* larvalarının hem sekresyonlarında hem de bağırsak, mide, hemolenf, vücut yağları gibi birçok dokudan ekstrakte edilmiştir. Elde edilen bu salgı özellikle geleneksel tedavi yöntemlerinin başarısız kaldığı nekrotik yaraların tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. 40 amino asit büyüklüğünde olan lucifensinin DNA dizisi sapecin ve diğer dipteran defensinlere çok benzemektedir (63, 66).

MDT sırasında salgı içeriğindeki lucifensinin larvayı enfeksiyöz çevreden koruduğu düşünülse de lucifensinin asıl aktivitesini birçok mikroorganizmaya karşı gösterdiği bildirilmiştir: *Staphylococcus carnosus* (*S. carnosus*), *S. pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)ve *S. aureus* (MIC 16 mg/L). Özellikle MRSA bulunan yaralarda MDT'nin başarılı bir şekilde uygulanması MDT'ye ilgiyi arttırmıştır. Larval

sekresyon ve dokularda Reverse faz HPLC ile tespit edilen lucifensin diğer insekt defensinlere oldukça benzerlik göstermekte ve oldukça korunmuş 6 sistein aminoasiti içermektedir (63, 66).

2011 yılında *M. luteus* ve *B. subtilis*'e karşı yüksek duyarlılığa sahip ilk sentetik lucifensin rapor edilmiştir. Bu sentetik peptitle *S. aureus*'e karşı daha düşük bir aktivite belirlenirken *E. coli*'ye karşı ise hiç aktivite belirlenmemiştir. Bunun sonucunda böcek defensinlerinin Gram negatif bakterilere göre Gram pozitif bakterilere karşı daha aktif olduğu gerçeği ortaya konulmuştur. Ayrıca bu peptitlerin *Candida albicans*'a (*C. albicans*) karşı düşük antifungal aktivite gösterdiği ve insan kırmızı kan hücrelerine karşı hemolitik olmadığı da rapor edilmiştir (148). Günümüzde antibiyotiklere direnç gösteren mikroorganizmalara karşı bile aktif olarak kullanılan ve etkin olduğu gösterilen MDT'nin bu etkisinden sorumlu olduğu düşünülen lucifensinin önümüzdeki yıllarda tek başına veya birçok antibiyotikle kombine formüllerinin geliştirilerek kullanılacağı düşünülmektedir.

2.8.4. Cymotrypsin

Debridmana yardımcı kurtçuk sekresyonların metaloproteazlar, serine proteazlar gibi bileşenleri ve antibakteriyel aktiviteleri olan ve iyileşmeye yardımcı olabilen aspartil bileşikler tespit edilmiştir (50). Biyoterapi etki mekanizması eksojen enzimatik debridman ürünleri arasında örtüşme vardır. *L. sericata* larvası, bazı insan analogları dâhil, ortak enzim spektrumu içeren sindirim salgıları kullanarak cansız dokuyu degrade eder (42). İlginç bir şekilde, bu enzimlerin bazıları, alkalın pH optimumuna sahiptir. Özel debridman ürünlerindeki streptokinaz ve kolajenaz ise, fizyolojik pH (43) papine yakın maksimum aktiviteye sahiptir. Bu da başka bir debridman madde olarak kabul edilmesini sağlamıştır. Bu madde geniş bir pH aralığında aktifliğe sahiptir (44). Bu nedenle, birçok klinisyen, debridman olarak adlandırılan ölü derinin yaralardan ayrılmasını, yara yönetiminde önemli bir klinik adım olarak görür (6). Biyocerrahi sırasında görülen etkin debridmandan sorumlu biyokimyasal mekanizmaları anlamamız için gerekli bir adım olarak, kurtçuk sekresyon veya ekstrasyonlarındaki enzimatik aktiviteler incelenmiştir. Aspartil metallo ve serin proteinaz aktivitelerini (42) keşfedildi, serin proteinazların fibroblast taşınmasını destekleyen hücre dışı matriks bileşenlerin çeşitliliğini azalttığı görülmüştür (46). Kurtçuk sekanslarının kimotriptik

aktivitesi ex vivo kabuklarını degrade ettiği tespit edilmiştir. Rekombinant kurtçuk chymotripsini üretilerek karakterize edilmiştir. Enzim, yara kabuğu ex vivolarını memeli chymotripsinlerine nazaran daha üstün bir şekilde degrade etmekte ve tek başına bir debridman maddesi olma potansiyeline sahiptir (11). Rekombinant chymotrypsin kurtçukların antibakteriyel yapışmaya engel olacağını göstermiştir. Bu da kurtçukların antibakteriyel etkilerini nasıl gösterdikleri konusundaki düşüncelerimize katkıda bulunmuştur. Açıkçası, protein adhezinler, yara dokusuna tutunmak için bakteriler tarafından kullanılan tek mekanizma değildir ve kurtçukların, chymotripsinin bir anahtar bileşeni olduğu biyoaktif bir antibofilim repertuar salgılayarak, in vivo bakteryal adhezinlere saldırdığına inanıyoruz (156). Rekombinant maggot chymotrypsin insan chymotripsine göre farklı inhibisyon profiline sahiptir ve yara kabuğunda aktif kalırken insan chymotrypsin engellenmektedir. Bu da kronik bacak ülserlerinde maggot biyocerrahisinin etkinliği için bir mekanizma önerir. Diğer maggot proteazları benzer aktiviteler gösterebilir ve bu şekilde kronik yaraların debridmanında ES içindeki enzimlere bir ortam oluşturur (157).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması öncesinde literatür taraması yapıldı. Çalışma için kullanılacak malzemeler, makine ve teçhizatlar belirlenerek deneyler için uygun alt yapı şartları oluşturuldu.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Tez çalışması, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan aşağıdaki cihaz ve malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi. (Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.)

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı/Modeli
32R Santrifüj (Hettich, Almanya)
Santrifüj (Thermo Scientific, ABD)
Chemidoc Imaging System (BIO RAD, ABD)
12C Yatay elektroforez cihazı (BIO RAD, ABD)
Güç Kaynağı (BIO RAD, ABD)
PCR Cihazı (Sensoquest, Almanya)
LightCycler 480 Real-Time PCR (ROCHE, ABD)
Santrifüj/Vorteks Cihazı (PeQlab Perfect Spin P, Almanya)
NanoDrop 2000c (ThermoScientific, ABD)
Su banyosu (Jeitech BS-06, Güney Kore)
İnkübatörlüshaker (Jeitech SI-300, Güney Kore)
VorteksBencmixer (Benchmark, ABD)
Kuru Isı Bloğu, Digital Heat Blog (Benchmark, ABD)
Mikrodalga Fırın (Beko MD1610,Türkiye)
-20 °C Derin Dondurucu (Uğur, Türkiye)
+4 °C Buzdolabı (Uğur, Türkiye)
-80 °C Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)
Santrifüj/Vorteks Cihazı (BioSan Multi-spin MSC-3000, Letonya)

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan malzemeler

Tanımı/ Adı
<i>L. sericata</i> ; Yumurta, Larva, Pupa, Erişkin
LB Katı Besiyeri
LB Sıvı Besiyeri
SOC Sıvı Besiyeri (Invitrogen, ABD)
Amphisinli LB Besiyeri
QIAmp tissue kit (Qiagen, ABD)
LS lucifensin F Primer: 5' – GGTACTGGTGTAAACATTCAGCTT -3' (25mer)
LS lucifensin R Primer: 5' – AATAACCGCCACGATTTTCCT -3' (20 mer)
LS cyhmotripsin F Primer: 5' - GCCAAAGTTAGCCACACTGTTA - 3' (22 mer)
LS cyhmotripsin R Primer: 5' - TCATTGGCCAAAGTATTGGAG - 3' (21 mer)
2* Taq PCR Master mix (Biomatik, ABD)
Sybergreen LightCycler 480 I Master (Roche, USA)
Agaroz jel
50 bp Marker (Promega, ABD)
CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoScientific, ABD)
OneShot TOP10 Chemically Competent E.coli hücreleri (Invitrogen, ABD)
Clean-up Kiti (Promega /Wizard SV Gel and PCR Clean-upsystem kit ABD)
Mini Prep Kiti (BIO BASIC INC. / EZ-10 SPIN Column Plasmid DNA Mini Prep Kit, Kanada)
TRIGent RNA isolation Reagent kiti (Biomatik, ABD)
Prime Script 1st StrandcDNASynthesis Kit (TAKARA, ABD)

3.2. Metod

3.2.1. İnsektaryum ve *Lucilia sericata* Kolonilerin Oluşturulması

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim dalındaki insektaryumda yapıldı. *L. sericata* türüne ait erişkin kolonileri üretildi. Sürekli üretim yapılacak koşullar oluşturuldu. İnsektaryumda sıcaklık, ışık, nem sağlayacak düzenekler kuruldu. *L. sericata* türüne ait yumurta, larva, pupa, erişkin sineklerin üretimi ve yaşam döngüsü takip edilerek sinek kolonileri oluşturuldu. İnsektaryumdan elde edilen

yumurtalar steril hale getirilip kanlı agar besi yerinde steril larvalar elde edildi. Yumurtaların sterilizasyon aşamaları kontrol edildi ve standardizasyon sağlandı. Uygun sıcaklık, nem ve ışık sağlayarak plastik kovanlarda sinek populasyonları oluşturuldu. Ayrıca insektaryumda bulunan sinek öldürücü düzeneklerle dışarıdan farklı bir türün kolonilere karışması engellendi.

3.2.2. *Lucilia sericata* Üretimi

Vahşi tabiattan toplanan *L. sericata* türlerinin 50-30-20 ebadındaki plastik kafesler içinde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık, 27-30°C' de ve % 50 nem bulunan ortamda, % 20'lik şeker solüsyonu ve karaciğer parçaları verilerek üretilmesi sağlandı (30). İsektaryumda yeni oluşturulan kovanlarda sinek yumurtaları ve daha sonra larva, pupa ve sinek oluşumu ile yeni koloniler üretildi.

3.2.3. Steril Maggot Üretimi

Maggot tedavide steril sinek larvaları kullanılır. Steril larva elde edilmesine erişkin sineklerin karaciğere yumurta bırakması ile başlandı. Öze yardımı ile toplanan yumurtalar sterilizasyon işleminden geçirildi.

3.2.3.1. Sterilizasyon için Kullanılacak Malzemeler

- Distile su
- Hipoklorit
- Formaldehit
- Serum fizyolojik
- Kanlı agar

3.2.3.2. Solüsyonlar

1. Solüsyon: Distile su + Hipoklorit (% 0,01)
2. Solüsyon: Distile su + Formaldehit (% 5)
3. Solüsyon: Distile su + Formaldehit (% 2,5)

3.2.3.3. Steril Maggot Üretimi

Sinekler ortama konulan şekerli sudan, su ve karbonhidrat ihtiyacını karşılarken, karaciğer parçaları ile protein ihtiyacını karşılarlar. Sinekler karaciğer doku parçacıklarından beslenirken aynı zamanda karaciğer dokusu üzerine yumurtalarını bırakırlar. Karaciğer dokusuna bırakılan yumurtalar öze yardımıyla toplandı ve % 0,01'lik hipoklorit solüsyonuna bırakıldı. Solüsyon ile birlikte kümelenmiş yumurtalar manyetik karıştırıcı vasıtasıyla birbirinden ayrılincaya kadar karıştırıldı. Küme halindeki yumurtalar birbirlerinden ayrıldıktan sonra üzerlerinde bulunan hipoklorit solüsyonun atılması için 2-3 kez serum fizyolojik ile yıkandı. Yıkanan yumurtalar sterilizasyon için % 5'lik formaldehit solüsyonuna aktarılarak 10 dakika bekletildi. Formaldehit solüsyondan alınan yumurtalardan formaldehitin uzaklaştırılması için 2-3 kez serum fizyolojik ile yıkandı. Bu şekilde steril edilen yumurtalar, steril kanlı agara aktarıldı. Kanlı agarda bulunan yumurtalar 27-30°C'de 24-36 saat inkübe edildi.

3.2.4. Çalışma Gruplarının Hazırlanması

İnsektaryum şartlarında elde edilen *L.sericata* yumurtaları çeşitli besi ortamlarında üretilmek üzere farklı gruplara ayrıldık. Bunun için yumurtalar aşağıda belirtilen 8 farklı ortamda beslenerek (27°C ve %50 nem bulunan ortamda) larva, pupa ve erişkinlerin üretimi sağlandı.

Bu guruplar:

- Kanlı agarda üretim
- Karaciğer dokusunda üretim
- Beyin dokusunda üretim
- Sığır eti dokusunda üretim
- *E. coli* eklenmiş tryptone soya agarda üretim
- *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda üretim
- *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda üretim
- *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agarda üretim

3.2.4.1. Grup 1: Steril Kanlı Agarda Üretim

- a. Sterilize edilen ve yıkanan yumurtalar, steril kanlı agarda bırakıldı.

Kanlı Agarın Hazırlanması: Bir litre deiyonize suya 37 gr blood agar base (Plasmatec, UK) konuldu. 121°C'de 15 dakika otaklovlandı. Oluşan agar petri kaplarına aktarıldı.

Steril kanlı agarda yumurtalardan; larva, pupa ve erişkin gelişimi sağlanmaya çalışıldı. Bu hayat formlarından lucifensin ve chymotripsingen ekspresyon seviyelerinin ölçümü için aşağıda belirtildiği gibi örnekler alındı ve etiketlendi.

- b. Yumurtalar kanlı agarda bırakıldıktan sonra altışar saat aralıklarla 6. saatte (Ka.Y1= Kanlı agar Yumurta 1), 12. saatte (Ka.Y2) ve 18. saatte (Ka.Y3) ikişer kez üçer adet örnek alındı.
- c. Steril kanlı agarda gelişen larvalardan, ilk larva gelişiminden itibaren on ikişer saat aralıklarla 12. saatte (Ka.L1), 24. saatte (Ka.L2) ve 36. saatte (Ka.L3) olmak üzere ikişer kez iki adet örnek alındı.
- d. Pupa örnekleri ise ikişer kez iki adet olmak üzere 24 saat aralıklarla ilk pupa gelişiminden sonraki 24.saatte (Ka.P1), 48.saatte (Ka.P2) ve 72.saatte (Ka.P3) alındı.
- e. Erişkinlerden ise beşer gün aralıklarla ilk erişkinin pupadan çıkmasından hemen sonra (Ka.E1), 5.gün (Ka.E2) ve 10.gün (Ka.E3) iki kez birer adet örnek alındı.

3.2.4.2. Grup 2: Karaciğer Dokusunda Üretim

- a. Sterilize edilen ve yıkanan yumurtalar, steril karaciğer dokusuna (– 80°C bir gece bekletilerek steril hale getirildi) bırakıldı. Yumurtalardan larva, pupa ve erişkin gelişimi sağlanmaya çalışıldı. Bu hayat formlarından lucifensin ve chymotripsingen ekspresyon seviyelerinin ölçümü için aşağıda belirtildiği gibi örnekler alındı ve etiketlendi.
- b. Yumurtalar karaciğere bırakıldıktan sonra altışar saat aralıklarla 6. saatte (Kc.Y1= Karaciğer Yumurta 1), 12. Saatte (Kc.Y2) ve 18. saatte (Kc.Y3) ikişer kez üçer adet örnek alındı.

- c. Steril karaciğer dokusunda gelişen larvalardan, ilk larva gelişiminden itibaren on ikişer saat aralıklarla 12. saatte (Kc.L1), 24. saatte (Kc.L2) ve 36. saatte (Kc.L3) olmak üzere ikişer kez iki adet örnek alındı.
- d. Pupa örnekleri ise ikişer kez iki adet olmak üzere 24 saat aralıklarla ilk pupa gelişiminden sonraki 24.saatte (Kc.P1), 48.saatte (Kc.P2) ve 72.saatte (Kc.P3) alındı.
- e. Erişkinlerden ise beşer gün aralıklarla ilk erişkinin pupadan çıkmasından hemen sonra (Kc.E1), 5.gün (Kc.E2) ve 10.gün (Kc.E3) iki kez birer adet örnek alındı

3.2.4.3. Grup 3: Beyin Dokusunda Üretim

- a. Sterilize edilen ve yıkanan yumurtalar, steril beyin dokusunda (-80°C bir gece bekletilerek steril hale getirildi) bırakıldı. Yumurtalardan larva, pupa ve erişkin gelişimi sağlanmaya çalışıldı. Bu hayat formlarından lucifensin ve chymotripsin gen ekspresyon seviyelerinin ölçümü için aşağıda belirtildiği gibi örnekler alındı ve etiketlendi.
- b. Yumurtalar beyin besi yerine bırakıldıktan sonra altışar saat aralıklarla 6. saatte (Be.Y1= Beyin Yumurta 1), 12. saatte (Be.Y2) ve 18. saatte (Be.Y3) ikişer kez üçer adet örnek alındı.
- c. Steril beyin dokusunda gelişen larvalardan, ilk larva gelişiminden itibaren on ikişer saat aralıklarla 12. saatte (Be.L1), 24. saatte (Be.L2) ve 36. saatte (Be.L3) olmak üzere ikişer kez iki adet örnek alındı.
- d. Pupa örnekleri ise ikişer kez iki adet olmak üzere 24 saat aralıklarla ilk pupa gelişiminden sonraki 24.saatte (Be.P1), 48.saatte (Be.P2) ve 72.saatte (Be.P3) alındı.
- e. Erişkinlerden ise beşer gün aralıklarla ilk erişkinin pupadan çıkmasından hemen sonra (Be.E1), 5.gün (Be.E2) ve 10.gün (Be.E3) iki kez birer adet örnek alındı

3.2.4.4. Grup 4: Sığır Eti Dokusunda Üretim

- a. Sterilize edilen ve yıkanan yumurtalar, steril sığır eti dokusunda ($- 80^{\circ}\text{C}$ bir gece bekletilerek steril hale getirildi) bırakıldı. Yumurtalardan larva, pupa ve erişkin gelişimi sağlanmaya çalışıldı. Bu hayat formlarından lucifensin ve chymotripsin gen ekspresyon seviyelerinin ölçümü için aşağıda belirtildiği gibi örnekler alındı ve etiketlendi.
- b. Yumurtalar, sığır eti dokusuna bırakıldıktan sonra altışar saat aralıklarla 6. saatte (Se.Y1= Sığır Eti Yumurta 1), 12. saatte (Se.Y2) ve 18. saatte (Se.Y3) ikişer kez üçer adet örnek alındı.
- c. Steril sığır eti dokusunda gelişen larvalardan, ilk larva gelişiminden itibaren on ikişer saat aralıklarla 12. saatte (Se.L1), 24. saatte (Se.L2) ve 36. saatte (Se.L3) olmak üzere ikişer kez ikişer adet örnek alındı.
- d. Pupa örnekleri ise ikişer kez ikişer adet olmak üzere 24 saat aralıklarla ilk pupa gelişiminden sonraki 24. saatte (Se.P1), 48. saatte (Se.P2) ve 72. saatte (Se.P3) alındı.
- e. Erişkinlerden ise beşer gün aralıklarla ilk erişkinin pupadan çıkmasından hemen sonra (Se.E1), 5.gün (Se.E2) ve 10.gün (Se.E3) iki kez birer adet örnek alındı.

3.2.4.5. Grup 5: *Escherichia coli* Eklenmiş Tryptone Soya Agarda Üretim

- a. Tryptone Soya Agarın Hazırlanması: Bir deiyonize suya 40 gr agar (OXOID, USA) konuldu. 121°C 'de 15 dakika otoklavlandı. Oluşan agar petri kaplarına aktarıldı. Agara *E. coli* bakterisinin ekimi yapıldıktan sonra agar, 37°C 'de 24 saat inkube edildi.
- b. Sterilize edilen ve yıkanan yumurtalar, steril tryptone soya agar ortamına ekilen *E. coli* (ATCC-25922) besi yerine bırakıldı.
- c. Yumurtalardan larva, pupa ve erişkin gelişimi sağlanmaya çalışıldı. Bu hayat formlarından lucifensin ve chymotrypsin gen ekspresyon seviyelerinin ölçümü için aşağıda belirtildiği gibi örnekler alındı ve etiketlendi.

- d. Yumurtalar *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ortamına bırakıldıktan sonra altışar saat aralıklarla 6. saatte (Ec.Y1= *E. coli* Yumurta 1), 12. saatte (Ec.Y2) ve 18. saatte (Ec.Y3) ikişer kez üçer adet örnek alındı.
- e. *E. coli* eklenmiş tryptone soya agarda gelişen larvalardan, ilk larva gelişiminden itibaren on ikişer saat aralıklarla 12. saatte (Ec.L1), 24. saatte (Ec.L2) ve 36. saatte (Ec.L3) olmak üzere ikişer kez iki adet örnek alındı.
- f. Pupa örnekleri ise ikişer kez iki adet olmak üzere 24 saat aralıklarla ilk pupa gelişiminden sonraki 24.saatte (Ec.P1), 48.saatte (Ec.P2) ve 72.saatte (Ec.P3) alındı.
- g. Erişkinlerden ise beşer gün aralıklarla ilk erişkinin pupadan çıkmasından hemen sonra (Ec.E1), 5.gün (Ec.E2) ve 10.gün (Ec.E3) iki kez birer adet örnek alındı.

3.2.4.6. Grup 6: *Enterococcus faecalis* Eklenmiş Kanlı Agarda Üretim

- a. Sterilize edilen ve yıkanan yumurtalar, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan steril kanlı agar ortamına ekilen *E. faecalis* (ATCC-29212) besi yerine bırakıldı. Yumurtalardan larva, pupa ve erişkin gelişimi sağlanmaya çalışıldı. Bu hayat formlarından lucifensin ve chymotripsingen ekspresyon seviyelerinin ölçümü için aşağıda belirtildiği gibi örnekler alındı ve etiketlendi.
- b. Yumurtalar *E. faecalis* eklenmiş kanlı agara bırakıldıktan sonra altışar saat aralıklarla 6. saatte (Ef.Y1= *E. faecalis* Yumurta 1), 12. saatte (Ef.Y2) ve 18. saatte (Ef.Y3) ikişer kez üçer adet örnek alındı.
- c. Steril *E. faecalis* eklenmiş kanlı agarda gelişen larvalardan, ilk larva gelişiminden itibaren on ikişer saat aralıklarla 12. saatte (Ef.L1), 24. saatte (Ef.L2) ve 36. saatte (Ef.L3) olmak üzere ikişer kez iki adet örnek alındı.
- d. Pupa örnekleri ise ikişer kez iki adet olmak üzere 24 saat aralıklarla ilk pupa gelişiminden sonraki 24.saatte (Ef.P1), 48.saatte (Ef.P2) ve 72.saatte (Ef.P3) alındı.

- e. Erişkinlerden ise beşer gün aralıklarla ilk erişkinin pupadan çıkmasından hemen sonra (Ef.E1), 5.gün (Ef.E2) ve 10.gün (Ef.E3) iki kez birer adet örnek alındı.

3.2.4.7. Grup 7: *Staphylooccus aureus* Eklenmiş Tryptone Soya Agarda Üretim

- a. Sterilize edilen ve yıkanan yumurtalar, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan steril tryptone soya agara ekilen *S. aureus* (ATCC-29213) ortamına bırakıldı. Yumurtalardan larva, pupa ve erişkin gelişimi sağlanmaya çalışıldı. Bu hayat formlarından lucifensin ve chymotripsingen ekspresyon seviyelerinin ölçümü için aşağıda belirtildiği gibi örnekler alındı ve etiketlendi.
- b. Yumurtalar *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agara bırakıldıktan sonra altışar saat aralıklarla 6. saatte (Sa.Y1= *S.aureus* Yumurta 1), 12. saatte (Sa.Y2) ve 18. saatte (Sa.Y3) ikişer kez üçer adet örnek alındı.
- c. Steril *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda gelişen larvalardan, ilk larva gelişiminden itibaren on ikişer saat aralıklarla 12. saatte (Sa.L1), 24. saatte (Sa.L2) ve 36. saatte (Sa.L3) olmak üzere ikişer kez iki adet örnek alındı.
- d. Pupa örnekleri ise ikişer kez iki adet olmak üzere 24 saat aralıklarla ilk pupa gelişiminden sonraki 24.saatte (Sa.P1), 48.saatte (Sa.P2) ve 72.saatte (Sa.P3) alındı.
- e. Erişkinlerden ise beşer gün aralıklarla ilk erişkinin pupadan çıkmasından hemen sonra (Sa.E1), 5.gün (Sa.E2) ve 10.gün (Sa.E3) iki kez birer adet örnek alındı.

3.2.4.8. Grup 8: *Pseudomonas aeruginosa* Eklenmiş Tryptone Soya Agarda Üretim

- a. Sterilize edilen ve yıkanan yumurtalar, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan steril tryptone soya ağara ekilen *P. aeruginosa* (ATCC-27853) ortamına bırakıldı. Yumurtalardan larva, pupa ve erişkin gelişimi sağlanmaya çalışıldı. Bu hayat formlarından lucifensin ve chymotripsingen ekspresyon seviyelerinin ölçümü için aşağıda belirtildiği gibi örnekler alındı ve etiketlendi.

- b. Yumurtalar, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agara bırakıldıktan sonra altışar saat aralıklarla 6. saatte (Pa.Y1= *P.aeruginosa* Yumurta 1), 12. saatte (Pa.Y2) ve 18. saatte (Pa.Y3) ikişer kez üçer adet örnek alındı.
- c. Steril *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agarda gelişen larvalardan, ilk larva gelişiminden itibaren on ikişer saat aralıklarla 12. saatte (Pa.L1), 24. saatte (Pa.L2) ve 36. saatte (Pa.L3) olmak üzere ikişer kez iki adet örnek alındı.
- d. Pupa örnekleri ise ikişer kez iki adet olmak üzere 24 saat aralıklarla ilk pupa gelişiminden sonraki 24.saatte (Pa.P1), 48.saatte (Pa.P2) ve 72.saatte (Pa.P3) alındı.
- e. Erişkinlerden ise beşer gün aralıklarla ilk erişkinin pupadan çıkmasından hemen sonra (Pa.E1), 5.gün (Pa.E2) ve 10.gün (Pa.E3) iki kez birer adet örnek alındı.

Sekiz farklı besiyeri ortamında üretilen *L. sericata* kolonilerinden elde edilen ve yukarıdaki gibi etiketlenen örnekler Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Bu örnekler RNA izolasyonu için kullanılabilecek kadar 500 µl RNA later (SIGMA, USA) konuldu.

Tablo 3.3. *L. sericata*'nın üretiminde kullanılan besi yeri ortamları ve etiketlenen örnekler

Besî Yeri Ortamı	Yumurta Dönemi*			Larval Dönem**			Pupa Dönemi**			Erişkin Dönem***		
	Y1	Y2	Y3	L1	L2	L3	P1	P2	P3	E1	E2	E3
Kanlı agar besi yeri	Ka-Y1	Ka-Y2	Ka-Y3	Ka-L1	Ka-L2	Ka-L3	Ka-P1	Ka-P2	Ka-P3	Ka-E1	Ka-E2	Ka-E3
Karaciğer besi yeri	Kc-Y1	Kc-Y2	Kc-Y3	Kc-L1	Kc-L2	Kc-L3	Kc-P1	Kc-P2	Kc-P3	Kc-E1	Kc-E2	Kc-E3
Beyin besi yeri	Be-Y1	Be-Y2	Be-Y3	Be-L1	Be-L2	Be-L3	Be-P1	Be-P2	Be-P3	Be-E1	Be-E2	Be-E3
Sığır eti besi yeri	Se-Y1	Se-Y2	Se-Y3	Se-L1	Se-L2	Se-L3	Se-P1	Se-P2	Se-P3	Se-E1	Se-E2	Se-E3
<i>Escherichia coli</i> eklenmiş tryptone soya agar besi yeri	Ec-Y1	Ec-Y2	Ec-Y3	Ec-L1	Ec-L2	Ec-L3	Ec-P1	Ec-P2	Ec-P3	Ec-E1	Ec-E2	Ec-E3
<i>Enterococcus faecalis</i> eklenmiş kanlı agar besi yeri	Ef-Y1	Ef-Y2	Ef-Y3	Ef-L1	Ef-L2	Ef-L3	Ef-P1	Ef-P2	Ef-P3	Ef-E1	Ef-E2	Ef-E3
<i>Staphylococcus aureus</i> eklenmiş tryptone soya agar besi yeri	Sa-Y1	Sa-Y2	Sa-Y3	Sa-L1	Sa-L2	Sa-L3	Sa-P1	Sa-P2	Sa-P3	Sa-E1	Sa-E2	Sa-E3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> eklenmiş tryptone soya agar besi yeri	Pa-Y1	Pa-Y2	Pa-Y3	Pa-L1	Pa-L2	Pa-L3	Pa-P1	Pa-P2	Pa-P3	Pa-E1	Pa-E2	Pa-E3

Her bir hayat döneminin farklı zamanlarında alınan örnekler ikişer adet olarak alınmıştır

*; Her bir örnek 3 adet yumurta içermektedir

**; Her bir örnek 2 adet larva/pupa içermektedir

***; Her bir örnek 1 adet erişkin içermektedir

3.2.5. Total Genomik DNA İzolasyonu

Total Genomik DNA İzolasyonu, QIAmp DNA mini kit (QIAGEN, ABD) kullanılarak aşağıdaki basamaklarla yapıldı:

1. Mikrosantrifüj tüpüne konulan larva iyice ezildi.
2. Üzerine 180 µl ATL Buffer eklendi.
3. Daha sonra üzerine 20 µl Proteinaz K eklendi ve mikrosantrifüj tüpü vortekslendi.
4. Karışım 56°C'de su banyosunda bir gece hafif sallayarak inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında 3000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Örneğin üzerine 200 µl Buffer AL eklenerek vortekslendi.
7. Örnek kuru ısı bloğunda 70°C'de 10 dakika bekletildi.
8. Tekrar 3000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen tüpe 200 µl etanol (% 96-% 100) eklendi ve vortekslendi.
9. Daha sonra 3000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen örneğin tamamı spinkoluma aktarıldı.
10. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj sonrası alt kısım atıldı ve spinkolum yeni bir tüpe yerleştirildi.
11. Üzerine 500 µl Buffer AW1 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Alt kısım atıldıktan sonra spinkolum, yeni bir tüpe yerleştirildi.
13. Üzerine 500 µl Buffer AW2 eklendi ve 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
14. Alt kısım atıldı ve spinkolum tekrar yeni bir tüpe yerleştirilerek 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
15. Spinkolum steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve üzerine 100 µl Buffer AE eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

16. Bu basamak 3 kez tekrar edildi. Spinkolumdan tüpe süzülen kısım atıldı ve tekrar spinkoluma yeni bir tüp yerleştirilerek santrifüj tekrarlandı.
17. En son aşamada spinkolum atıldı ve mikrosantrifüj tüpü alındı.
18. Total genomik DNA içeren mikrosantrifüj tüpü kullanılana kadar -20°C 'de saklandı.

3.2.6. *Lucilia sericata* Lucifensin, Chymotrypsin Gen Primerleri ve PCR

Çalışmada yumurta, larva, pupa ve erişkinlerden elde edilen örneklerdeki *L. sericata* lucifensin ve chymotrypsin gen ekspresyon seviyelerinin tespiti için öncelikle lucifensin ve chymotrypsin DNA standartları oluşturuldu. Bunun için lucifensin ve chymotrypsin gen kısmi parçaları klonlandı. Klonlama öncesi *L. sericata* lucifensin ve chymotrypsin gen parçaları PCR ile çoğaltıldı. 67 bp büyüklüğündeki *L. sericata* lucifensin gen parçasının PCR ile çoğaltılması için aşağıdaki primerler kullanıldı:

- Ls luc F: : (5' - GGTACTGGTGTAAACATTCAGCTT-3')
- Ls luc R: : (5' - AATAACCGCCACGATTCCT -3')

PCR reaksiyonunda template DNA olarak *L. sericata* larvasından elde edilen total genomik DNA kullanıldı. PCR reaksiyonu için 50 μl 'lik aşağıdaki karışım hazırlandı:

- 2x Master mix: 25 μl
- Ls luc F: 2 μl
- Ls luc R: 2 μl
- dH₂O: 17 μl
- *L. sericata* genomik DNA: 4 μl

95°C'de 1 dakika ön ısıtma sonrası, sırasıyla 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 59°C'de 30 saniye bağlanma, 72 °C'de 30 saniye uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72°C'de 15 dakikalık son uzama ile biten PCR programı kullanıldı. PCR ürünü, etidyum bromürle boyanmış % 1,5'luk agaroz jelde yürütüldü ve Chemidoc Imaging System (BIO RAD, ABD) görüntüleme cihazıyla görüntülendi.

77 bp büyüklüğündeki *L. sericata* chymotrypsin gen parçasının PCR ile çoğaltılması için ise aşağıdaki primerler dizayn edildi ve kullanıldı:

- Ls chy F: (5'-GCCAAAGTTAGCCACACTGTTA-3')
- Ls chy R: (5'-TCATTGGCCAAAGTATTGGAG-3')

L. sericata chymotrypsin gen parçasının PCR ile çoğaltılma işlemi yukarıda lucifensin için belirtilen şartlar kullanılarak yapıldı. PCR ürünü agaroz jelde yürütüldü ve görüntüledi.

3.2.7. Lucifensin ve Chymotrypsin DNA'sının Agaroz Jelden Saflaştırılması

L. sericata lucifensin ve chymotripsin DNA'larının agaroz jelden saflaştırılma işlemi, Clean-up Kiti (Promega /Wizard SV Gel and PCR Clean-upsystem kit ABD) kullanılarak üretici firma önerisi modifiye edilerek aşağıdaki şekilde yapıldı:

1. Agaroz jelde yürütülen ve UV (Promega, ABD) altında görülen lucifensin ve chymotripsin PCR ürünleri kesilerek her biri ayrı steril bir mikrosantrifüj tüpüne koyuldu.
2. Örneklerin üzerine 350 µl Membrane Binding Solution (Membran Bağlama Solüsyonu) eklenerek vortekslendi ve 60°C'de kuru ısı bloğunda inkübe edildi.
3. Agaroz jel tamamen çözünene kadar inkübasyona devam edildi. Çözünen jel spinkolumlara aktarılarak oda ısısında 1 dakika bekletildi. Sonrasında 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Spin kolumdan tüpe süzülen kısım atılarak spinkolum yeni bir tüpe yerleştirildi. Üzerine 700 µl Membrane Wash Solution eklenerek 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Spinkolumdan tüpe süzülen kısım tekrar atılarak spinkolum yeni bir tüpe yerleştirildi ve üzerine 500 µl Membrane Wash Solution eklenerek 13.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Tüpe süzülen kısım atıldı ve spinkolum yeni bir tüpe yerleştirilerek 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

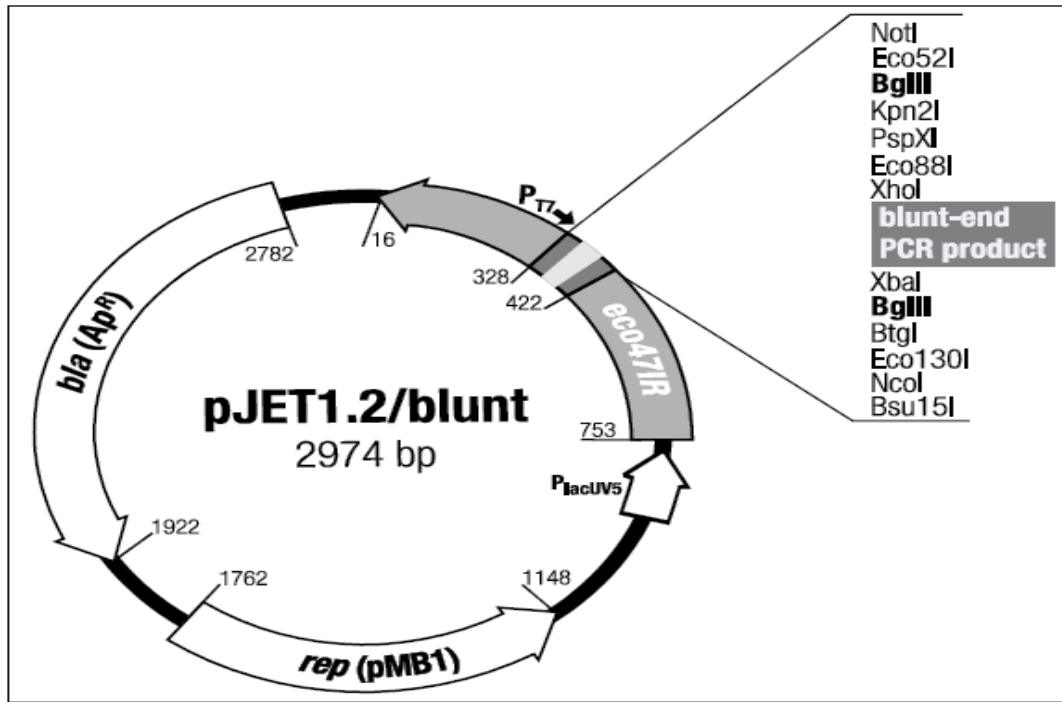
7. Alttaki mikrosantrifüj tüpü atılarak spinkolum, steril yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
8. Sonrasında üzerine 25 µl Nucleasefree Water eklenerek oda sıcaklığında 3 dakika bekletildikten sonra 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası spinkolumlar atılarak, DNA içeren alt kısımdaki tüpler alındı ve elde edilen saflaştırılmış ürünler, pJET1.2 plazmitine klonlanana kadar -20°C'de saklandı.

3.2.8. *Lucilia sericata* Lucifensin ve Cymotripsin Gen Parçalarının pJET1.2 Plazmitine klonlanması

L. sericata lucifensin ve cymotripsin kısmi gen parçalarının klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoScientific, ABD) kullanıldı. Lucifensin kısmi gen parçasının klonlama reaksiyonu için 18 µl'lik ligasyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı;

- 10 µl Reaksiyon Buffer,
- 1 µl Lucifensin kısmi gen parçasının saflaştırılmış DNA'sı
- 1 µl DNA Blunting Enzim,
- 6 µl dH₂O

Karışım vortekslenerek 70°C'de 5 dakika inkübe edildi ve hemen ardından buza konuldu. Karışım üzerine 1 µl pJET1.2/bluntCloningVector (50ng/µ) ve 1 µl T4 DNA Ligase eklenerek toplam 20 µl'ye tamamlandı. Karışım vortekslenerek 22°C'de 5 dakika inkübe edildi. Ligasyon ürününün 5 µl'si transformasyon için kullanıldı. Geriye kalan ürün -20°C'de saklandı. *L. sericata* chymotrypsin kısmi gen parçası da yukarıda lucifensin için belirtilen aşamalar uygulanarak pJET1.2 plazmitine yerleştirilerek rekombinant plazmit oluşturuldu.



Şekil 3.1. pJET1.2/blunt vektör haritası.

3.2.9. Rekombinat Plazmidin Kompetan *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu

-80°C’de saklanan TOP10 Competent *E. coli* hücreleri buz içerisinde 30 dakika bekletilerek eritildi. Kompetan hücre içerisine 5 µl ligasyon ürünü eklenerek 30 dakika buz içerisinde inkübe edildi. Sonrasında kompetan hücre-ligasyon ürün karışımı sırasıyla 42°C’de 1 dakika buzda 1-5 dakika bekletildi. Üzerine 250 µl SOC medium eklenerek 1,5 saat 37°C’de 200 rpm’de inkübe edildi. 1,5 saat sonunda hücreler, LB katı besi yerine yayıldı ve bir gece 37°C’de (16-18 saat) inkübe edildi.

LB katı besi yerinde kolonilerin oluşumu gözlemlendikten sonra besi yerindeki koloniler numaralandırılarak yeni bir besi yerine tek nokta ekimi yapıldı. Yeni besi yeri 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. *L. sericata* lucifensin ve cyhmotripsin ligasyon ürünleri, kompetan *E. coli* hücrelerine ayrı ayrı transforme edilerek koloniler gözlemlendi.

3.2.10. Klonlanmanın doğrulanması

PCR Screening yöntemi ve Miniprep sonrasında PCR yöntemi ile Klonlanmanın doğrulanması yapıldı.

3.2.10.1. PCR Screening ile Doğrulama

Katı besiyerinde oluşan kolonilerin rekombinant plazmiti içerip içermediğini tespit etmek için PCR screening yapıldı.

Her bir koloni için aşağıda belirtilen 25 µl'lik PCR Screening karışımı hazırlandı:

- Master mix 12,5 µl
- F primeri 1 µl
- R primeri 1 µl
- dH₂O 10,5 µl

Lucifensin PCR reaksiyonu için F ve R primeri olarak Ls luc F ve Ls luc R primerleri kullanılırken, chymotrypsin PCR reaksiyonu için Ls chy F ve Ls chy R primerleri kullanıldı. PCR karışımına rekombinant plazmit içerdiği düşünülen koloni kürdanla eklendi. PCR screening protokolü uygulandı. PCR ürünü, etidyum bromürle boyanmış % 1,5'lük agaroz jelde yürütülerek Chemidoc Imaging System (BIO RAD, ABD) görüntüleme cihazıyla görüntülendi.

3.2.10.2. Miniprep ve PCR ile Doğrulama

Kolonilerdeki rekombinant plazmitin varlığını doğrulamak için ayrıca miniprep ve sonrasında PCR yapıldı. Miniprep işlemi EZ-10 SPIN Column Plasmid DNA Mini Prep Kit (BIO BASIC INC, ABD) kullanılarak yapıldı. Kolonilerinden her biri steril kürdanla alınıp 5 ml'lik sıvı besi yerine eklendi ve bir gece 37°C'de sallanarak inkübe edildi. Bir gece inkübasyon sonrası kültür, 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst kısım atıldı ve pelet üzerine 100 µl Solüsyon I eklenerek karışımın homojenize edildi. Karışım üzerine 200 µl Solüsyon II eklendi ve 1 dakika inkübe edildi. Ardından 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst kısım Ez-10 koluma aktarıldı ve kolum mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolum içeren mikrosantrifüj tüpü 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Sonrasında kolum yeni bir tüpe aktarıldı. Kolum üzerine 750 µl Wash Solution eklendi ve 10.000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpü atıldı ve kolum yeni tüpe yerleştirildi. Washsolution ile yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Santrifüj sonrası kolum yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi ve 2 dakika

inkübe edildi. Sonrasında 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen rekombinant plazmit DNA, NanoDrop 2000c (ThermoScientific, ABD) ile ölçüldü.

Miniprep ile elde edilen rekombinant plazmit DNA'nın lucifensin ve cyhmotripsin gen parçasını içerip içermediğini doğrulamak için PCR yapıldı ve PCR ürünleri, etidyum bromürle boyanmış % 1,5'luk agaroz jelde yürütüldü ve Chemidoc Imaging System (BIO RAD, ABD) görüntüleme cihazıyla görüntülendi.

3.2.11. Örneklerden Total RNA İzolasyonu

Örneklerden RNA izolasyonu için TRIGent RNA isolation Reagent kiti (Biomatik, ABD) kullanıldı. RNA later'da bekletilen örneklerden RNA izolasyonu yapıldı. Üzerine 750 µl TRIGent eklenerek vortekslendi ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Ardından 200 µl kloroform eklenerek vortekslendi ve 5 dakika oda ısısında bekletildi. Örnek 12.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç faza ayrılan örneklerin RNA içeren üst kısmı yeni bir tüpe aktarıldı. Üst sıvıya 500 µl izopropanol eklenerek vortekslendi ve 10 dakika oda ısısında bekletildi. +4°C'de 12.000 rpm 'de 8 dakika santrifüj sonrası üst sıvı atıldı. Pelet üzerine % 75'lik etanolden 750 µl eklendi ve vortekslendi. 12.000 rpm'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı ve hafifçe kurutulan pelet üzerine 100 µl steril saf su eklendi. Total RNA, kullanılana kadar -80°C'de saklandı.

3.2.12. cDNA sentezi

Total RNA'dan cDNA için Prime Script 1st Strand cDNASynthesis Kit (TAKARA, ABD) kullanıldı. cDNA sentezi için aşağıdaki 10 µl'lik karışım hazırlandı:

- dNTPmixture: 1 µl
- RNaseFree dH₂O: 7 µl
- Random 6 mers: 1 µl
- Template RNA: 1 µl

Yukarıdaki karışım 65°C’de 5 dakika inkübe edilerek buza konuldu. Bu karışımın üzerine aşağıdaki karışım eklenerek toplamda 20 µl’lik karışımı elde edildi;

- Prime ScriptBuffer: 4 µl
- Prime ScriptRTase: 1 µl
- RNasefree dH₂O: 4,5 µl
- RNaseinhibitör: 0,5 µl

20 µl’lik toplam karışım parmakla hafifçe vortekslendi ve sırasıyla 30 °C’de 10 dakika, 42°C’de 30-60 dakika, 95°C’de 5 dakika inkübe edildi. Ürün PCR işlemine kadar -20 °C’de saklandı.

3.2.13. Standartların Hazırlanması ve cDNA’dan Real-Time PCR

L. sericata lucifensin ve cyhmotripsin gen ekspresyon standartlarının oluşturulması için, miniprep ile elde edilen lucifensin ve cyhmotripsin gen parçalarını içeren rekombinant plazmitler; sulandırmadan, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 olmak üzere dilüe edildi. Bu sulandırmalar Real-Time PCR’da kullanıldı.

Gen ekspresyon analizi yapılacak örneklerin cDNA’ları NanoDrop 2000c (ThermoScientific, ABD) ile ölçüldü. Aynı miktar DNA ile *L. sericata* evrelerindeki lucifensin ve cyhmotripsin gen ekspresyonunu değerlendirmek için her biri eşit miktarda DNA içerecek şekilde hesaplama yapıldı ve buna göre kuyucuklara eklendi. Hesaplama yapılırken en küçük DNA değeri olan Pupa1 (45ng/µl) baz alınarak tüm örneklerin DNA miktarı 180 ng olacak şekilde hesaplama yapıldı.

Örneklerden Real-Time PCR ile *L. sericata* lucifensin ve cyhmotripsin gen ekspresyon analizi için (her bir örnek için) 20 µl’ye dH₂O ile tamamlanan aşağıdaki karışım ayrı ayrı hazırlandı:

- Sybergreen: 10 µl
- Primer F: 1 µl
- Primer R: 1 µl
- DNA: 180 ng

Lucifensin gen ekspresyon analizi için primer olarak Ls luc F ve Ls luc R, cyhmotripsin gen ekspresyon analizi için ise Ls chy F ve Ls cyh R kullanıldı. Hazırlanan seri dilüsyon standartları, negatif kontrol ve örnekler Real-Time PCR pleytine eklendi.

Real-Time PCR reaksiyonu için; 95°C'de 10 dakika 1 döngü, 95°C'de 10 saniye, 60 °C'de 30 saniye ve 72°C'de 1 saniye 45 döngü sonrasında 40°C'de 30 saniye 1 döngüden oluşan program kullanıldı.

3.2.14. İstatistiksel Analiz

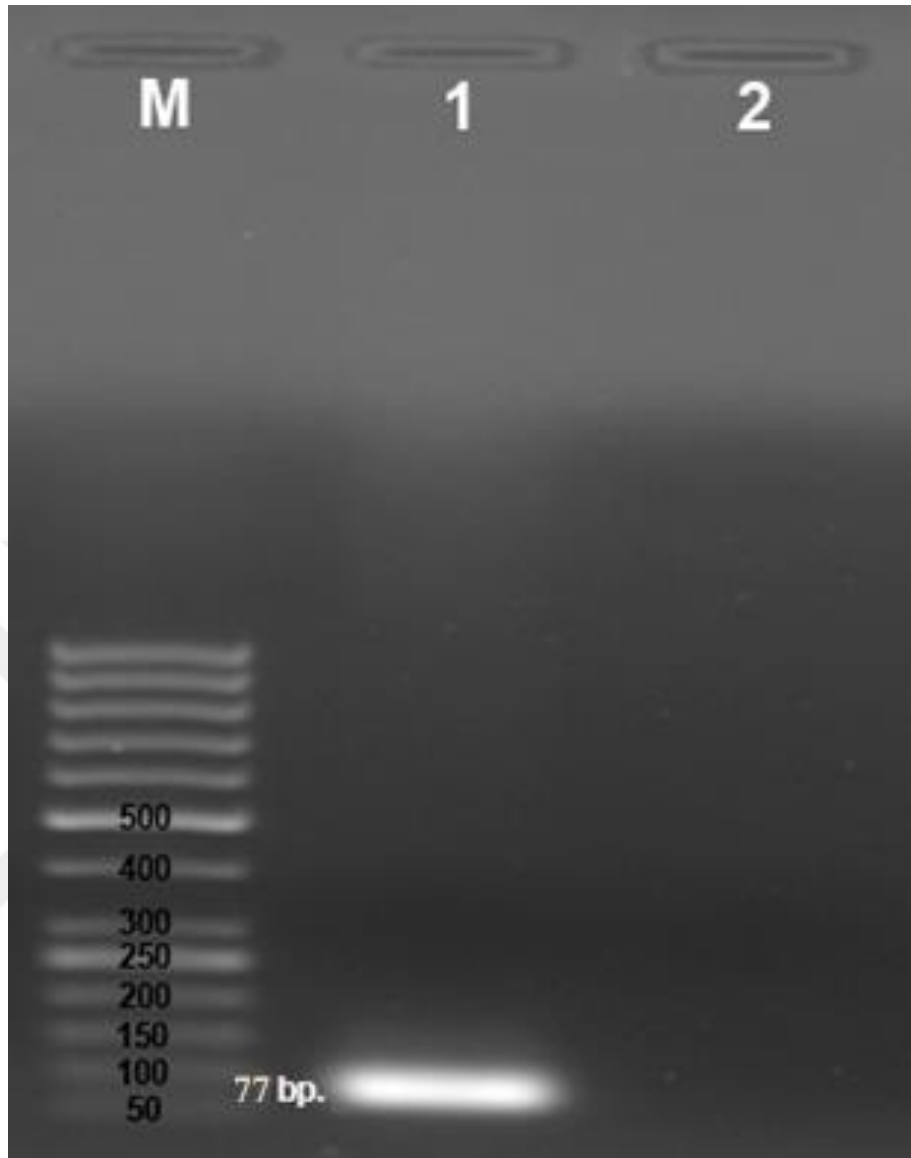
Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizleri için tek yönlü varyans analizi LSD kullanıldı. Tüm veriler ortalama± standart ortalama hata (mean±SEM) olarak verildi. Örneklerin durumlarına göre karşılaştırmak için Kruskal-Wals, Student-Newman-Keuls, 2 Student t testi yapıldı. P değeri <0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

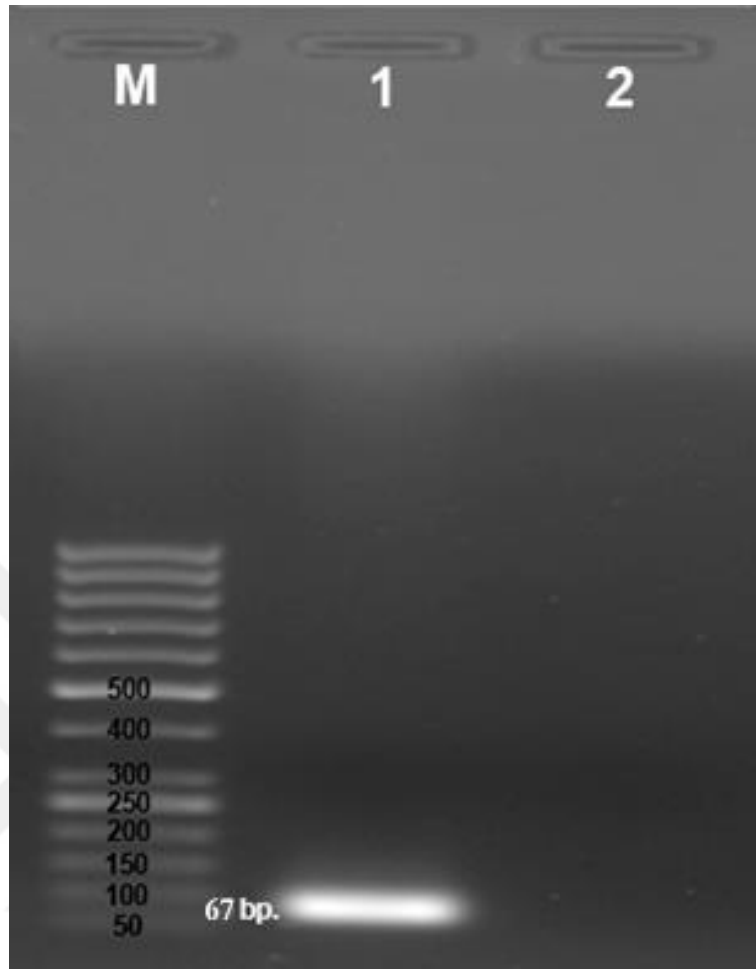
4.1. *Lucilia sericata* Larvasından Total Genomik DNA İzolasyonu

Real-Time PCR standartlarının oluşturulması için, *L. sericata* larvasından total genomik DNA izolasyonu, QIAmp tissue kit (QIAGEN, ABD) protokolüne uygun olarak yapıldı. PCR için, total genomik DNA ve *L. sericata* chymotrypsin gen parçalarına ait primerler kullanıldı. PCR reaksiyonu sonrasında 77 bp *L. Sericata* chymotrypsin PCR ürünü, etidyum bromür ile boyanmış % 1,5'luk agaroz jelde, 50 bp marker (Promega, ABD) ile beraber yürütülerek Chemidoc Imaging System (BIO RAD, ABD) cihazıyla görüntülendi (Şekil 4.1).

L. sericata lucifensin gen parçası PCR'ı için ise *L. sericata* larva total genomik DNA'sı ve *L. sericata* lucifensin gen parçasına ait primerler kullanıldı. PCR reaksiyonu sonrasında 67 bp PCR ürünü, etidyum bromür ile boyanmış % 1,5'luk agaroz jelde, 50 bp marker (Promega, ABD) ile beraber yürütülerek Chemidoc Imaging System (BIO RAD, ABD) cihazıyla görüntülendi (Şekil 4.2).



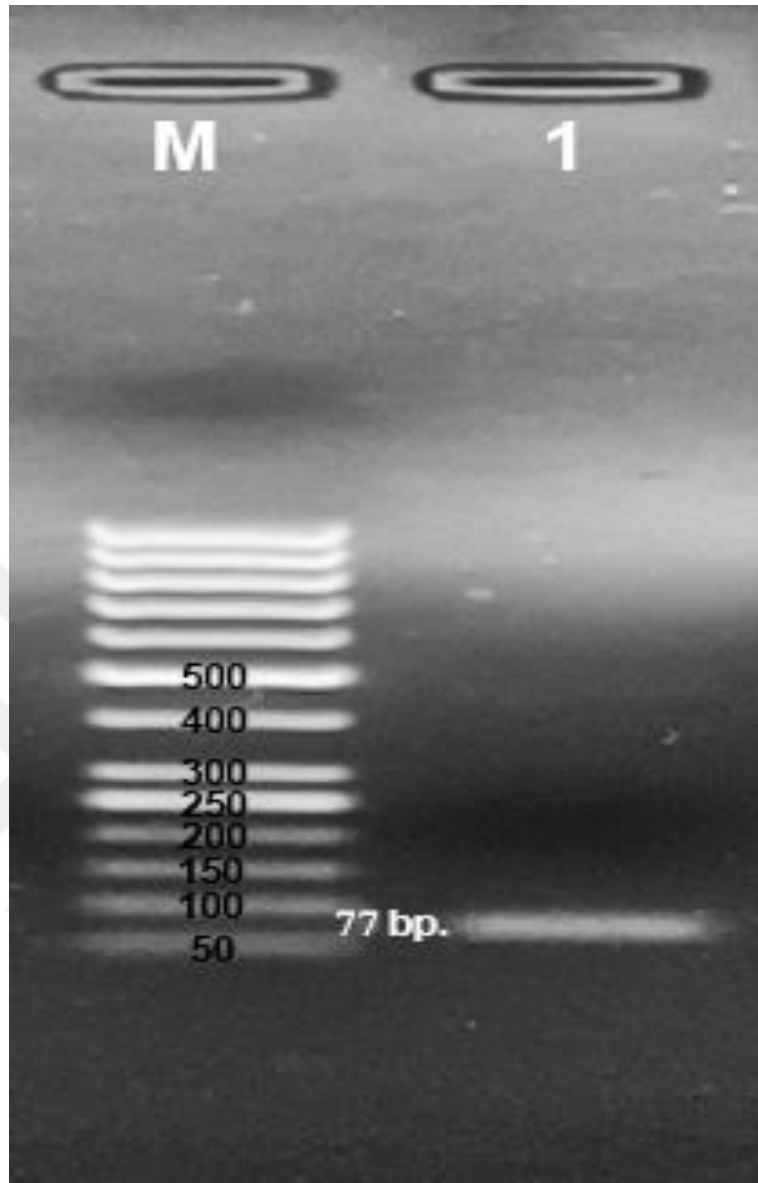
Şekil 4.1. *L. sericata* chymotrypsin PCR ürününün agaroz jelde elektroforezde görünümü M; 50 bp'lik marker (Promega, ABD), 1: 77 bp'lik *L. sericata* chymotrypsin PCR ürünü, 2: Negatif kontrol



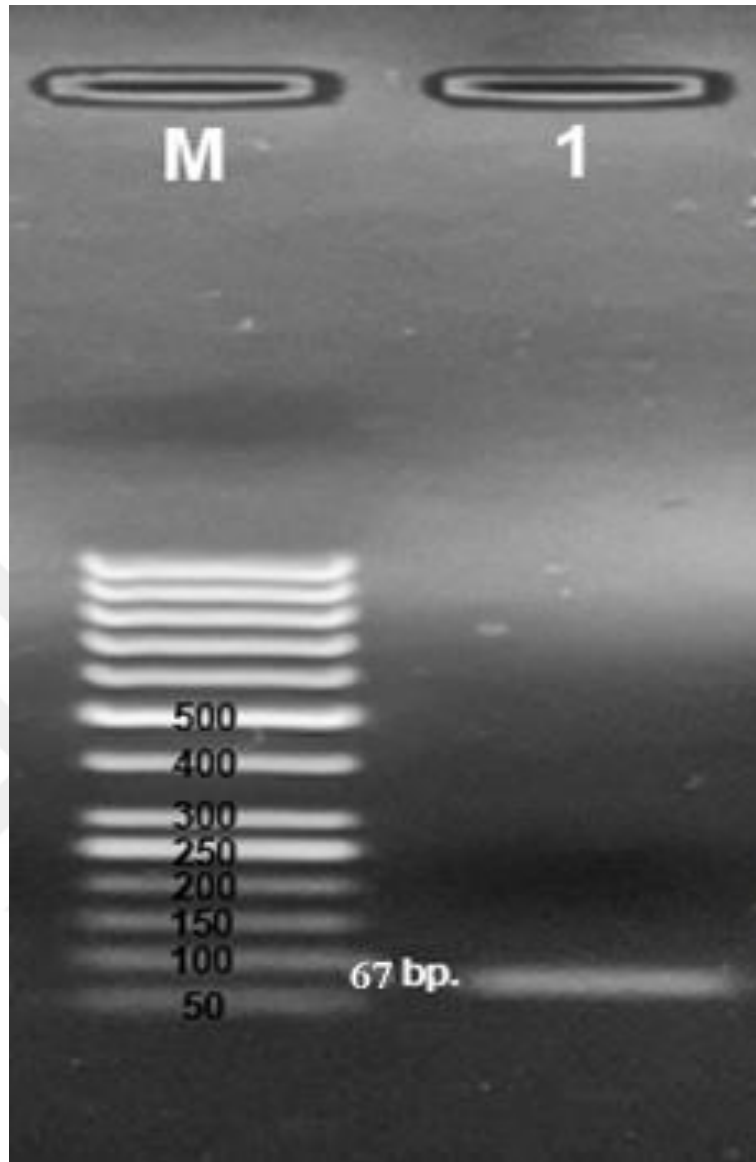
Şekil 4.2. *L. sericata* lucifensin PCR ürününün agaroz jelde elektroforezde görünümü. M: 50 bp'lik marker (Promega, ABD), 1: 67 bp'lik *L. sericata* lucifensin PCR ürünü, 2: Negatif kontrol

PCR ile elde edilen *L. sericata* lucifensin ve chymotrypsin ürünlerin agaroz jelden saflaştırılma işlemi, Wizard SV Gel and PCR Clean-up system kit (Promega, ABD) kullanılarak üretici firma önerisi modifiye edilerek yapıldı ve 67 bp'lik lucifensin PCR ürünü ve 77 bp'lik chymotrypsin PCR ürünü görüntülendi (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4).

Clean-up sonrası lucifensin ve chymotrypsin PCR ürünleri, NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü ve lucifensin 11,5 ng/ml, chymotrypsin ise 10,3 ng/ml konsantrasyonda olduğu saptandı.

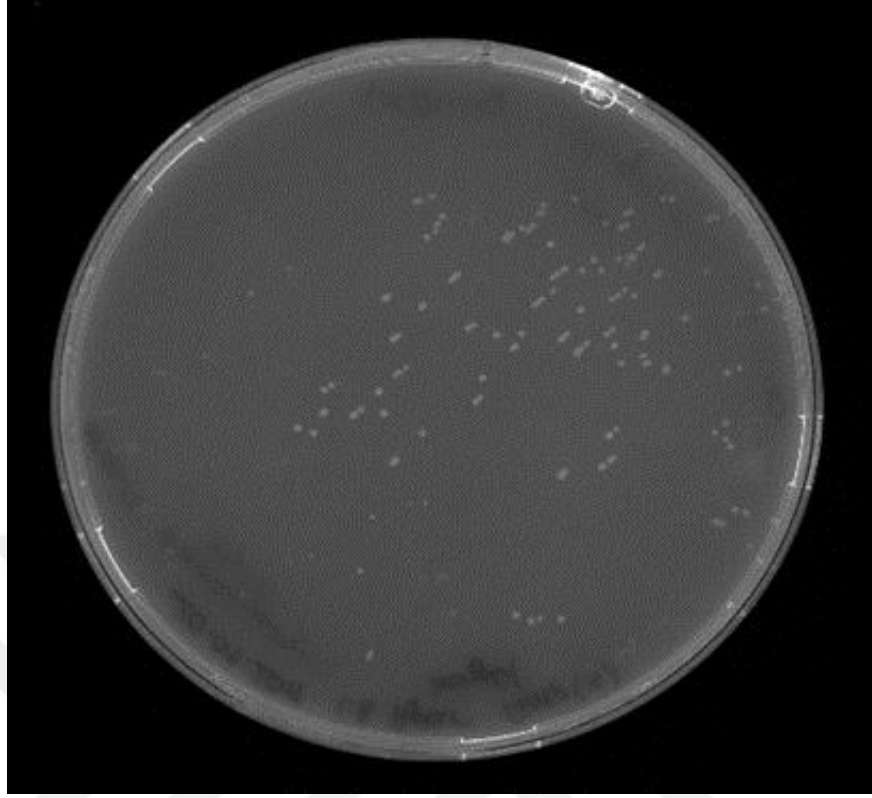


Şekil 4.3. *L. sericata* chymotrypsin saflaştırılma işlemi sonrası görüntüsü. M: 50 bp'lik marker (Promega, ABD), 1: Clean-up sonrası 77 bp'lik *L. sericata* chymotrypsin PCR ürünü

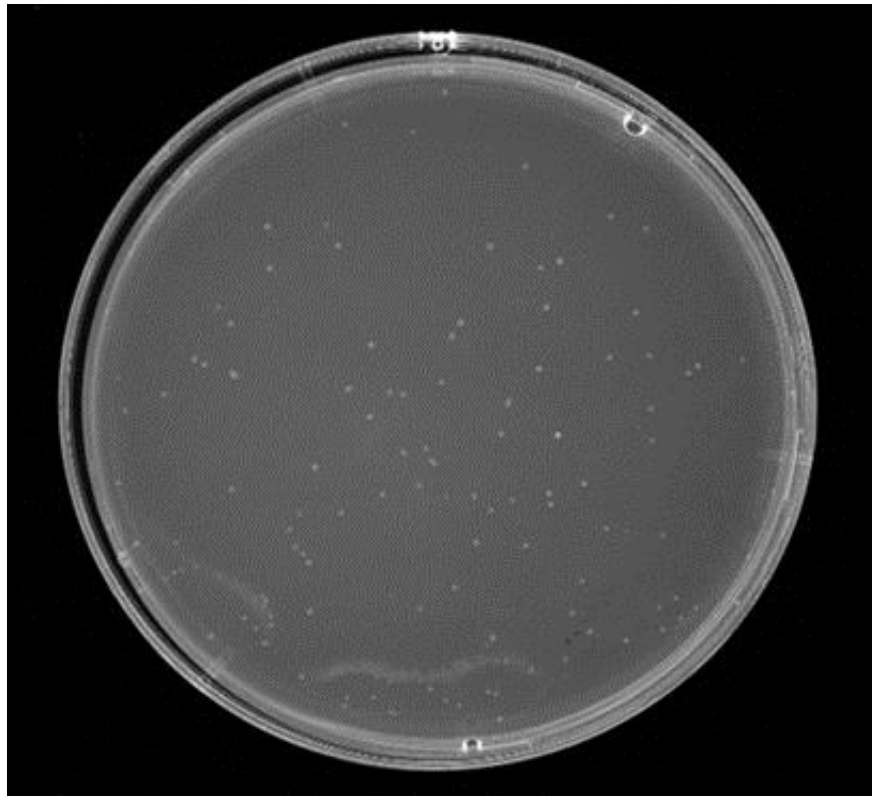


Şekil 4.4. *L. sericata* lucifensin saflaştırılma işlemi sonrası görüntüsü. M: 50 bp'lik marker (Promega, ABD)
1: Clean-up sonrası 67 bp'lik *L.sericata* lucifensin PCR ürünü

Saflaştırılmış *L. sericata* lucifensin ve cyhmotrypsin kısmi gen parçalarının klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak pJET 1.2/blunt klonlama vektörlerine yerleştirildi. Daha sonra ligasyon ürünleri ayrı ayrı OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, ABD) kompetan hücrelerine transforme edildi ve rekombinant plazmitleri içeren koloniler elde edildi (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.)

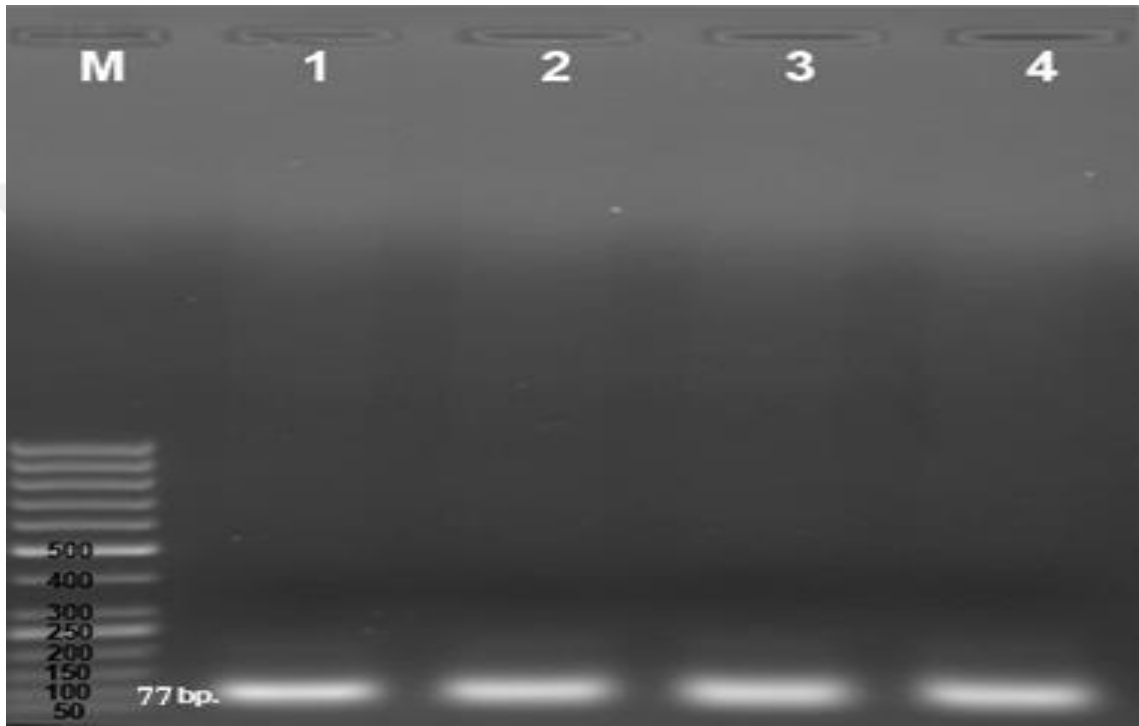


Şekil 4.5. Transformasyon sonrası oluşan koloniler (*L. sericata* chymotrypsin)

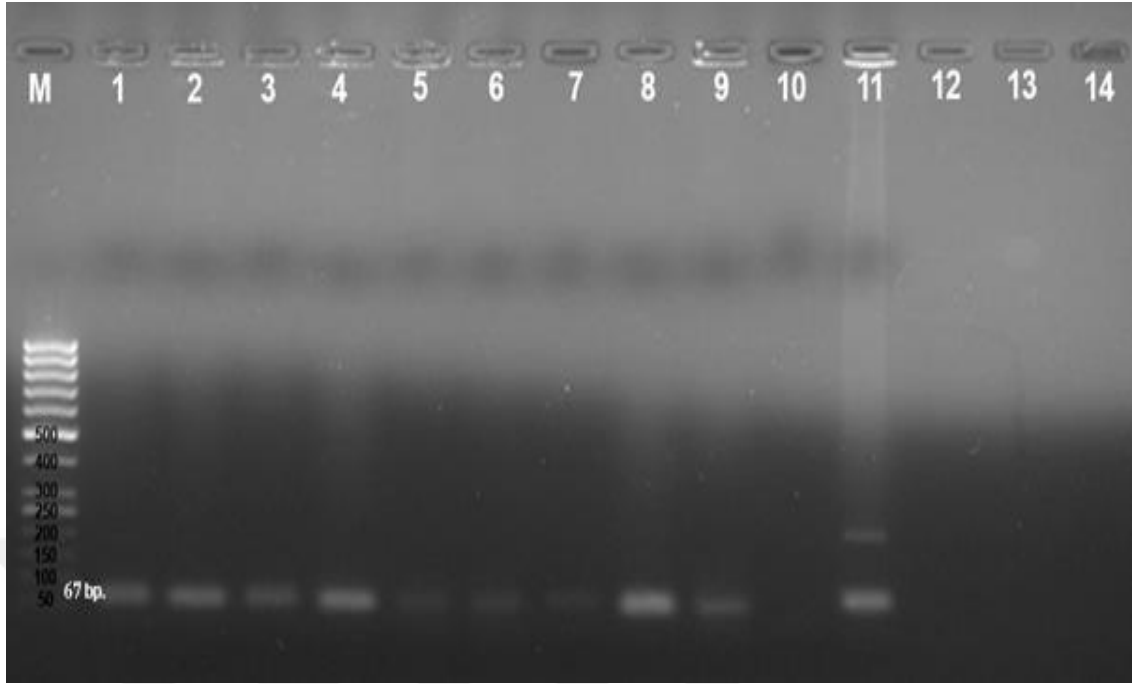


Şekil 4.6. Transformasyon sonrası oluşan koloniler (*L. sericata* lucifensin)

Transformasyon sonrasında gözlenen kolonilerin rekombinant plazmit içerip içermediklerini tespiti için PCR screening yapıldı. *L. sericata* lucifensin kısmi gen parçasını içerdiği düşünülen 42 koloni; chymotrypsin için oluşan 28 koloni katı besi yerinden seçilerek PCR screening yapıldı. *L. sericata* chymotrypsin için 3 pozitif koloni pozitif kontrol eşliğinde şekil 4.7’de görüntülendi. *L. sericata* lucifensin için ise 8 pozitif örnek pozitif kontrol eşliğinde şekil 4.8’de görüntülendi.

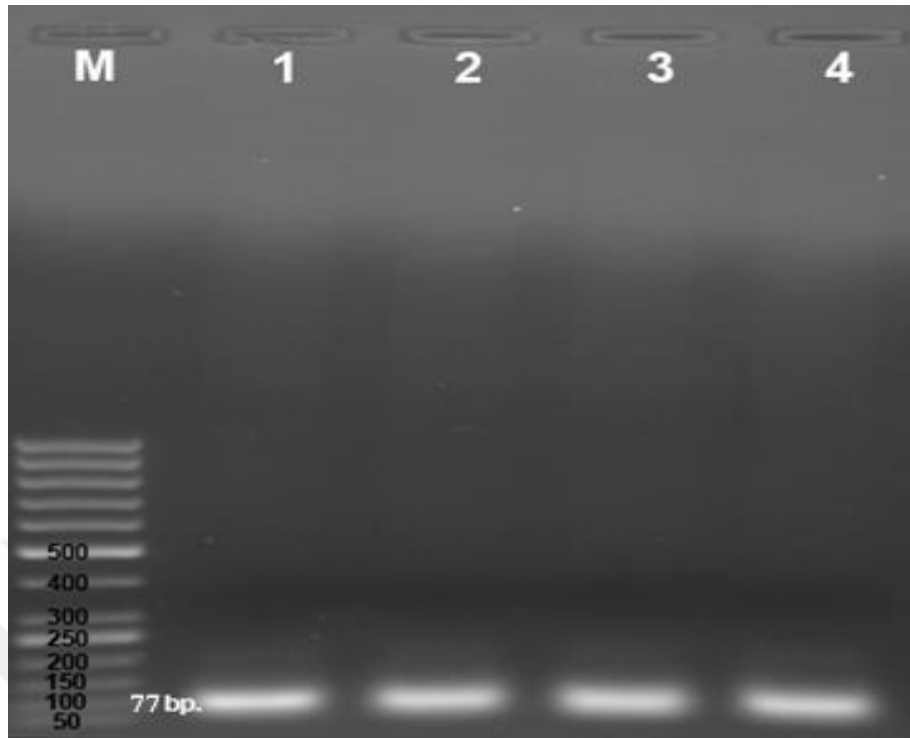


Şekil 4.7. *L. sericata* chymotrypsin için kolonilerdeki rekombinant plazmit varlığının PCR screening ile doğrulanması, M: 50 bp’lik marker (Promega, ABD), 1: *L. sericata* chymotrypsin pozitif kontrol, 2-4: *L. sericata* chymotrypsin kısmi gen parçası

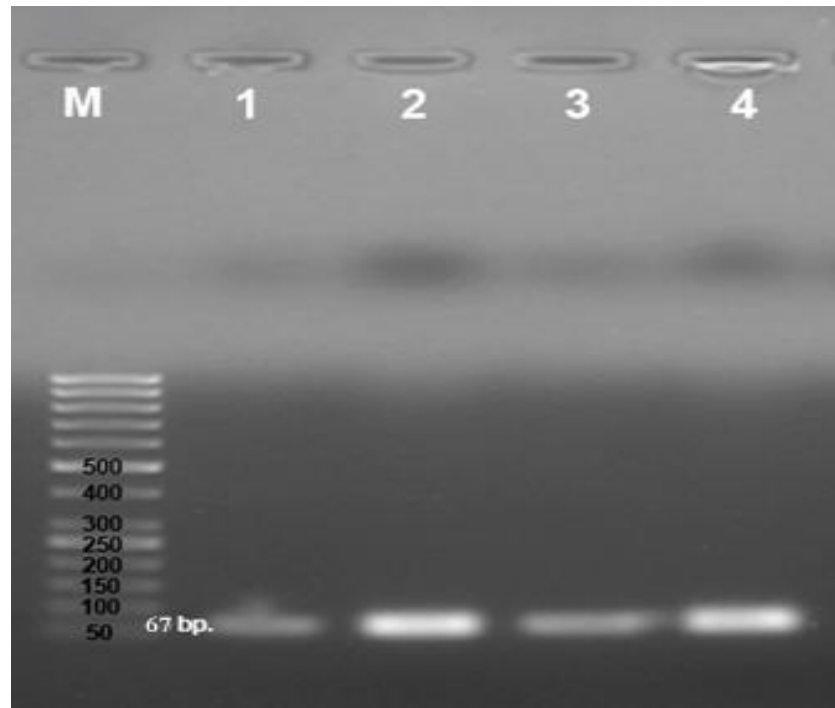


Şekil 4.8. *L. sericata* lucifensin için kolonilerdeki rekombinant plazmit varlığının PCR screening ile doğrulanması, M: 50 bp'lik marker (Promega, ABD), 1: *L. sericata* lucifensin pozitif kontrol, 2-11: Pozitif örnekler, 12-13: negatif örnekler, 14: *L. sericata* lucifensin negatif kontrol

L. sericata lucifensin ve chymotrypsin için ayrı ayrı rekombinant plazmit varlığı tespit edilen üç koloniden miniprep ile rekombinant plazmitler saflaştırılarak rekombinant plazmitin lucifensin ve chymotrypsin gen parçalarını içerdikleri PCR ile gösterildi. (Şekil 4.9. ve Şekil 4.10)



Şekil 4.9. *L. sericata* chymotrypsin miniprep sonrası görüntüsü, M: 50 bp'lik marker (Promega, ABD), 1: 77 bp'lik *L. sericata* chymotrypsin pozitif kontrolü, 2-4: Miniprep sonrası 77 bp'lik *L. sericata* chymotrypsin



Şekil 4.10. *L. sericata* lucifensin miniprep sonrası görüntüsü, M: 50 bp'lik marker (Promega, ABD), 1: 67 bp'lik *L. sericata* lucifensin pozitif kontrolü, 2-4: Miniprep sonrası 67 bp'lik *L. sericata* lucifensin

4.2. Lucifensin gen ekspresyonu için Real-Time PCR standardizasyonu

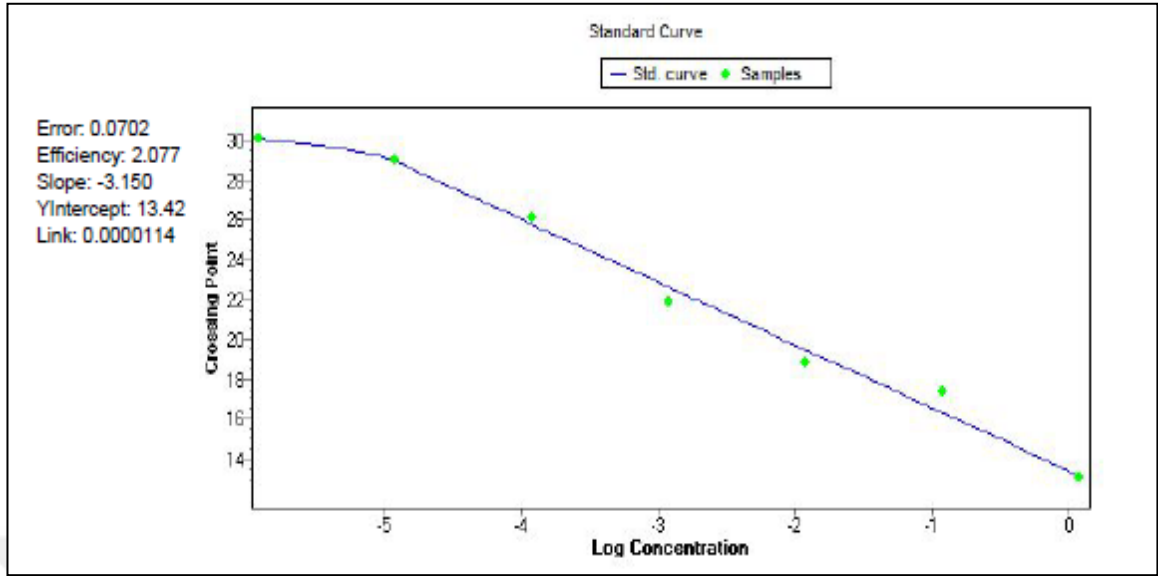
Real-Time PCR çalışmalarında standart olarak kullanılan *L. sericata* rekombinant lucifensin ve chymotrypsin plazmitlerinin seri dilüsyonları, Ct değerleri ve DNA kopya sayıları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Real-Time PCR analizlerde kullanılan dilüsyonlar, Ct değerleri ve DNA düzeyleri

Dilüsyon Oranı	Lucifensin		Chymotripsin	
	Ct değeri	Konsantrasyon-DNA (Kopya sayısı/ml)	Ct değeri	Konsantrasyon DNA (Kopya sayısı/ml)
1 (1/10)	13.08	$1.29 \times 10^0 - 7.1 \times 10^9$	9.52	$4.96 \times 10^0 - 2.8 \times 10^9$
2 (1/100)	17.43	$5.36 \times 10^{-1} - 7.1 \times 10^8$	12.79	$5.12 \times 10^{-1} - 2.8 \times 10^8$
3 (1/1 000)	18.81	$1.94 \times 10^{-2} - 7.1 \times 10^7$	16.19	$4.83 \times 10^{-2} - 2.8 \times 10^7$
4 (1/10 000)	21.85	$2.12 \times 10^{-3} - 7.1 \times 10^6$	19.49	$4.91 \times 10^{-3} - 2.8 \times 10^6$
5 (1/100 000)	26.13	$9.23 \times 10^{-4} - 7.1 \times 10^5$	22.04	$2.59 \times 10^{-4} - 2.8 \times 10^5$
6 (1/1 000 000)	28.99	$1.14 \times 10^{-5} - 7.1 \times 10^4$	22.88	$5.88 \times 10^{-5} - 2.8 \times 10^4$
7 (1/10 000 000)	30.09	$1.20 \times 10^{-6} - 7.1 \times 10^3$	24.19	$3.59 \times 10^{-6} - 2.8 \times 10^3$

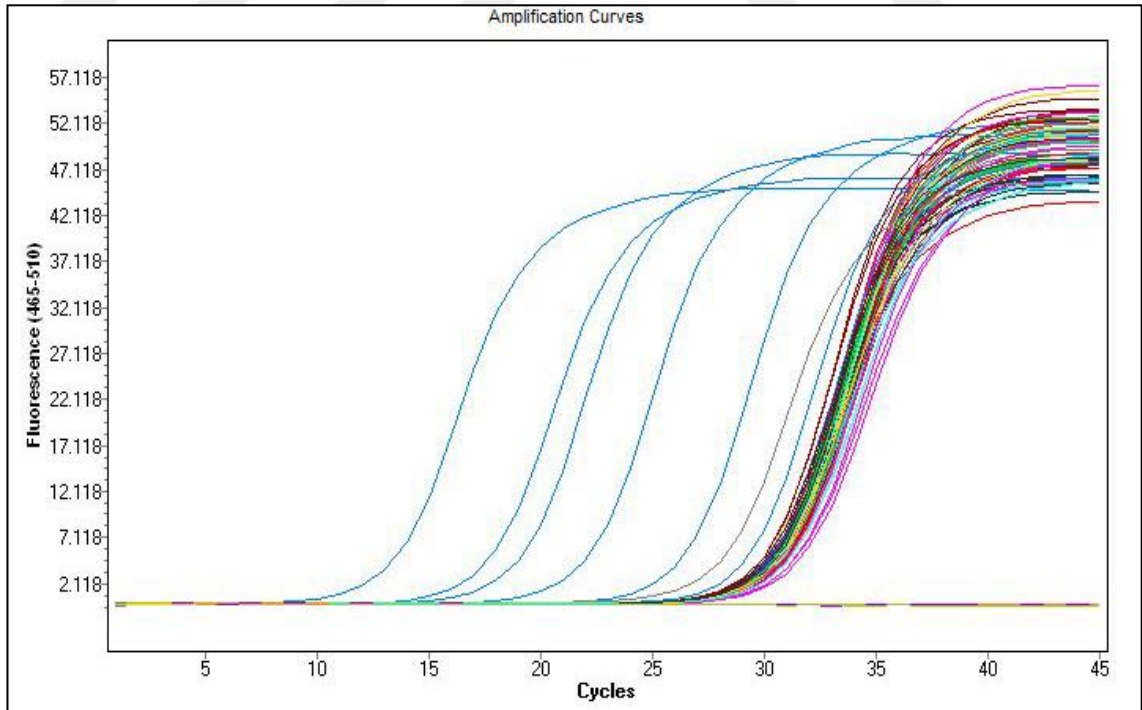
Seri dilüsyon standartları kullanılarak yapılan Real-Time PCR çalışmalarında optimum bağlanma ısısı tespiti için 55°C ile 65°C arasında gradient uygulandı ve optimize bağlanma ısısı, lucifensin ve chymotrypsin için de 60°C olarak tespit edildi. Lucifensin gen ekspresyon çalışmalarında her bir Real-Time PCR reaksiyonu için kullanılan cDNA template miktarı 0.3 µg olarak saptandı. Ayrıca her bir reaksiyon tüpüne eklenen primerlerin final konsantrasyonu 0,4 µM olarak hesaplandı.

Real-Time PCR çalışmasında, seri dilüsyon çift çalışıldı ve bir standart eğri (curve) elde edildi. Standart eğrinin slope değeri -3.150 olarak hesaplandı (Şekil 4.11). Bu slope değeriyle Real-Time PCR’in amplifikasyon etkinliği (effiecient); $10^{(-1/slope)} - 1$ formülünden % 107 olarak hesaplandı. Y intercept değeri ise 13,42 idi. Real-Time PCR’in amplifikasyon etkinliği (effiecient); lucifensin için % 107, chymotrypsin için ise % 100 olarak hesaplanmıştır. Real-Time PCR çalışmalarında % 90-110 arasındaki değerler kabul edilebilir değerler olarak kullanılmaktadır. Bu değerler ile Real-Time PCR çalışma sonuçlarının güvenilirliğini göstermektedir.



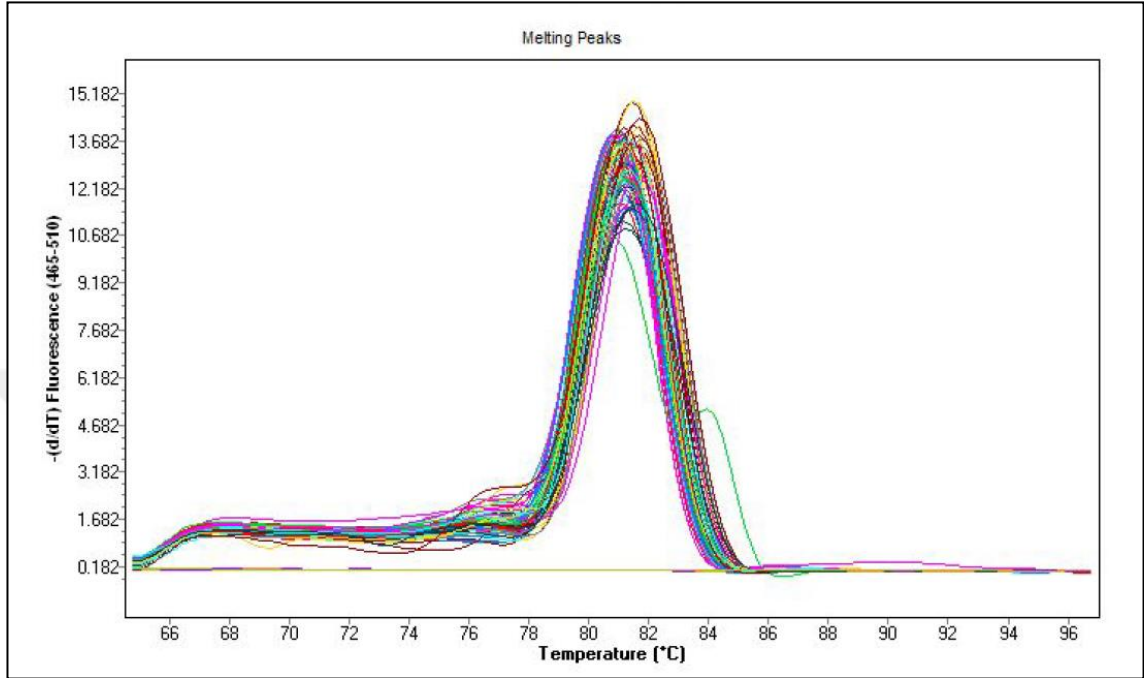
Şekil 4.11. *L. sericata* lucifensin Real-Time PCR için standart eğri

Her bir seri dilüsyon arasındaki siklus aralığının (interval) 1,10 ile 4,28 arasında değiştiği saptandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *L. sericata* lucifensin seri dilüsyonları ile Real-Time PCR

Real-Time PCR ürünlerinin erime eğrisi (Melting curve) analizinde ise non spesifik bantlar ve primer-dimer oluşumu görülmedi, 81,6°C'de tek keskin bir pik elde edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Real-Time PCR ürünlerinin Melting curve analizinde ise non spesifik bantlar

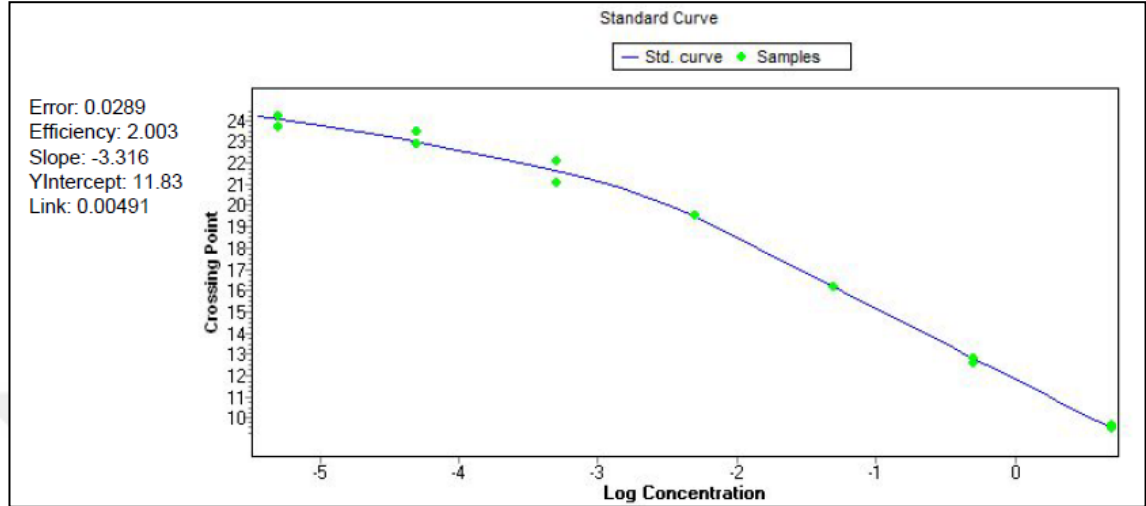
Birbirinden bağımsız üç deneyde de 60°C bağlanma ısında % 90-110 arasında amplifikasyon etkinliğindeki standartlar kullanılarak Real-Time PCR çalışmalarında beyin, karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, kanlı agar ve 4 farklı bakteri türü eklenmiş ortamlardan elde edilen yumurta, larva, pupa ve erişkinlerin farklı zaman aralıklarında elde edilen örneklerindeki lucifensin ekspresyonları çalışıldı (Şekil 4.12).

4.3. Chymotrypsin Gen Ekspresyonu için Real-Time PCR standardizasyonu

Chymotrypsin gen ekspresyon çalışmalarında her bir Real-Time PCR reaksiyonu için kullanılan cDNA template miktarı 0,3 µg olarak saptandı. Ayrıca her bir reaksiyon tüpüne eklenen primerlerin final konsantrasyonu 0,4 µM olarak hesaplandı.

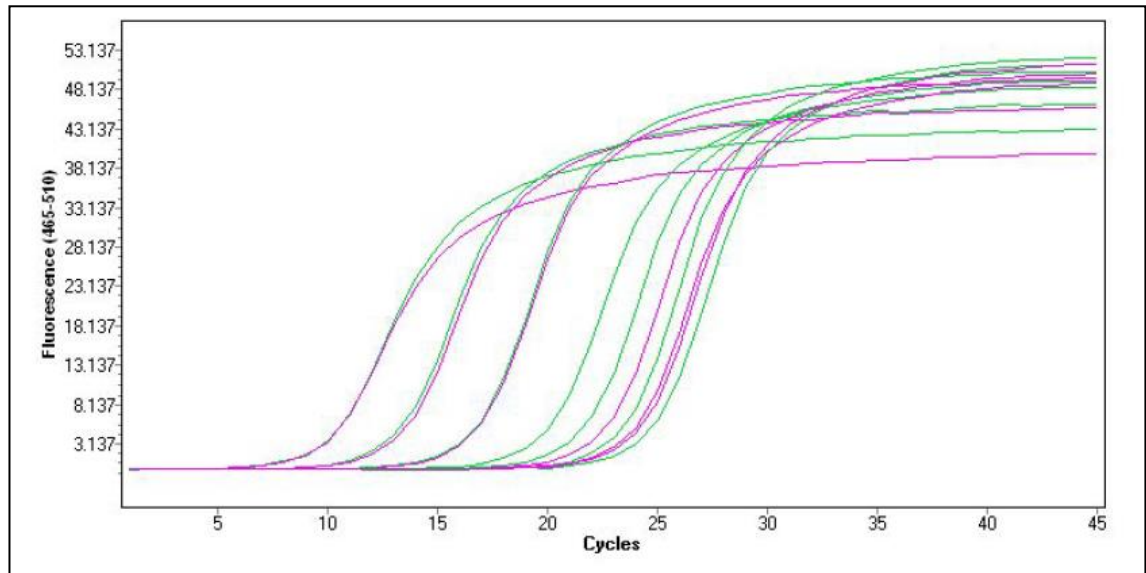
Chymotrypsin için Real-Time PCR çalışmasında da, seri dilüsyon çift çalışıldı ve bir standart eğri (curve) elde edildi. Standart eğrinin slope değeri -3,316 olarak hesaplandı. (Şekil 4.14). Bu slope değeriyle Real-Time PCR'ın amplifikasyon etkinliği (effiecient); % 100 olarak hesaplandı. Y intercept değeri ise 11,83 idi. Real-Time PCR ürünlerinin

Melting curve analizinde ise non spesifik bantlar ve primer-dimer oluşumu görülmedi, 76⁰C’de tek keskin bir pik elde edildi.



Şekil 4.14. *L. sericata* chymotrypsin Real-Time PCR için standart curve.

Her bir seri dilüsyon arasındaki siklus aralığının (interval) 0,84 ile 3,27 arasında değiştiği saptandı (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *L. sericata* chymotrypsin seri dilüsyonları ile Real-Time PCR

Lucifensin gen ekspresyon çalışmalarında olduğu gibi chymotrypsin için standardize edilmiş Real-Time PCR şartları kullanılarak beyin dokusu, karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, kanlı agar ve 4 farklı bakteri türü eklenmiş ortamlardan elde edilen yumurta,

larva, pupa ve erişkinlerin farklı zaman aralıklarında elde edilen örneklerindeki lucifensin chymotrypsin çalışıldı.

4.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları

4.4.1. Lucifensin Gen Ekspresyonlarının Analiz Sonuçları

Karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, beyin dokusu, kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agarda ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar olmak üzere 8 farklı ortamda canlılığı devam ettirilen *L. sericata*'nın yumurta, larva, pupa ve erişkin dönemlerinde üç farklı zaman aralığından alınan örneklerdeki lucifensin gen ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sekiz farklı ortamda devamlılığı sağlanan *L. sericata*'ların yumurtalarından eksprese edilen lucifensin seviyelerinin istatistiksel analizi Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de sunulmuştur.

En fazla lucifensin ekspresyonu sığır eti dokusunda bulunan yumurtalarda oluşmuştur. En az lucifensin ekspresyonu ise karaciğer dokusunda devamlılığı sağlanan yumurtalardan elde edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Çeşitli ortamlarda üretilen yumurtalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri

Grup	Medyan	25%	75%
Karaciğer	29,44	28,695	29,775
Sığır Eti	30,405	30,11	30,57
Beyin	30,265	30,135	30,615
Kanlı Agar	30,05	29,8	30,185
<i>E. coli</i>	30,27	30,205	30,415
<i>P. aeruginosa</i>	30,225	30,065	30,39
<i>E. faecalis</i>	29,86	29,73	29,945
<i>S. aureus</i>	30,19	30,095	30,7

Beyin dokusundan elde edilen yumurtalardaki lucifensin gen ekspresyon seviyesi karaciğer dokusu, kanlı agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda bulunan yumurtalardaki gen ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur.

Sığır eti dokusunda yetiştirilen yumurtalar ile karaciğer dokusu, kanlı agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda bulunan yumurtalara göre daha fazla lucifensin eksprese edilmiştir.

Kanlı agarda yetiştirilen yumurtalar ile karaciğer dokusu, *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda bulunan yumurtalara göre daha fazla lucifensin eksprese edilmiştir.

E. facealis eklenmiş kanlı agarda üretilen yumurtalar ile karaciğer dokusunda bulunan yumurtalara göre daha fazla lucifensin eksprese edilmiştir.

E. coli eklenmiş tryptone soya agarda üretilen yumurtalar ile karaciğer dokusu, kanlı agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda bulunan yumurtalara göre daha fazla lucifensin eksprese edilmiştir.

P. aeruginosa eklenmiş tryptone soya agarda üretilen yumurtalar ile karaciğer dokusu, kanlı agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda bulunan yumurtalara göre daha fazla lucifensin eksprese edilmiştir.

S. aureus eklenmiş tryptone soya agarda bulunan yumurtalar ile karaciğer dokusu, kanlı agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda bulunan yumurtalara göre daha fazla lucifensin eksprese edilmiştir (4.3).

Tablo 4.3. Çeşitli ortamlarda üretilen yumurtalardan eksprese edilen lucifensin seviyelerinin karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diffof Ranks	q q	P<0,05
Beyin ve Karaciğer	603,000	6,249	Evet
Beyin ve <i>E. fecalis</i>	481,500	5,698	Evet
Beyin ve Kanlı Agar	356,500	4,917	Evet
Beyin ve <i>S. aureus</i>	107,500	1,777	Hayır
Beyin ve <i>P. aureginosa</i>	101,500	2,093	Hayır
Beyin ve <i>E.coli</i>	53,500	1,466	Hayır
Beyin ve Sığır Eti	24,500	1,000	Hayır
Sığır Eti ve Karaciğer	578,500	6,846	Evet
Sığır Eti ve <i>E. fecalis</i>	457,000	6,304	Evet
Sığır Eti ve Kanlı Agar	332,000	5,488	Evet
Sığır Eti ve <i>S.aureus</i>	83,000	1,711	Hayır
Sığır Eti ve <i>P.aureginosa</i>	77,000	2,110	Hayır
Sığır Eti ve <i>E.coli</i>	29,000	1,184	Hayır
<i>E. coli</i> ve Karaciğer	549,500	7,579	Evet
<i>E. coli</i> ve <i>E. fecalis</i>	428,000	7,075	Evet
<i>E. coli</i> ve Kanlı Agar	303,000	6,248	Evet
<i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i>	54,000	1,480	Hayır
<i>E. coli</i> ve <i>P. aureginosa</i>	48,000	1,960	Hayır
<i>P. aureginosa</i> ve Karaciğer	501,500	8,290	Evet
<i>P. aureginosa</i> ve <i>E. fecalis</i>	380,000	7,835	Evet
<i>P. aureginosa</i> ve Kanlı Agar	2 55,000	6,987	Evet
<i>P. aureginosa</i> ve <i>S. aureus</i>	6,000	0,245	Hayır
<i>S. aureus</i> ve Karaciğer	495,500	10,217	Evet
<i>S. aureus</i> ve <i>E. fecalis</i>	374,000	10,248	Evet
<i>S. aureus</i> ve Kanlı Agar	249,000	10,165	Evet
Kanlı Agar ve Karaciğer	246,500	6,754	Evet
Kanlı Agar ve <i>E. fecalis</i>	125,000	5,103	Evet
<i>E. fecalis</i> ve Karaciğer	121,500	4,960	Evet

Sekiz farklı ortamda devamlılığı sağlanan *L. sericata* larvalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri istatistiksel analizi Tablo 4.4'te sunulmuştur. Buna göre larval dönemde en fazla lucifensin gen ekspresyonu sığır eti ile beslenen grupta tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. Çeşitli ortamlarda üretilen larvalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri

Grup	Medyan	25%	75%
Karaciğer	30,302	0,295	0,0851
Sığır Eti	30,707	0,272	0,0786
Beyin	30,452	0,438	0,126
Kanlı Agar	30,173	0,221	0,0639
<i>E. coli</i>	30,372	0,456	0,228
<i>S. aureus</i>	30,458	0,229	0,115
<i>P. aeruginosa</i>	29,965	0,54	0,27
<i>E. fecalis</i>	29,913	0,189	0,0947

Sekiz farklı ortamda devamlılığı sağlanan larvaların lucifensin gen ekspresyonları birbirleriyle karşılaştırıldığında (Tablo 4.5);

Sığır eti dokusunda yetiştirilen larvalar ile karaciğer dokusunda, kanlı agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan larvalara göre daha fazla lucifensin eksprese ettiği saptanmıştır.

S. aureus eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen larvalar ile *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan larvalara göre daha fazla lucifensin eksprese ettiği, saptanmıştır.

Beyin dokusunda yetiştirilen larvaların ise *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan larvalara göre daha fazla lucifensin eksprese ettiği saptanmıştır.

Tablo 4.5. Çeşitli ortamlarda üretilen larvalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Ranks	q	P<0,05	
Sığır eti ve <i>E. fecalis</i>	0,794	0,384	<0,001	Evet
Sığır eti ve <i>P. aeruginosa</i>	0,742	0,384	<0,001	Evet
Sığır eti ve Kanlı Agar	0,533	0,272	<0,001	Evet
Sığır eti ve Karaciğer	0,405	0,272	0,004	Evet
Sığır eti ve <i>E. coli</i>	0,334	0,384	0,087	Hayır
Sığır eti ve Beyin	0,255	0,272	0,065	Hayır
Sığır eti ve <i>S.aureus</i>	0,249	0,384	0,199	Hayır
<i>S. aureus</i> ve <i>E. fecalis</i>	0,545	0,471	0,024	Evet
<i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i>	0,493	0,471	0,041	Evet
<i>S. aureus</i> ve Kanlı Agar	0,284	0,384	0,144	Hayır
<i>S. aureus</i> ve Karaciğer	0,156	0,384	0,42	Hayır
<i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i>	0,085	0,471	0,719	Hayır
<i>S. aureus</i> ve Beyin	0,00583	0,384	0,976	Hayır
Beyin ve <i>E. fecalis</i>	0,539	0,384	0,007	Evet
Beyin ve <i>P. aeruginosa</i>	0,487	0,384	0,014	Evet
Beyin ve Kanlı Agar	0,278	0,272	0,045	Hayır
Beyin ve Karaciğer	0,15	0,272	0,273	Hayır
Beyin ve <i>E. coli</i>	0,0792	0,384	0,681	Hayır
<i>E. coli</i> ve <i>E. fecalis</i>	0,46	0,471	0,055	Hayır
<i>E. coli</i> ve <i>P. aureginosa</i>	0,407	0,471	0,088	Hayır
<i>E. coli</i> ve Kanlı Agar	0,199	0,384	0,304	Hayır
<i>E. coli</i> ve Karaciğer	0,0708	0,384	0,713	Hayır
Karaciğer ve <i>E. fecalis</i>	0,389	0,384	0,047	Hayır
Karaciğer ve <i>P. aureginosa</i>	0,337	0,384	0,085	Hayır
Karaciğer ve Kanlı Agar	0,128	0,272	0,348	Hayır
Kanlı Agar ve <i>E. fecalis</i>	0,261	0,384	0,179	Hayır
Kanlı Agar ve <i>P. aureginosa</i>	0,208	0,384	0,282	Hayır
<i>P. aureginosa</i> ve <i>E. fecalis</i>	0,0525	0,471	0,824	Hayır

P. aeruginosa eklenmiş tryptone soya agarda, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agarda, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agarda ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen larvaların canlılığı devam etmemiş ve pupa dönemine geçmeden ölmüştür. Dört farklı ortamda canlı kalan pupalarla lucifensin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4.6-4.7).

Dört farklı ortamda üretilen pupalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri istatistiksel analizi ise Tablo 4.6'da sunulmuştur.

Tablo 4.6. Çeşitli ortamlarda üretilen pupalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri

Grup	Medyan	25%	75%
Karaciğer	30,207	0,866	0,25
Sığır eti	30,989	1,179	0,34
Beyin	30,503	0,428	0,124
Kanlı Agar	30,021	0,363	0,105

Sığır eti dokusunda yetiştirilen pupaların, kanlı agar ve karaciğer dokusu ortamlarında bulunan pupalara göre daha fazla lucifensin eksprese ettiği tespit edilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Çeşitli ortamlarda üretilen pupalardan eksprese edilen lucifensin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Ranks	q	P<0,05	
Sığır eti ve Kanlı Agar	0,968	0,645	0,004	Evet
Sığır eti ve Karaciğer	0,782	0,645	0,019	Evet
Sığır eti ve Beyin	0,486	0,645	0,136	Hayır
Beyin ve Kanlı Agar	0,483	0,645	0,139	Hayır
Beyin ve Karaciğer	0,297	0,645	0,359	Hayır
Karaciğer ve Kanlı Agar	0,186	0,645	0,564	Hayır

Karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, beyin dokusu ve kanlı agarda üretilen erişkinlerden eksprese edilen lucifensin seviyeleri istatistiksel analizi Tablo 4.8'de sunulmuştur. Aynı

ortamda (27-30°C ve % 50 nem) Karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, beyin dokusu ve kanlı agar da yetiştirilen erişkinlerden eksprese edilen lucifensin seviyeleri karşılaştırıldığımızda anlamlı farklılıklar meydana gelmediği tespit edilmiştir.

Tablo 4.8. Çeşitli ortamlarda üretilen erişkinlerden eksprese edilen lucifensin seviyeleri

Grup	Medyan	25%	75%
Karaciğer	30,102	1,464	0,423
Sığır eti	31,204	0,989	0,285
Beyin	30,412	0,385	0,111
Kanlı Agar	30,519	0,409	0,145

4.4.2. Chymotrypsin Gen Ekspresyonlarının Analiz Sonuçları

Karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, beyin dokusu, kanlı agar, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar olmak üzere 8 farklı ortamda canlılığı devam ettirilen *L. sericata*'nın yumurta, larva, pupa ve erişkin dönemlerinde üç farklı zaman aralığından alınan örneklerdeki chymotrypsin gen ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Karaciğer dokusunda canlılığı devam ettirilen *L. sericata* 'nın farklı hayat formlarındaki chymotrypsin ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi Tablo 4.9'da sunulmuştur.

Tablo 4.9. Karaciğer dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri

Grup	Ortalama	Standart Sapma	SEM
Yumurta	33,705	3,073	0,887
Larva	34,402	1,164	0,336
Pupa	35,352	0,897	0,259
Erişkin	29,88	1,959	0,565

Karaciğer doku ortamında yetişmiş pupaların chymotrypsin ekspresyon seviyeleri yumurta, erişkin dönemlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Karaciğer doku ortamlarında yetişmiş larvaların chymotrypsin ekspresyon seviyeleri erişkin dönemine göre daha fazladır. Karaciğer doku ortamlarında yetişmiş yumurtaların chymotrypsin ekspresyon seviyeleri erişkin dönemine göre daha fazla olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Karaciğer dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Means	LSD (alpha=0,050)	P	Diff >= LSD
Pupa ve Erişkin	5,463	1,617	<0,001	Evet
Pupa ve Yumurta	1,648	1,617	0,046	Evet
Pupa ve Larva	0,951	1,617	0,242	Hayır
Larva ve Erişkin	4,513	1,617	<0,001	Evet
Larva ve Yumurta	0,697	1,617	0,39	Hayır
Yumurta ve Erişkin	3,816	1,617	<0,001	Evet

Sığır eti doku ortamında canlılığı devam ettirilen *L. sericata*'nın yumurta, larva, pupa ve erişkin dönemlerindeki chymotrypsin ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi ise Tablo 4.11'de sunulmuştur.

Tablo 4.11. Sığır eti dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri

Grup	Ortalama	Standart Sapma	SEM
Yumurta	32,809	2,285	0,66
Larva	35,03	1,918	0,554
Pupa	35,425	2,727	0,822
Erişkin	36,378	4,376	1,384

Sığır eti doku ortamında yetiştirilmiş erişkinlerin chymotrypsin ekspresyon seviyelerinin yumurta dönemine göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Sığır eti doku ortamında yetişmiş pupaların chymotrypsin ekspresyon seviyeleri yumurta dönemine

göre, chymotrypsin eksprese seviyelerinin ise yumurta dönemine göre daha fazla olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Sığır eti dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Means	LSD(alpha=0,050)	P	Diff >= LSD
Erişkin ve Yumurta	3,569	2,507	0,006	Evet
Erişkin ve Larva	1,348	2,507	0,284	Hayır
Erişkin ve Pupa	0,953	2,558	0,456	Hayır
Pupa ve Yumurta	2,615	2,444	0,037	Evet
Pupa ve Larva	0,395	2,444	0,746	Hayır
Larva ve Yumurta	2,221	2,39	0,068	Hayır

Beyin dokusunda üretilen yumurta, larva, pupa ve erişkinlerden eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri Tablo 4.13'te sunulmuştur.

Tablo 4.13. Beyin dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri.

Grup	Ortalama	Standart Sapma	SEM
Yumurta	37,404	0,936	0,282
Larva	36,877	1,305	0,393
Pupa	36,784	1,538	0,464
Erişkin	29,728	0,794	0,229

Beyin doku ortamlarında yetiştirilmiş yumurtaların chymotrypsin ekspresyon seviyeleri erişkin dönemlerine göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Beyin doku ortamında larvaların chymotrypsin ekspresyon seviyelerinin erişkin dönemlerine göre daha fazla olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır. Beyin doku ortamında pupaların chymotrypsin ekspresyon seviyelerinin erişkin dönemlerine göre daha fazla olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. Beyin dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Means	LSD (alpha=0,050)	P	Diff >= LSD
Yumurta ve Erişkin	7,675	0,989	<0,001	Evet
Yumurta ve Pupa	0,62	1,01	0,222	Hayır
Yumurta ve Larva	0,526	1,01	0,299	Hayır
Larva ve Erişkin	7,149	0,989	<0,001	Evet
Larva ve pupa	0,0936	1,01	0,852	Hayır
Pupa ve Erişkin	7,055	0,989	<0,001	Evet

Kanlı agar ortamında canlılığı devam ettirilen *L. sericata*'nın farklı hayat formlarındaki (yumurta, larva, pupa ve erişkin) chymotrypsin ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi Tablo 4.15'te sunulmuştur.

Tablo 4.15. Kanlı agarda üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri

Grup	Ortalama	Standart Sapma	SEM
Yumurta	36,03	1,698	0,49
Larva	37,179	1,721	0,497
Pupa	37,215	1,304	0,393
Erişkin	32,649	1,523	0,539

Kanlı agarda yetişmiş yumurta, larva, pupaların chymotrypsin ekspresyon seviyeleri erişkin dönemlerine göre daha fazla olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Kanlı agarda dokusundan üretilen farklı hayat formlarındaki eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Means	LSD (alpha=0,050)	P	Diff >= LSD
Pupa ve Erişkin	4,566	1,486	<0,001	Evet
Pupa ve Yumurta	1,185	1,335	0,081	Hayır
Pupa ve Larva	0,0354	1,335	0,958	Hayır
Larva ve Erişkin	4,53	1,46	<0,001	Evet
Larva ve Yumurta	1,149	1,306	0,083	Hayır
Yumurta ve Erişkin	3,381	1,46	<0,001	Evet

Sekiz farklı ortamda canlılığı devam ettirilen yumurtalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri istatistiksel analizi Tablo 4.17’de sunulmuştur.

Tablo 4.17. Çeşitli ortamlarda üretilen yumurtalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Grup	Medyan	25%	75%
Karaciğer	34,815	34,13	35,34
Sığır eti	32,16	31,635	34,23
Beyin	37,235	36,8	37,695
Kanlı Agar	35,765	35,21	36,735
<i>E. coli</i>	37,065	36,48	38,59
<i>S. aureus</i>	34,895	34,43	35,435
<i>P. aureginosa</i>	36,24	34,57	40
<i>E. fecalis</i>	35,995	35,14	38,585

E. coli eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen yumurtalar ile karaciğer dokusu, kanlı agar, sığır eti dokusu, *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan yumurtalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği tespit edilmiştir. *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda yetiştirilen yumurtalar ile karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan yumurtalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği saptanmıştır. Kanlı agarda yetiştirilen yumurtalar ile karaciğer dokusu,

sığır eti dokusubulunan yumurtalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edilmiştir. Beyin dokusunda yetiştirilen yumurtalar ile karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, kanlı agar, *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan yumurtalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edilmiştir. *P. aureginosa* eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen yumurtalar ile karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan yumurtalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edilmiştir (Tablo 4.18).

Tablo 4.18. Çeşitli ortamlarda üretilen yumurtalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Ranks	q q	P<0,05
Beyin ve Sığır eti	659,5	6,834	Evet
Beyin ve Karaciğer	505,5	5,982	Evet
Beyin ve <i>S. aureus</i>	421	5,807	Evet
Beyin ve Kanlı Agar	256	4,232	Evet
Beyin ve <i>P. aureginosa</i>	167,5	3,454	Hayır
Beyin ve <i>E. fecalis</i>	157	4,302	Hayır
Beyin ve <i>E. coli</i>	13,5	0,551	Hayır
<i>E. coli</i> ve Sığır eti	646	7,645	Evet
<i>E. coli</i> ve Karaciğer	492	6,786	Evet
<i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i>	407,5	6,736	Evet
<i>E.coli</i> ve Kanlı Agar	242,5	5	Evet
<i>E. coli</i> ve <i>P. aureginosa</i>	154	4,22	Hayır
<i>E. fecalis</i> ve <i>E. fecalis</i>	143,5	5,858	Hayır
<i>E. fecalis</i> ve Sığır eti	502,5	6,931	Evet
<i>E. fecalis</i> ve Karaciğer	348,5	5,761	Evet
<i>E. fecalis</i> ve <i>S. aureus</i>	264	5,444	Evet
<i>E. fecalis</i> ve Kanlı Agar	99	2,713	Hayır
<i>E. fecalis</i> ve <i>P. aureginosa</i>	10,5	0,429	Hayır
<i>P.aureginosa</i> ve Sığır eti	492	8,133	Evet
<i>P.aureginosa</i> ve Karaciğer	338	6,969	Evet
<i>P.aureginosa</i> ve <i>S.aureus</i>	253,5	6,946	Evet
<i>P. aureginosa</i> ve Kanlı Agar	88,5	3,613	Hayır
Kanlı Agar ve Sığır eti	403,5	8,32	Evet
Kanlı Agar ve Karaciğer	249,5	6,836	Evet
Kanlı Agar ve <i>S.aureus</i>	165	6,736	Evet
<i>S. aureus</i> ve Sığır eti	238,5	6,535	Evet
<i>S. aureus</i> ve Karaciğer	84,5	3,45	Evet
Karaciğer ve Sığır eti	154	6,287	Evet

Çeşitli ortamlarda üretilen larvalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri istatistiksel analizi Tablo 4.19’da sunulmuştur.

Tablo 4.19. Çeşitli ortamlarda üretilen larvalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Grup	Ortalama	Standart Sapma	SEM
Karaciğer	34,402	1,164	0,336
Sığır eti	35,03	1,918	0,554
Beyin	36,877	1,305	0,393
Kanlı Agar	37,179	1,721	0,497
<i>E. coli</i>	37,598	1,264	0,632
<i>S. aureus</i>	34,125	0,47	0,235
<i>P. aeruginosa</i>	34,935	0,478	0,239
<i>E. fecalis</i>	37,023	2,171	1,086

E. coli eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen larvalar ile karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar ve *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan larvalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edilmiştir. *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda yetiştirilen larvalar ile karaciğer dokusu ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan larvalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği saptanmıştır. Kanlı agarda yetiştirilen larvalar ile karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar ve *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan larvalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği saptanmıştır. Beyin dokusunda yetiştirilen larvalar ile karaciğer dokusu ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda ve bulunan larvalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği istatistiksel olarak saptanmıştır (Tablo 4.20).

Tablo 4.20. Çeşitli ortamlarda üretilen larvalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Means	LSD (alpha=0,050)	P	Diff > = LSD
<i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i>	3,473	2,138	0,002	Evet
<i>E. coli</i> ve Karaciğer	3,196	1,746	<0,001	Evet
<i>E. coli</i> ve <i>P. aureginosa</i>	2,663	2,138	0,016	Evet
<i>E. coli</i> ve Sığır eti	2,568	1,746	0,005	Evet
<i>E. coli</i> ve Beyin	0,72	1,766	0,417	Hayır
<i>E. coli</i> ve <i>E. fecalis</i>	0,575	2,138	0,592	Hayır
<i>E. coli</i> ve Kanlı Agar	0,418	1,746	0,633	Hayır
Kanlı Agar ve <i>S. aureus</i>	3,054	1,746	<0,001	Evet
Kanlı Agar ve Karaciğer	2,777	1,235	<0,001	Evet
Kanlı Agar ve <i>P. aureginosa</i>	2,244	1,746	0,013	Evet
Kanlı Agar ve Sığır eti	2,149	1,235	<0,001	Evet
Kanlı Agar ve Beyin	0,302	1,262	0,634	Hayır
Kanlı Agar ve <i>E.fecalis</i>	0,157	1,746	0,858	Hayır
<i>E. fecalis</i> ve <i>S. aureus</i>	2,898	2,138	0,009	Evet
<i>E. fecalis</i> ve Karaciğer	2,621	1,746	0,004	Evet
<i>E. fecalis</i> ve <i>P. aureginosa</i>	2,087	2,138	0,055	Hayır
<i>E. fecalis</i> ve Sığır eti	1,992	1,746	0,026	Hayır
<i>E. fecalis</i> ve Beyin	0,145	1,766	0,87	Hayır
Beyin ve <i>S. aureus</i>	2,752	1,766	0,003	Evet
Beyin ve Karaciğer	2,476	1,262	<0,001	Evet
Beyin ve <i>P.aureginosa</i>	1,942	1,766	0,032	Hayır
Beyin ve Sığır eti	1,847	1,262	0,005	Hayır
Sığır eti ve <i>S. aureus</i>	0,905	1,746	0,303	Hayır
Sığır eti ve Karaciğer	0,628	1,235	0,312	Hayır
Sığır eti ve <i>P. aureginosa</i>	0,095	1,746	0,914	Hayır
<i>P. aureginosa</i> ve <i>S. aureus</i>	0,81	2,138	0,451	Hayır
<i>P. aureginosa</i> ve Karaciğer	0,533	1,746	0,543	Hayır
Karaciğer ve <i>S. aureus</i>	0,277	1,746	0,752	Hayır

Karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, beyin dokusu ve kanlı agar ortamlarında üretilen pupalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyelerinin istatistiksel analizi Tablo 4.21’de verilmiştir

Tablo 4.21. Çeşitli besi yerlerinden üretilen pupalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri

Grup	Ortalama	Standart Sapma	SEM
Karaciğer	35,352	0,897	0,259
Sığır eti	35,425	2,727	0,822
Beyin	36,784	1,538	0,464
Kanlı Agar	37,215	1,304	0,393

P.aeruginosa eklenmiş tryptone soya agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agar, *E.coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar ortamında yetiştirilen larvalar pupa dönemine geçmeden ölmüştür. Karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, beyin dokusu ve kanlı agar ortamlarında üretilen pupalardan chymotrypsin eksprese seviyeleri karşılaştırılmalarıyla yola devam edilmiştir.

Kanlı agar ortamında yetiştirilen pupalar ile karaciğer dokusu, sığır etidokusu ortamlarında bulunan pupalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği saptanmıştır (Tablo 4.22).

Tablo 4.22. Çeşitli ortamlarda üretilen pupalardan eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Means	LSD (alpha=0,050)	P	Diff >= LSD
Kanlı Agar ve Karaciğer	1,862	1,466	0,014	Evet
Kanlı Agar ve Sığır eti	1,79	1,497	0,02	Evet
Kanlı Agar ve Beyin	0,431	1,497	0,564	Hayır
Beyin ve Karaciğer	1,431	1,466	0,055	Hayır
Beyin ve Sığır eti	1,359	1,497	0,074	Hayır
Sığır eti ve Karaciğer	0,072	1,466	0,921	Hayır

Dört farklı ortamda üretilen erişkinlerden eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri istatistiksel analizi (Tablo 4.23) verilmiştir.

Tablo 4.23. Çeşitli ortamlarda üretilen erişkinlerden eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

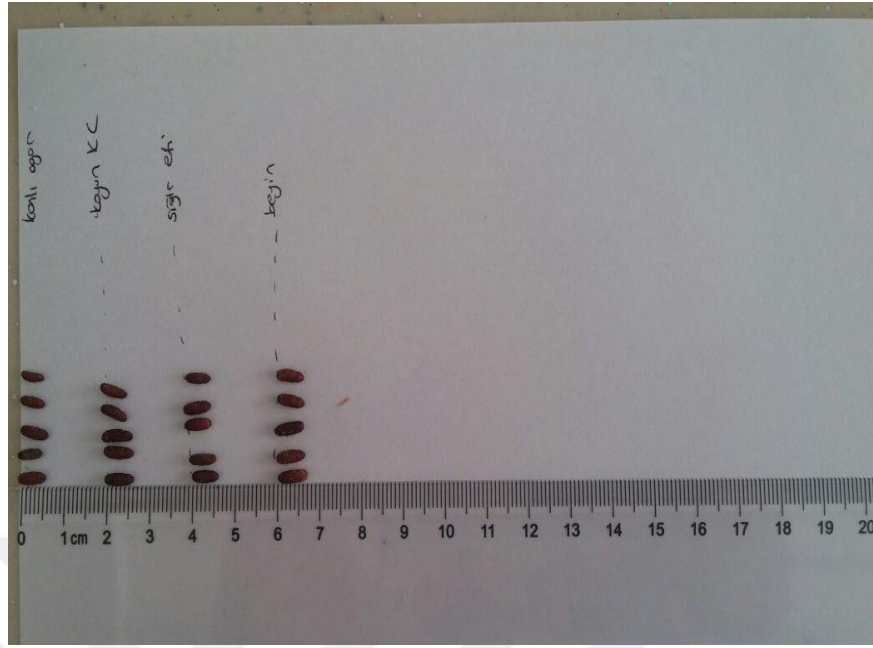
Grup	Ortalama	Standart Sapma	SEM
Karaciğer	29,889	1,959	0,565
Sığır eti	36,378	4,376	1,384
Beyin	29,728	0,794	0,229
Kanlı Agar	32,649	1,523	0,539

Sığır eti dokusunda yetiştirilen erişkinler ile karaciğer dokusu, beyin dokusu ve kanlı agar ortamlarında bulunan erişkinlere göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği saptanmıştır. Kanlı agar ortamında yetiştirilen erişkinler ile karaciğer dokusu ve beyin dokusu ortamlarında bulunan erişkinlere göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği istatistiksel olarak saptanmıştır (Tablo 4.24).

Tablo 4.24. Çeşitli ortamlarda üretilen erişkinlerden eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırılması

Karşılaştırma	Diff of Means	LSD(alpha=0,050)	P	Diff > =LSD
Sığır Eti ve Beyin	6,65	2,168	<0,001	Evet
Sığır Eti ve Karaciğer	6,489	2,168	<0,001	Evet
Sığır Eti ve Kanlı Agar	3,729	2,402	0,003	Evet
Kanlı Agar ve Beyin	2,92	2,311	0,015	Evet
Kanlı Agar ve Karaciğer	2,76	2,311	0,021	Evet
Karaciğer ve Beyin	0,161	2,067	0,876	Hayır

Ayrıca çalışmada farklı ortamlarında gelişimi sağlanan pupaların uzunluk ölçüleri de değerlendirilmiştir. Bu ölçüm neticesinde en fazla uzunluğa sahip pupalar beyin besi yerinde yetişen pupalar olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.16. Farklı ortamlarda gelişen pupa uzunlukları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Maggot Debridman Tedavi, iyileşmeyen kronik yaralara uygulanan eski bir tedavi yöntemidir. Konu ile ilgili klinik ve laboratuvar çalışmaları, yaralar üzerinde kullanılan larvaların nekrotik dokuyu ortadan kaldırdığını, enfeksiyondan arındırdığını ve granülasyon dokusu oluşumunu hızlandığını göstermektedir (22,23).

İyileşmeyen kronik yaralar önemli bir sağlık sorunudur. Kronik yaralarda polimikrobiyal flora kolonize olup yara iyileşmesini geciktirir. Diğer taraftan, son yıllarda yapılan araştırmalarda antibiyotiklere karşı direnç oluştuğu ve antibiyotiklerin mikrobiyal ajanlar üzerine olan etkilerinin giderek azaldığı gösterilmiştir. Antibiyotiğe cevap vermeyen kronik yara tedavilerinde yeni, etkili, alternatif stratejilerin desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (22). MDT’de *L. sericata*’nın 2. dönem larvaları kullanılır. Kafeslerde bulunan sineklerin beslenmesinde % 20’lik şeker solüsyonu kullanılır. Yumurtlamayı sağlamak için et veya ciğer parçacıkları kullanılmaktadır (20). Bu çalışmada; standart bu uygulamaya ilaveten diğer ortamlarda yetiştirilen *L. sericata* larvalarından lucifensin ve chymotrypsin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

Lucifensin, *L. sericata* türü sineğin salgısında yer alan antibakteriyel bir maddedir (23). Lucifensin, sineğin larvalarının salgı ürünlerinde bulunmuş olup, yara patojenlerinin önlenmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Lucifensin ilk olarak larva bağırsağında izole edilmiş ve daha sonra tükürük bezlerinde, vücut yağlarında, hemolenfte saptanmıştır (23).

Bu çalışmada *L. sericata*’nın yumurta, larva, pupa ve erişkin hayat dönemlerinde eksprese edilen lucifensin ve chymotrypsin düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla sekiz farklı beslenme ortamında canlılığı devam ettirilen *L. sericata*’ların yumurta, larva, pupa ve erişkin dönemlerinde lucifensin ve chymotrypsin gen ekspresyonları incelenmiştir.

Lucilia sericata yumurtalarından lucifensin gen ekspresyonu ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, koyun beyin dokusu, kanlı agar, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar 27-30°C ve % 50 nem bulunan bir ortamda yetiştirilen yumurtalardan eksprese edilen lucifensin seviyelerini karşılaştırıldığımızda anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.

En az lucifensin ekspresyonu karaciğer dokusunda saptanmıştır. MDT’de kullanılan larvalar, yumurta sterilizasyonundan sonra steril kanlı agar ortamında inkube edilmektedir. Lucifensin ekspresyon seviyelerinden dolayı koyun beyin dokusu ve sığır eti dokusundan elde edilen yumurtaların kullanılmasının daha verimli olabileceği değerlendirilmiştir. Bu nedenle; MDT için kullanılacak larvaların çıkacağı yumurtaların steril kanlı agar öncesi koyun beyin dokusu ve sığır eti dokusuna yumurtlatılmasının uygun olacağı düşünülmektedir. Elde edilen yumurtalar sterilize edilerek kanlı agar ortamına aktarılabilir.

MDT kullanılan lavalanın steril olması tıbbi gerekliliktir. Steril olmayan ortamlarda yetiştirilen yumurta ve larvalar tedavi olacak hasta için risk taşır. Yara ortamında MRSA, MSSA ve *E. coli* bakteri türleri çok miktarda bulunmaktadır. Çalışmamızda *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar ve *E. coli* eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen yumurtaların lucifensin ekspresyonu karaciğer dokusu ve kanlı agarda yetiştirilenlere göre daha fazladır. Bu nedenle; bakteri ortamında beslenen erişkin sineklerden elde edilen yumurtaların sterilizasyonlarından sonra kanlı agar ortamına alınıp larva üretilmesinin MDT açısından daha verimli olabileceğini düşünmekteyiz.

Maggot debridman tedavisinde lavalalar kullanılmaktadır. Bu nedenle larval dönemdeki sekresyonlardaki lucifensin ve benzeri genlerin ekspresyonu araştırılmıştır. MDT uygulamasında MRSA dahil bakteri ilişkili kronik yaralarda başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (50). Maggotlar, Gram pozitif bakterilere özellikle *Streptococcus* ve *Staphylococcus* türlerine, MRSA klinik izolatlarına karşı antibakteriyel aktivite gösterirler. Bunun yanı sıra MSSA’ya karşı önemli ölçüde önleyicidir (22). Kronik yaralarda oluşan bakteriler genellikle biyofilm içinde bulunurlar. Biyofilm içinde bulunan bakteriler antibiyotik ve bağışıklık sisteminden korunurlar. Kronik yaralarda

biyofilm ile en sık ilişkisi olan *S. aureus* ve *P. aeruginosa* türleridir. Maggot salgıları *S. aureus* ve *P. aeruginosa* 'nın oluşturduğu biyofilmlere karşı etkili bulunmuştur (63).

Bu çalışmada, karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, koyun beyin dokusu, kanlı agar, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda 27-30°C ve % 50 nem bulunan bir ortamda yetiştirilen larvalardan eksprese edilen lucifensin seviyelerini karşılaştırılmış ve anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.

Karaciğer dokusu ve kanlı agar maggotların yetiştirilmesinde yaygın olarak kullanılan ortamlardır. Bu çalışmada *L. sericata* üretiminde kullanılabilecek sığır eti dokusu, koyun beyin dokusu gibi besin ortamlarına ilaveten yara yerinde sık olarak karşılaşılan Gram negatif ve pozitif bakteri türlerinden oluşan *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agarda, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agarda, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen *L. sericata* larvalarından eksprese edilen lucifensin ve chymotrypsin seviyeleri ölçüldü.

En fazla lucifensin sekresyonu *L. sericata* 'nın tükürük bezlerindeki hücrelerden sentezlenmektedir. Valachova ve ark. (10) in situ hibridizasyon yöntemiyle yaptıkları bir çalışmada; yumurta oluşumundan 24 saat sonra lucifensinin maksimum seviyede eksprese edildiği tespit edilmiştir. Lucifensin ekspresyonu yumurtladıktan yaklaşık 6 saat sonra tespit edilmiştir. En fazla lucifensin ekspresyonunun larva yumurtadan çıktıktan 24 saat sonra, tükürük bezlerinde olduğu saptanmıştır. Artmış lucifensin ekspresyon seviyeleri, ikinci ve üçüncü dönem larvalarda (yumurtadan çıktıktan sonra 48 saat) tespit edilirken geç L3 döneminde (yumurtadan çıktıktan 80 saat sonra) azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada diğer dönemlerle birlikte larval dönemde farklı ortamlarda beslenme ile lucifensin ekspresyonu arasındaki ilişki kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bizim çalışmamızda; farklı ortamlarda bulunan tüm yumurtalarda lucifensin ekspresyonunun olduğu, farklı sürelerde alınan yumurtalar arasında lucifensin ekspresyonu açısından anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

Valachova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *L. sericata* larvalarının *S. aureus* ve *P. aeruginosa* oral yolla beslenmesinden 12-24 saat içerisinde lucifensin ekspresyonu

arttığı saptanmış olup 36 saat sonra lucifensin ekspresyonunun kaybolduğu tespit edilmiştir. (10).

Mikrobik ortamda beslenen larvalar L2 dönemlerinde ölmüştür. L1 dönemde alınan örnekler içinde *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen larvalarda lucifensin ekspresyonu saptanmış olup en fazla ekspresyonun *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agardaki örneklerde olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen lucifensin ekspresyon seviyeleri göz önünde bulundurulduğunda, maggot üretiminde karaciğer ve kanlı agara ilaveten sığır eti dokusu ve koyun beyin dokusunun da alternatif olarak kullanılabileceği düşündürmüştür.

Yapılan bir çalışmada; yaralarda bulunan MRSA, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* izolatları kullanılarak, larvaların bu izolatları oral yolla alması sağlanmıştır. Alınan patojenlerle uyarılma sonrası tükürük bezlerinde lucifensin ekspresyonu tespit edilememiştir. Ancak *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın oral yolla alınması sonrasında tükürük bezlerine bağlantılı yağ dokularında lucifensin varlığı tespit edilmiştir. MRSA ve *E. coli*'nin lucifensin ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (23).

Çalışmamızda, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen L1 larvalarda lucifensin ekspresyonu tespit edilmiş olup, *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda yetiştirilen larvalar ile *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agar ortamlarında yetiştirilen larvalara göre daha fazla lucifensin eksprese edildiği, en az lucifensin ekspresyonunun *E. facealis* eklenmiş kanlı agarda yetişmiş larvalarda olduğu tespit edilmiştir.

Pupalarda lucifensin ekspresyonu üzerine yapılmış bir araştırma bulunmamaktadır.

Sığır eti dokusunda gelişen pupalarda kanlı agar ortamlarında gelişen pupalara göre daha fazla lucifensin eksprese edildiği saptanmıştır. Sığır eti dokusunda gelişen pupalarda karaciğer dokusunda gelişen pupalara göre daha fazla lucifensin eksprese

edildiği, en az lucifensin ekspresyonunun kanlı agarda gelişen pupalarda olduğu saptanmıştır.

L. sericata erişkin dönemlerinde de lucifensin ekspresyonu üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Karaciğer dokusu, kanlı agar, sığır eti dokusu, koyun beyin dokusunda ve 27-30°C ve % 50 nem bulunan ortamda yetiştirilen erişkinlerden eksprese edilen lucifensin seviyeleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

MDT için kullanılan larvalar nekrotik dokuları besin kaynağı olarak kullanırken canlı dokuyu etkilemezler. Kullanılan kurtçuklar ölü doku ve yarada bulunan bakterilerle beslenir. Kurtçuklar beslenme işlevini yaparken ölü dokuları ayrıştırıp besin olarak kullanır. Bunun yanı sıra salgıladıkları enzimler sayesinde mikroorganizmaları ortadan kaldırırlar (87). Yüzyıllar boyunca kronik yara tedavisinde uygulanan *L. sericata* larvaları etkin bir biçimde nekrotik dokuyu debride ettikleri ispat edilmiştir. Kurtçuk sekresyonları içerisinde bulunan metaloproteazlar ve serine proteazlar gibi bileşenler debridmana yardımcı olur (49). Larvaların debridman mekanizmasının anlaşılmasına yönelik çalışmalarda chymotrypsin önemli bir noktayı aydınlatmaktadır. Chymotrypsin benzeri proteinazın nekrotik dokuyu etkin bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir (22). Bu bilgiler üzerine yapılan çalışmalar, MDT’de kullanılan larvaların özellikleri ve sekresyonları konusunda yoğunlaşmıştır.

Koyun beyindokusunda gelişmiş yumurta ve larvaların chymotrypsin ekspresyon seviyeleri pupa ve erişkin dönemlerine göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Karaciğer dokusundaki pupaların chymotrypsin ekspresyonu yumurtalara göre yumurtaların ise yetişkinlere göre daha fazla olduğu saptanmıştır.

Bu bulgular lavalara açısından değerlendirildiğinde; koyun beyin dokusu ortamında larva üretiminin alışılagelmiş karaciğer dokusundaki üretime alternatif bir yöntem olarak kullanılabilirdiği düşünülebilir.

Kanlı agar ortamında gelişmiş larva ve pupalarda chymotrypsin ekspresyon seviyelerinin yumurta ve erişkin dönemlerine oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır.

L. sericata yumurtalardan chymotrypsin ekspresyonu hakkında literatürde bildiğimiz kadarıyla bir bilgi bulunmamaktadır. Bunun aydınlatılması adına yapılan çalışmamızda;

karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, koyun beyin dokusu, kanlı agar, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda ortamına konulan steril edilmiş yumurtaların chymotrypsin düzeyleri ölçülmüştür.

MDT’de kullanılan larvalar, yumurta sterilizasyonundan sonra steril kanlı agar ortamında inkube edilmektedir. Koyun beyin dokusundan elde edilen yumurtaların kullanılması, yüksek chymotrypsin ekspresyon seviyelerinden dolayı daha verimli olabileceğini düşünmekteyiz. MDT için kullanılacak larvaları oluşturan yumurtalar steril kanlı agar öncesi koyun beyin dokusuna yumurtlatılabilir. Elde edilen yumurtalar sterilize edilerek kanlı agar ortamına aktarılabilir.

L. sericata larvaları çok eski yıllardan beri kronik yaralara uygulanmış ve steril kurtçukların etkin bir şekilde ölü dokuyu debride ettikleri ve yaraları dezenfekte ettikleri kanıtlanmıştır. Ayrıca iyileşmeyi de hızlandırdıkları bilinmektedir (110). Debridmana yardımcı kurtçuk sekresyonlarında metaloproteazlar, serine proteazlar gibi bileşenler ve antibakteriyel aktiviteleri olan ve iyileşmeye yardımcı olabilen aspartil bileşikler de tespit edilmiştir (38). Yara kabuklarını etkin bir şekilde azaltan, chymotrypsin benzeri proteinazın varlığı bilinmektedir (22). Biyofilm bozulması ile birlikte bakteriler antibiyotiklere, immun sistem faaliyetlerine ve kurtçuk eylemlerine daha duyarlı hale gelmektedir. Chymotrypsin biyofilm bozulmasında etkilidir. Antibiyotik ile birlikte chymotrypsin kombinasyonları biyofilm bozulmasını sağlayabilir. Böylece matrikste kalan bakteriyel oluşumun önlenmesi ve biyofilme karşı antibiyotik aktivasyonu oluşur (109).

E. coli eklenmiş tryptone soya agarda, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agar ve kanlı agarda yetiştirilen larvalarda diğer gruplara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edilmiştir. Bu bulgu MDT’de kullanılan larvaların *E. coli* ile enfekte yaralarda daha fazla chymotrypsin ekspresyonu nedeniyle daha etkin debridman yapabileceği kanısını edindirmektedir. MDT’de kullanılan larvalar steril edilmiş yumurtaların steril kanlı agar ortamında inkubasyonu ile elde edilir. Çalışmamızda da kanlı agarda yüksek chymotrypsin ekspresyonu nedeniyle daha etkin debridman yapabileceği kanısını edindirmektedir.

Pupalar ve erişkinler ile ilgili chymotrypsin ekspresyonu hakkında herhangi bir bilgi mevcut değildir. Çalışmamızda; *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar ortamlarında yetiştirilen larvalar pupa dönemine geçmeden canlılıklarını kaybetmişlerdir. Çalışmamıza karaciğer dokusu, sığır eti dokusu, koyun beyin dokusu, kanlı agar ortamlarında devam edilmiş olup chymotrypsin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır.

Kanlı agarda gelişen pupalarda karaciğer dokusu, sığır etidokusu ortamlarında bulunan pupalara göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği saptanmıştır.

Karaciğer dokusundaki pupaların chymotrypsin ekspresyonunun erişkinler ve yumurtalara göre, sığır eti dokusu grubundaki pupaların chymotrypsin ekspresyonunun yumurtalara göre, koyun beyin dokusu grubundaki pupaların chymotrypsin ekspresyonunun yetişkinlere göre, kanlı agar grubundaki pupaların chymotrypsin ekspresyonunun ise erişkinlere göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Sığır eti dokusunda yetiştirilen erişkinlerde; karaciğer dokusu, koyunbeyin dokusu, kanlı agar ortamlarında bulunan erişkinlere göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği gösterilmiştir. Erişkinlerde en fazla chymotrypsin ekspresyonu sığır eti dokusu ve kanlı agarda tespit edilirken, en az chymotrypsin ekspresyonu karaciğer ve koyun beyin dokusunda yetiştirilenlerde tespit edilmiştir.

Çalışmamızda koyun beyin ve sığır eti besi ortamında yetiştirilen 2. dönem larvaların diğer beslenme ortamlarına göre chymotrypsin ve lucifensin ekspresyonu daha fazla olduğu saptanmış ve MDT çalışmalarında steril koyun beyin besi ortamında yetiştirilen L2 larvalarının kullanılabilceği değerlendirilmiştir.

L. sericata larva üretimi için yaygın olarak karaciğer kullanılmaktadır. Karaciğer dışında farklı bir beslenme ortamının kullanılıp kullanılmayacağı, kullanılabilcekse ne kadar etkin olabileceği, bu ortamlarda yetiştirilen larvalardan lucifensin ve chymotrypsin ekspresyonlarının seviyeleri günümüze kadar detaylı olarak incelenmemiştir.

Çalışmamızda koyun beyin ve sığır eti ortamında yetiştirilecek larvaların lucifensin ve chymotrypsin ekspresyonları açısından değerlendirilmiş ve daha efektif olacağı kanaatine varılmıştır. Daha farklı beslenme ortamlarında larvaların ve diğer hayat formlarının chymotrypsin ve lucifensin gen ekspresyon seviyelerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak;

1. Lucifensin ekspresyon seviyeleri,

- a. Karaciğer dokusu, kanlı agar, sığır eti dokusu, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agar, *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar ortamlarında bulunan yumurta, larva, pupa ve erişkinlerin kendi aralarında lucifensin ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Örneğin karaciğer dokusunda üretilen Y1-Y2-Y3 arasında lucifensin ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır). Aynı besi yerinde bulunan farklı hayat formları arasında aralarında lucifensin ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Örneğin karaciğer dokusunda üretilen yumurta, larva, pupa, erişkin hayat formları arasında aralarında lucifensin ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır).
- b. Kanlı agar, koyun beyin, karaciğer, sığır eti, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agarda, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agarda, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agarda ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agarda bulunan yumurtalardaki lucifensin ekspresyonu karşılaştırıldığında; en fazla üretilen ekspresyon seviyeleri sırasıyla sığır eti dokusu, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agarda, koyun beyin dokusu ortamlarında yetiştirilenlerde görülmüştür. En az lucifensin ekspresyonu karaciğer beslenme ortamındakilerde görülmüştür. Larvalar açısından incelendiğinde; en fazla lucifensin ekspresyonu sığır eti dokusu ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar ortamındakilerde saptanmıştır. En az lucifensin ekspresyon seviyesi ise *E. faecalis* eklenmiş kanlı agarda ortamındakilerde görülmüştür. Pupalarda açısından incelendiğinde; sığır eti dokusu ortamından gelişen pupalarda en yüksek, kanlı agar ortamında gelişen pupalarda ise en düşük lucifensin

ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. Erişkinlerden eksprese edilen lucifensin seviyeleri karşılaştırıldığında beslenme ortamı ile ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

2. Chymotrypsin ekspresyon seviyeleri,

- a. Karaciğer dokusu ve sığır eti dokusundaki yumurtadan larvaya, larvadan pupaya geçerken chymotrypsin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Karaciğer dokusu ile beslenen erişkinlerde chymotrypsin ekspresyonu azalırken, sığır eti dokusundakilerde artmıştır. En fazla chymotrypsin ekspresyonunun larva ve pupa döneminde, en az chymotrypsin ekspresyonunun ise erişkin dönemde olduğu tespit edilmiştir.
- b. Yumurtadan larvaya, larvadan pupaya, pupadan erişkin döneme geçerken chymotrypsin ekspresyonu artmıştır. Chymotrypsin ekspresyonunun en fazla erişkinlerde en az ise yumurtalarda olduğu saptanmıştır. Koyun beyin dokusu ortamında yetiştirilenlerde; en fazla chymotripsyn ekspresyonunun yumurta ve larvada olduğu görülmüştür. Kanlı agarda en fazla chymotrypsin ekspresyonu larva ve pupa döneminde en az ise erişkin dönemde tespit edilmiştir. Karaciğer dokusu ve sığır eti dokusunda yumurtadan larvaya, larvadan pupaya geçerken chymotrypsin ekspresyonu artmıştır. Karaciğer dokusu ile beslenen erişkin formunda chymotrypsin ekspresyonu azalırken, sığır eti dokusunda artmıştır. Karaciğer dokusunda en fazla chymotrypsin ekspresyonu larva ve pupada iken koyun beyin dokusunda en fazla chymotrypsin ekspresyonu yumurta ve larva döneminde tespit edilmiştir.
- c. Kanlı agar, koyun beyin dokusu, karaciğer, sığır eti, *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar, *E. facealis* eklenmiş kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar ortamlarında bulunan yumurtalar kıyaslandığında; chymotrypsin ekspresyonu sırasıyla, koyun beyni dokusu, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ve *P. aeruginosa* eklenmiş tryptone soya agar ortamlarında görülürken en az chymotrypsin ekspresyonu sığır eti beslenme ortamında saptanmıştır.

Larvalar açısından incelendiğinde; kanlı agar, *E. faecalis* eklenmiş kanlı agar, *E. coli* eklenmiş tryptone soya agar ortamında en fazla chymotrypsin ekspresyonu tespit edilirken, en az chymotrypsin ekspresyonu karaciğer dokusu ve *S. aureus* eklenmiş tryptone soya agar ortamında görülmüştür.

Pupalar açısından incelendiğinde; en fazla chymotrypsin ekspresyonunun kanlı agar ortamında gelişen pupalarda olduğu saptanmıştır. Karaciğer dokusu ortamından gelişen pupalarda ise en az chymotrypsin ekspresyonu ölçülmüştür.

Erişkinlerden eksprese edilen chymotrypsin seviyeleri karşılaştırıldığında; Sığır eti dokusunda yetiştirilen erişkinler ile karaciğer dokusu, beyin dokusu ve kanlı agar ortamlarında bulunan erişkinlere göre daha fazla chymotrypsin eksprese edildiği saptanmıştır.

Yara tedavisi için debridman, dezenfeksiyon ve granülasyon oluşumunun hızlandırılması gerekmektedir. Bu işlemleri yapabilecek birçok yöntemlerden biri de kurtçuk tedavisidir. Bu işlemleri yapabilmek için kurtçukların en önemli salgıları lucifensin ve chymotripsindir. Bu çalışmada; farklı beslenme ortamlarında yetiştirilen *L. sericata* sineğinin farklı hayat formlarındaki lucifensin ve chymotrypsin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; farklı beslenme ortamlarında yetiştirilen farklı hayat formlarının lucifensin ve chymotrypsin ekspresyon seviyelerinin farklı olabileceği görülmüştür. Sineğin yetiştirilmesinde farklı beslenme ortamlarının kullanılmasının yara tedavisinde kullanılan larvaların yara iyileşmesine olabilecek etkinliğine nasıl bir katkı sağlayacağı araştırılmıştır.

Bu katkının daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi, hasta sağlığını uzun dönemde nasıl etkilediğinin belirlenmesi açısından daha kapsamlı ve çok merkezli klinik çalışmaların planlanmasının gerekliliği aşikârdır.

6. KAYNAKLAR

1. Whitworth T. Keys to the genera and species of blow flies (Diptera : Calliphoridae) of America North of Mexico. P Entomol Soc Wash. 2006;108(3):689-725.
2. Strikewise Blowfly strike: [10.01.2016]. <http://www.strikewise.com/blowfly.html>.
3. Rueda LC, Ortega LG, Segura NA, Acero VM, Bello F. *Lucilia sericata* strain from Colombia: Experimental colonization, life tables and evaluation of two artificial diets of the blowfly *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae), Bogota, Colombia strain. Biol Res. 2010;43(2):197-203.
4. Purwins S, Herberger K, Debus ES, Rustenbach SJ, Pelzer P, Rabe E, et al. Cost-of-illness of chronic leg ulcers in Germany. Int Wound J. 2010;7(2):97-102.
5. Williams D, Enoch S, Miller D, Harris K, Price P, Harding KG. Effect of sharp debridement using curette on recalcitrant nonhealing venous leg ulcers: a concurrently controlled, prospective cohort study. Wound Repair Regen. 2005;13(2):131-7.
6. Steed DL, Debridement. Am J Surgery. 2004;187:71S–74S.
7. Sherman RA, Hall MJ, Thomas S. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. Annu Rev Entomol. 2000;45:55-81.
8. Dumville JC, Worthy G, Soares MO, Bland JM, Cullum N, Dowson C, et al. VenUS II: a randomised controlled trial of larval therapy in the management of leg ulcers. Health Technol Assess. 2009;13(55):1-182, iii-iv.
9. O'Meara S, Al-Kurdi D, Ologun Y, Ovington LG. Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. Cochrane Database Syst Rev. 2010(1):CD003557.

10. Valachova I, Bohova J, Palosova Z, Takac P, Kozanek M, Majtan J. Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments. *Cell Tissue Res.* 2013;353(1):165-71.
11. Telford G, Brown AP, Seabra RA, Horobin AJ, Rich A, English JS, et al. Degradation of eschar from venous leg ulcers using a recombinant chymotrypsin from *Lucilia sericata*. *Br J Dermatol.* 2010;163(3):523-31.
12. Unat EK, Samastı M. Unat EK, Unat'ın Tıp Parazitolojisi, İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. V. baskı, Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı yayınları, 1995: 140-157.
13. Royal Entomological Society of London. Handbooks for the identification of British insects. London: The Society. p. volumes.
14. Tanyuksel M, Araz E, Dundar K, Uzun G, Gumus T, Alten B, et al. Maggot debridement therapy in the treatment of chronic wounds in a military hospital setup in Turkey. *Dermatology.* 2005;210(2):115-8.
15. Dincer Ş. İnsan ve Hayvanlarda Myiasis. Ozel MA, Daldal N (Edt), Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektorler. Türkiye Parazitol Dern Yay No: 13, İzmir, 1997;169-34.
16. Australian Museum: [06.02.2016].<http://australianmuseum>.
17. Apperson CS, Arends JJ, Baker JR, Carter CC, Payne CS. Blow flies. Insect and Related Pests of Man and Animals: [06.03.2016]. http://ipm.ncsu.edu/ag369/notes/blow_flies.html.
18. Sherman RA. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regen.* 2002;10(4):208-14.
19. Wollina U, Karte K, Herold C, Looks A. Biosurgery in wound healing--the renaissance of maggot therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2000;14(4):285-9.
20. Tarone AM, Foran DR. Generalized additive models and *Lucilia sericata* growth: assessing confidence intervals and error rates in forensic entomology. *J Forensic Sci.* 2008;53(4):942-8.

21. Sargison Neil, The Management of Ectoparasitic Diseases of UK Sheep, World Veterinary Congress. Royal School of Veterinary Studies, Easter Bush Veterinary Center, Roslin, Midlothian, Scotland. 2008: 27–31.
22. Bonn D. Maggot therapy: an alternative for wound infection. *Lancet*. 2000;356(9236):1174.
23. Sherman RA. Maggot therapy for foot and leg wounds. *Int J Low Extrem Wounds*. 2002;1(2):135-42.
24. Horobin AJ, Pritchard DI, Shakesheff KM. How do larvae of *Lucilia sericata* initiate human wound healing? *European Cells and Materials* 4 (Supplement 2): [17.02.2016]. <http://www.itis.gov/>
25. Jaklic D, Lapanje A, Zupancic K, Smrke D, Gunde-Cimerman N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol*. 2008;57(Pt 5):617-25.
26. Wollina U, Liebold K, Schmidt WD, Hartmann M, Fassler D. Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds--clinical data and remittance spectroscopy measurement. *Int J Dermatol*. 2002;41(10):635-9.
27. Graninger M, Grassberger M, Galehr E, Huemer F, Gruschina E, Minar E, et al. Comments, opinions, and brief case reports: biosurgical debridement facilitates healing of chronic skin ulcers. *Arch Intern Med*. 2002;162(16):1906-7.
28. Wolff H, Hansson C. Larval therapy--an effective method of ulcer debridement. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28(2):134-7.
29. Church JC. The traditional use of maggots in wound healing, and the development of larva therapy (biosurgery) in modern medicine. *J Altern Complement Med*. 1996;2(4):525-7.
30. Sherman RA, Tran JM, Sullivan R. Maggot therapy for venous stasis ulcers. *Arch Dermatol*. 1996;132(3):254-6.
31. Whitaker IS, Twine C, Whitaker MJ, Welck M, Brown CS, Shandall A. Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgrad Med J*. 2007;83(980):409-13.

32. Baer WS. The classic: The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). 1931. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(4):920-44.
33. Robinson W, Progress of maggot therapy in the United States and Canada in the treatment of suppurative diseases. *Am J Surg.* 1935a;29:67–71
34. Teich S, Myers RA. Maggot therapy for severe skin infections. *South Med J.* 1986;79(9):1153-5.
35. Özcel MA. Özcel'in tıbbi parazitoloji kitabı, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 2007: 883-884.
36. Bradley M, Cullum N, Sheldon T. The debridement of chronic wounds: a systematic review. *Health Technol Assess.* 1999;3(17 Pt 1):iii-iv, 1-78.
37. Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 2001;38(2):161-6.
38. Drisdelle R. Maggot debridement therapy: a living cure. *Nursing.* 2003;33(6):17.
39. Lewis R, Whiting P, ter Riet G, O'Meara S, Glanville J. A rapid and systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of debriding agents in treating surgical wounds healing by secondary intention. *Health Technol Assess.* 2001;5(14):1-131.
40. Ramundo J, Gray M. Enzymatic wound debridement. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2008;35(3):273-80.
41. Stephen-Haynes J, Thompson G. The different methods of wound debridement. *Br J Community Nurs.* 2007;12(6):S6, S8-10, S2-4, S6.
42. Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, et al. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *Br J Dermatol.* 2003;148(1):14-23.
43. McEvoy GK. Dose adjustment in renal impairment: response from AHFS Drug Information. *BMJ.* 2005;331(7511):293.

44. Hooper SR, Kokes ELC. The effect of pH upon proteolysis by papain. *J Biol Chem.* 1946;167:199–207.
45. Smith AG, Brown A, Telford G, Vowden K, Vowden P, Eagland D, Pritchard D, Britland ST. *Lucilia Sericata* (Greenbottle) larvae secrete a human neutrophil elastase resistant plasmin that stimulates PAR1-transduced *cyr61* upregulation in human dermal microvascular endothelial cells. *J Wound Care.* 2011, submitted.
46. Horobin AJ, Shakesheff KM, Woodrow S, Robinson C, Pritchard DI. Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components. *Br J Dermatol.* 2003;148(5):923-33.
47. Mumcuoglu KY. Clinical applications for maggots in wound care. *Am J Clin Dermatol.* 2001;2(4):219-27.
48. Greenberg B. Model for destruction of bacteria in the midgut of blow fly maggots. *J Med Entomol.* 1968;5(1):31-8.
49. Erdmann GR, Khalil SK. Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 1986;23(2):208-11.
50. Harris LG, Bexfield A, Nigam Y, Rohde H, Ratcliffe NA, Mack D. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. *Int J Artif Organs.* 2009;32(9):555-64.
51. Ziffren SE, Heist HE, May SC, Womack NA. The secretion of collagenase by maggots and its implication. *Ann Surg.* 1953;138(6):932-4.
52. Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedmann R, Schulman H, et al. Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 1998;21(11):2030-1.
53. Baer WS. The treatment of osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). *J Bone Joint Surg.* 1931;13:438–475.

54. Robinson W, Baker FL. The enzyme urease and occurrence of ammonia in maggot infected wounds. *J Parasitol.* 1939; 25:149–155.
55. Church JC. Larval intervention in the chronic wound. *Eur Wound Manag Assoc.* 2001;1:10–13.
56. Robinson W, Norwood VH. Destruction of pyogenic bacteria in the alimentary tract of surgical maggots implanted in infected wounds. *J Lab Clin Med.* 1934; 19:581–586
57. Buchman J, Blair JE. Maggots and their use in the treatment of chronic osteomyelitis. *Surg Gynecol Obstet.* 1932; 55:177–190
58. Thomas S, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S. The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *J Tissue Viability.* 1999;9(4):127-32.
59. Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA. Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect.* 2004;6(14):1297-304.
60. Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens JR. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol.* 2005;19(3):333-7.
61. Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Block C, Galun R. Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *J Wound Care.* 2007;16(3):123-7.
62. Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Breuer E, Bhusare SR, Shai Y, et al. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol.* 2007;21(2):127-31.
63. Kawabata T, Mitsui H, Yokota K, Ishino K, Oguma K, Sano S. Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment. *Med Vet Entomol.* 2010;24(4):375-81.

64. Cerovsky V, Zdarek J, Fucik V, Monincova L, Voburka Z, Bem R. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(3):455-66.
65. Cerovsky V, Slaninova J, Fucik V, Monincova L, Bednarova L, Malon P, et al. Lucifensin, a novel insect defensin of medicinal maggots: synthesis and structural study. *Chembiochem*. 2011;12(9):1352-61.
66. Barnes KM, Gennard DE, Dixon RA. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bull Entomol Res*. 2010;100(6):635-40.
67. Cazander G, van Veen KE, Bouwman LH, Bernards AT, Jukema GN. The influence of maggot excretions on PAO1 biofilm formation on different biomaterials. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467(2):536-45.
68. Cazander G, van de Veerdonk MC, Vandembroucke-Grauls CM, Schreurs MW, Jukema GN. Maggot excretions inhibit biofilm formation on biomaterials. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(10):2789-96.
69. Bowling FL, Salgami EV, Boulton AJ. Larval therapy: a novel treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2007;30(2):370-1.
70. Tantawi TI, Gohar YM, Kotb MM, Beshara FM, El-Naggar MM. Clinical and microbiological efficacy of MDT in the treatment of diabetic foot ulcers. *J Wound Care*. 2007;16(9):379-83.
71. Armstrong DG, Salas P, Short B, Martin BR, Kimbriel HR, Nixon BP, et al. Maggot therapy in "lower-extremity hospice" wound care: fewer amputations and more antibiotic-free days. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2005;95(3):254-7.
72. Andersen AS, Sandvang D, Schnorr KM, Kruse T, Neve S, Joergensen B, et al. A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(8):1646-54.
73. Sherman RA. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care*. 2003;26(2):446-51.

74. Robinson W. Stimulation of healing in non-healing wounds: by allantoin occurring in maggot secretions and of wide biological distribution. *J Bone Joint Surg Am.* 1935b;17:267–271
75. Prete PE. Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci.* 1997;60(8):505-10.
76. Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon the migration of human dermal fibroblasts over a fibronectin-coated surface. *Wound Repair Regen.* 2005;13(4):422-33.
77. Mumcuoglu KY, Lipo M, Ioffe-Uspensky I, Miller J, Galun R. [Maggot therapy for gangrene and osteomyelitis]. *Harefuah.* 1997;132(5):323-5, 82.
78. Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedmann R, Schulman H, et al. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *Int J Dermatol.* 1999;38(8):623-7.
79. Namias N, Varela JE, Varas RP, Quintana O, Ward CG. Biodebridement: a case report of maggot therapy for limb salvage after fourth-degree burns. *J Burn Care Rehabil.* 2000;21(3):254-7.
80. Sherman RA, Morrison S, Ng D. Maggot debridement therapy for serious horse wounds – a survey of practitioners. *Vet J.* 2007;174(1):86-91.
81. Gilead L, Mumcuoglu KY, Ingber A. The use of maggot debridement therapy in the treatment of chronic wounds in hospitalised and ambulatory patients. *J Wound Care.* 2012;21(2):78, 80, 2-5.
82. Pechter EA, Sherman RA. Maggot therapy: the surgical metamorphosis. *Plast Reconstr Surg.* 1983;72(4):567-70.
83. Thomas S, Jones M, Shutler S, Jones S. Using larvae in modern wound management. *J Wound Care.* 1996;5(2):60-9.
84. Sherman RA. A new dressing design for use with maggot therapy. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(2):451-6.

85. Wayman J, Nirojogi V, Walker A, Sowinski A, Walker MA. The cost effectiveness of larval therapy in venous ulcers. *J Tissue Viability*. 2000;10(3):91-4.
86. Jukema GN, Menon AG, Bernardts AT, Steenvoorde P, Taheri Rastegar A, van Dissel JT. Amputation-sparing treatment by nature: "surgical" maggots revisited. *Clin Infect Dis*. 2002;35(12):1566-71.
87. Church JC, Courtenay M. Maggot debridement therapy for chronic wounds. *Int J Low Extrem Wounds*. 2002;1(2):129-34.
88. Sherman RA, Shimoda KJ. Presurgical maggot debridement of soft tissue wounds is associated with decreased rates of postoperative infection. *Clin Infect Dis*. 2004;39(7):1067-70.
89. Steenvoorde P, Jacobi CE, Oskam J. Maggot debridement therapy: free-range or contained? An in-vivo study. *Adv Skin Wound Care*. 2005;18(8):430-5.
90. Fleischmann W, Grassberger M, Sherman R. *Maggot therapy: a handbook of maggotassisted wound healing*, 1st edn. Thieme, Stuttgart. 2004.
91. Lipsky BA, Polis AB, Lantz KC, Norquist JM, Abramson MA. The value of a wound score for diabetic foot infections in predicting treatment outcome: a prospective analysis from the SIDESTEP trial. *Wound Repair Regen*. 2009;17(5):671-7.
92. Ramsey SD, Newton K, Blough D, McCulloch DK, Sandhu N, 143er GE, et al. Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 1999;22(3):382-7.
93. Ragnarson Tennvall G, Apelqvist J. Health-economic consequences of diabetic foot lesions. *Clin Infect Dis*. 2004;39 Suppl 2:S132-9.
94. Jeffcoate WJ. Screening to identify individuals at high risk of developing diabetic foot ulcers. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(5):256-7.
95. Reiber GE, Bowker JH, Pfefier MA. Epidemiology of foot ulcers and amputation in the diabetic foot. In: *The diabetic foot*. 6th ed. St Louis, Mo Inc, 2001:1332.

96. Gurlek A, Bayraktar M, Savas C, Gedik O. Amputation rate in 147 Turkish patients with diabetic foot: the Hacettepe University Hospital experience. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1998;106(5):404-9.
97. Yesil S, Akinci B, Yener S, Bayraktar F, Karabay O, Havitcioglu H, et al. Predictors of amputation in diabetics with foot ulcer: single center experience in a large Turkish cohort. *Hormones (Athens)*. 2009;8(4):286-95.
98. Sherman RA, Mumcuoğlu KY, Grassberger M, Tantawi TI. *Biotherapy History Principles and Practice*. Springer Sciens Business Media Dordrecht, 2013:5-30.
99. Mumcuoglu KY, Davidson E, Avidan A, Gilead L. Pain related to maggot debridement therapy. *J Wound Care*. 2012;21(8):400, 2, 4-5.
100. Nuesch R, Rahm G, Rudin W, Steffen I, Frei R, Rufli T, et al. Clustering of bloodstream infections during maggot debridement therapy using contaminated larvae of *Protophormia terraenovae*. *Infection*. 2002;30(5):306-9.
101. Steenvoorde P, Buddingh TJ, van Engeland A, Oskam J. Maggot therapy and the “yuk” factor: an issue for the patient? *Wound Repair Regen*. 2005;13(3):350-2.
102. Sherman RA, Sherman J, Gilead L, Lipo M, Mumcuoglu KY. Maggot debridement therapy in outpatients. *Arch Phys Med Rehabil*. 2001;82(9):1226-9.
103. Sherman RA, Wyle FA, Thrupp L. Effects of seven antibiotics on the growth and development of *Phaenicia sericata* (Diptera: Calliphoridae) larvae. *J Med Entomol*. 1995;32(5):646-9.
104. Peck GW, Kirkup BC. Biocompatibility of antimicrobials to maggot debridement therapy: medical maggots *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) exhibit tolerance to clinical maximum doses of antimicrobials. *J Med Entomol*. 2012;49(5):1137-43.
105. Güneş YÜ, Eşer İ. Nemli yara iyileşmesi ve oklusif pansumanların yara iyileşmesindeki önemi. *Cumhuriyet Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*. 2006; 10(2); 57- 65
106. Yavuz M. Yara iyileşmesine destek sağlayan yöntemler. 4. Ulusal Cerrahi ve Ameliyathane Hemşireliği Kongresi Kongre Kitabı. 23–26 Ekim 2003, İzmir.

107. Aktaş Ş. Kronik yarada lokal faktörler ve yardımcı tedaviler. ANKEM dergi. 2012; 26 (Ek2): 217-222
108. Calvin M. Cutaneous wound repair. *Wounds*. 1998; 10(1):12-32.
109. Thomas S, Jones M. Wound debridement: evaluating the costs. *Nurs Stand*. 2001;15(22):59-61.
110. Singhal A, Reis ED, Kerstein MD. Options for nonsurgical debridement of necrotic wounds. *Adv Skin Wound Care*. 2001;14(2):96-100; quiz 2-3.
111. Schuhmann B, Seitz V, Vilcinskas A, Podsiadlowski L. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2003;53(3):125-33.
112. Richardson M. The benefits of larval therapy in wound care. *Nurs Stand*. 2004;19(7):70, 2, 4 passim.
113. Erdoğan B. Yara bakım ürünleri, Güncel Yönleriyle Kronik Yara. İstanbul Tıp Fakültesi, Kronik Yara Konseyi Yayını, İstanbul, 2010: 143-71.
114. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):244-69.
115. Peel ALG: Definition of Infection. *Infection in Surgical Practice* EW Taylor (Edt), 1. Baskı, Oxford University, 1992: 82.
116. Brook I. Microbiological studies of decubitus ulcers in children. *J Pediatr Surg*. 1991;26(2):207-9.
117. Mousa HA. Aerobic, anaerobic and fungal burn wound infections. *J Hosp Infect*. 1997;37(4):317-23.
118. Gerding DN. Foot infections in diabetic patients: the role of anaerobes. *Clin Infect Dis*. 1995;20 Suppl 2:S283-8.
119. Goldstein EJ, Citron DM, Nesbit CA. Diabetic foot infections. Bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. *Diabetes Care*. 1996;19(6):638-41.

120. Öztürk DD. Yaşlılıkta enfeksiyon hastalıkları. Gacar MN (Edt), Sağlık Bilimlerinde Yaşlılık. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2009: 133-150.
121. Baer WS. Sacro-iliac joint—arthritis deformans—viable antiseptic in chronic osteomyelitis. Proc Int Assembly Interstate Postgrad Med Assoc North Am. 1929;371:365–72.
122. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH. Osteomyelitis in long bones. J Bone Joint Surg Am. 2004;86-A(10):2305-18.
123. Walenkamp GH, Kleijn LL, de Leeuw M. Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. Acta Orthop Scand. 1998;69(5):518-22.
124. Ansari MA, Shukla VK. Foot infections. Int J Low Extrem Wounds. 2005;4(2):74-87.
125. Mayhall CG. The epidemiology of burn wound infections: then and now. Clin Infect Dis. 2003;37(4):543-50.
126. Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP, Herndon DN. Emerging infections in burns. Surg Infect (Larchmt). 2009;10(5):389-97.
127. van der Plas MJ, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HC, Lagendijk EL, van Gulpen C, et al. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2008;61(1):117-22.
128. van der Plas MJ, Dambrot C, Dogterom-Ballering HC, Kruithof S, van Dissel JT, Nibbering PH. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. J Antimicrob Chemother. 2010;65(5):917-23.
129. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999;284(5418):1318-22.
130. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol. 1994;48:585-617.

131. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.* 1999;67(10):5427-33.
132. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* 1996;20(5):1083-91.
133. Mack D, Siemssen N, Laufs R. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun.* 1992;60(5):2048-57.
134. Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G, 3rd, Goldmann DA, et al. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun.* 2002;70(8):4433-40.
135. Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology.* 2007;153(Pt 8):2435-46.
136. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2001;183(9):2888-96.
137. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol.* 2005;55(6):1883-95.
138. Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol.* 2010;75(1):187-207.
139. Mumcuoglu KY, Taylan Ozkan A. [The treatment of suppurative chronic wounds with maggot debridement therapy]. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2009;33(4):307-15.

140. Thomas S. Cost of managing chronic wounds in the U.K., with particular emphasis on maggot debridement therapy. *J Wound Care*. 2006;15(10):465-9.
141. Tekin S, Polat E, Arslan A, Öroğlu B, Gakan H, Kondakçığıl G, Aktaş Ş, Larva debridman tedavisi: Klinik uygulamada ilk sonuçlar. II. Ulusal Yara Bakımı Kongresi. 29 Kasım-01 Aralık, İstanbul, 2007: 96.
142. Sherman RA. Maggot therapy takes us back to the future of wound care: new and improved maggot therapy for the 21st century. *J Diabetes Sci Technol*. 2009;3(2):336-44.
143. Thomas S, Wynn K, Fowler T, Jones M. The effect of containment on the properties of sterile maggots. *Br J Nurs*. 2002;11(12 Suppl):S21-2, S4, S6 passim.
144. Otvos L, Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. *J Pept Sci*. 2000;6(10):497-511.
145. Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J Biol Chem*. 1993;268(26):19239-45.
146. Bulet P, Stocklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett*. 2005;12(1):3-11.
147. Langen G, Imani J, Altincicek B, Kieseritzky G, Kogel KH, Vilcinskas A. Transgenic expression of gallerimycin, a novel antifungal insect defensin from the greater wax moth *Galleria mellonella*, confers resistance to pathogenic fungi in tobacco. *Biol Chem*. 2006;387(5):549-57.
148. Cerovsky V, Bem R. Lucifensins, the Insect Defensins of Biomedical Importance: The Story behind Maggot Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014;7(3):251-64.
149. White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol*. 1995;5(4):521-7.
150. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*. 1999;23(4-5):329-44.
151. Wong JH, Xia L, Ng TB. A review of defensins of diverse origins. *Curr Protein Pept Sci*. 2007;8(5):446-59.

152. Nigam Y, Dudley E, Bexfield A, Bond AE, Evans J, James J. The physiology of wound healing by the medicinal maggot, *Luciliasericata*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Ltd. 2010: 39-81.
153. Golinko MS, Joffe R, Maggi J, Cox D, Chandrasekaran EB, Tomic-Canic RM, et al. Operative debridement of diabetic foot ulcers. *J Am Coll Surg*. 2008;207(6):e1-6.
154. Britland S, Smith A, Finter W, Eagland D, Vowden K, Vowden P, et al. Recombinant *Lucilia sericata* chymotrypsin in a topical hydrogel formulation degrades human wound eschar ex vivo. *Biotechnol Prog*. 2011;27(3):870-4.
155. Schmidtchen A, Wolff H, Rydengard V, Hansson C. Detection of serine proteases secreted by *Lucilia sericata* in vitro and during treatment of a chronic leg ulcer. *Acta Derm-Venereol*. 2003; 83: 310–311.
156. Llinos G, Harris, Yamni Nigam, James Sawyer, Dietrich Mack and David I. Pritchard. *Lucilia sericata* Chymotrypsin Disrupts Protein Adhesin-Mediated Staphylococcal Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol*. 2013; 79(4):1393.
157. Telford G, Brown A.P, Kind A, English J.S.C. and Pritchard D.I. Maggot chymotrypsin I from *Lucilia sericata* is resistant to endogenous wound protease inhibitors. *2010 British Association of Dermatologists* 2011; 164:192–196

EKLER

EK 1: İNTİHAL RAPORU

LUCILIA SERICATA'NIN FARKLI HAYAT DÖNEMLERİNDE LUCIFENSİN VE CHYMOTRIPSİN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%4 BENZERLİK ENDEKSİ	%3 İNTERNET KAYNAKLARI	%2 YAYINLAR	% ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.pharmoils.com İnternet Kaynağı	%1
2	ir.lib.uth.gr İnternet Kaynağı	<%1
3	www.yubat.org İnternet Kaynağı	<%1
4	MUMCUOĞLU, Kosta Y. and ÖZKAN, Ayşegül, Taylan. "Süpüratif kronik yaraların maggot debridman tedavisi", Türkiye Parazitoloji Derneği, 2009. Yayın	<%1
5	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	www.turkiyeparazitolojidernegi.org İnternet Kaynağı	<%1
7	ŞAKALAR, Çağrı, UYAR, Yunus, GÜRBÜZ,	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Ahmet GÜRCEL

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 13 Temmuz 1968, İstanbul

Tel: +90 541 819 51 99

Fax:+90 312 473 02 05

email: burc2010ahmet@gmail.com

Yazışma Adresi: Beştepeler Mah. Merhale Sok. No:71/6 Yenimahalle/ANKARA

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Atatürk Ü. Eğt. F. Biyoloji Öğretmenliği	1992
Lise	Şehremini Lisesi, İstanbul	1987

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
1992-1997	Özel Sektör	Personel
1998-2013	Özel Sektör	İdareci
2013-	BilteDavi (Medikal)	İdareci

YABANCI DİL

İngilizce

KATILDIĞI KURSLAR SINAVLAR

1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
2. Proje Çevirim Yönetimi Sertifikası
3. Kişisel Gelişim Eğitimleri Sertifikası

KATILDIĞI KONGRELER

1. 18.Ulusal Parazitoloji Kongresi (29 Eylül-5 Ekim 2013 Denizli)
2. AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE & HYGIENE (ASTMH)
(New Orleans, Louisiana, USA November 2-6, 2014)

PROJELER

1. TÜBİTAK Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığınca (TEYDEB) desteklenen “MAGGOT TEDAVİSİ İÇİN TİCARİ LUCİLLA SERİCATA LARVA KİTİ GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı ve 7100399 numaralı projede, **Proje Yürütücüsü**
01.09.2010 / 31.08.2011