

***ANDROKTONUS CRASSICAUDA* ZEHİRİNİN APOPTOZ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *ANDROKTONUS*
CRASSICAUDA VENOM ON APOPTOSIS**

BÜŞRA NUR SABAH

PROF. DR HATİCE MERGEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Bu tez, hayatıma bir güneş gibi doğan canım kızım Defne'ye ithaf edilmiştir.

ÖZET

***ANDROKTONUS CRASSICAUDA* ZEHİRİNİN APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Büşra Nur SABAH

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN

Eş Danışman: Prof. Dr. Leyla AÇIK

Mayıs 2022, 55 sayfa

Hücre ölümü, gelişim esnasında organların oluşmasında ve istenmeyen hücrelerin yok edilmesi ile doku homeostazının düzenlenmesinde önemli role sahip olan hücresel bir tepkimedir. Apoptoz ise gereksiz veya zararlı hücreleri ortadan kaldırarak doku homeostazının gelişiminde ve korunmasında önemli rol oynayan programlı hücre ölümüdür. Apoptozun düzenlenmesi, hücrenin hayatta kalması ve hastalığı önlemek için gerekli olan ölüm sinyali arasındaki hassas dengeyi korumak için gereklidir. Apoptoz, DNA hasarı, stres ve hipoksi gibi hücre içindeki sinyaller veya ligandların hücre yüzeyi ölüm reseptörlerine bağlanması gibi dışsal sinyallerle tetiklenebilir. Apoptozun çeşitli yollarla engellenmesi hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalarak kansere dönüşmelerine neden olur.

Biyotoksinler, diğer organizmaları öldüren veya onlara zarar verebilen canlı organizmalar tarafından üretilen bileşiklerdir. Hem toksikolojik hem de farmakolojik etkiye sahiptirler. Kanser gibi çeşitli patofizyolojik problemlerin önlenmesinde ilaç tasarımları için başlangıç materyali olarak kullanılabilen bol miktarda doğal kaynak içerirler. Biyotoksin türevi olan zehirler olumsuz etkileri ile bilinir ve insanlarda ciddi sağlık sorunlarına neden olur; nörotoksisite, nefrotoksisite, sitotoksisite, solunum durması, dermatit, alerjik reaksiyonlar, kanama ve yaygın damar içi pıhtılaşmaya neden olabilecek çeşitli bileşikler taşır. Zehir, organizmaların zehir bezinden sentezlenen bir salgısıdır. Birçok biyotoksin anti-tümör etkiye sahiptir; bazıları tümör hücrelerini doğrudan öldürür, bazıları tümör anjiyogenezini ve tümör büyümesini inhibe eder. Akrep zehirlerinin, apoptozu indükleyerek kanser ilerlemesine karşı etkili olan çok sayıda biyoaktif bileşiğe sahip oldukları bilinmektedir.

Bu çalışmanın amacı, *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807) türü akrep ham zehirinin hücre canlılığı, apoptoz ve gen ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek ve elde edilen bulgular neticesinde başta kanser olmak üzere hücre ölümüyle ilişkili hastalıklarda tedavi stratejilerine katkı sağlamaktır. Bu tez çalışmasında *A. crassicauda* zehrinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisi belirlenmiş ve bu sitotoksik etkinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik genler olan Kaspaz-3, *P21*, *P53*, *NOXA*, *PUMA*, *BCL-2* ve *BCL-XL* genlerinin ifadesine olan etkileri gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR) yöntemi ile araştırılmıştır. Araştırma neticesinde, bu türe özgü ham zehirin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında anti-tümör etki gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: akrep zehiri, apoptoz, biyotoksin, hücre ölümü, kanser

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *ANDROKTONUS CRASSICAUDA* VENOM ON APOPTOSIS

Büşra Nur SABAH

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN

Co- Supervisor: Prof. Dr. Leyla AÇIK

May 2022, 55 pages

Cell death is a cellular reaction that plays an important role in the formation of organs during development, the destruction of unwanted cells and the regulation of tissue homeostasis. Apoptosis is programmed cell death that plays an important role in the development and maintenance of tissue homeostasis by eliminating unnecessary or harmful cells. Regulation of apoptosis is essential for maintaining the delicate balance between cell survival and the death signal necessary to prevent disease. Apoptosis can be triggered by intracellular signals such as DNA damage, stress and hypoxia, or by external signals such as ligands binding to cell surface death receptors. Inhibition of apoptosis in various ways causes cells to multiply uncontrollably and turn into cancer.

Biotoxins are compounds produced by living organisms that can kill or harm other organisms. They have both toxicological and pharmacological effects. They contain abundant natural resources that can be used as starting materials for drug designs in the

prevention of various pathophysiological problems such as cancer. Poisons, which are biotoxin derivatives, are known for their negative effects and cause serious health problems in humans; It carries various compounds that can cause neurotoxicity, nephrotoxicity, cytotoxicity, respiratory arrest, dermatitis, allergic reactions, bleeding and disseminated intravascular coagulation. Venom is a secretion of organisms synthesized from the venom gland. Many biotoxins have anti-tumor effects; some kill tumor cells directly, some inhibit tumor angiogenesis and tumor growth. Scorpion venoms are known to have numerous bioactive compounds that are effective against cancer progression by inducing apoptosis.

The aim of this study is to examine the effect of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807) scorpion raw venom on cell viability, apoptosis and gene expression, and to contribute to treatment strategies in cell death-related diseases, especially cancer, as a result of the findings. In this thesis study, the cytotoxic effect of *A. crassicauda* venom on MDA-MB-231 breast cancer cells was determined and this cytotoxic effect was determined by the pro-apoptotic and anti-apoptotic genes *CASPASE-3*, *P21*, *P53*, *NOXA*, *PUMA*, *BCL-2* and *BCL-XL*. The effects on the expression of genes were investigated by real-time PCR (RT-PCR) method. As a result of the research, it was found that this species-specific crude poison has an anti-tumor effect on the MDA-MB-231 breast cancer cell line.

Keywords: scorpion venom, apoptosis, biotoxin, cell death, cancer

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yol gösteren, her türlü yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle yoluma ışık tutan, azimle çalışmanın en sonunda karşılık bulacağını öğreterek motive eden ve desteğini asla esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e

Eş danışmanlığımı yaparak bilgisi, tecrübesi ve önerileriyle daha ileriye gidebilmemi sağlayan, değerli fikir ve katkılarıyla tez çalışmamın her aşamasında destekleyici olan, her koşulda yanımda durarak sevgisini ve ilgisini hep hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK'a

Akrep zehrinin gönderilmesini sağlayarak bu tez çalışmamın gerçekleşmesinde büyük katkısı olan Harran Üniversitesi'nden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şahin TOPRAK'a,

Kafamdaki soru işaretlerini gidermek için ne zaman kapılarını çalsam ve yardım istesem asla geri çevirmeyen, beraber çalışmaktan büyük bir mutluluk duyduğum çok kıymetli hocalarım Sayın Dr. Beril ERDEM TUNÇDEMİR, Dr. Sibel KÜÇÜKYILDIRIM ÇELİK, Doç. Dr. Emel SAĞLAR ÖZER'e,

Çalışmalarım boyunca her sorunda benimle beraber çözüm bulmaya çalışan, bir hocadan çok abla sıcaklığında bana yardımcı olan Sayın Dr. Betül AYDIN'a,

Dostluk sıfatını sonuna kadar hak eden, ne zaman yardıma ihtiyacım olsa yardımlarını esirgemeyen, beraber ağlayıp beraber güldüğümüz canım laboratuvar arkadaşlarım Dilara VAİZOĞLU, Özgür ÖZDEMİREL, Hazal TAHRAVİ ve Dilara ULUSAL'a,

Hayatım boyunca maddi manevi her konuda beni destekleyerek bugünlere gelmemde büyük emek ve özveride bulunan canım annem, babam ve kardeşlerime,

Benimle birlikte tüm zorlukları göğüsleyerek her daim yanımda olan sevgili eşime ve tez çalışmalarım sürecinde dünyaya gelerek hayata bambaşka bakmamı sağlayan güzel kızım Defne'ye,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasına, 05/2020-14 numaralı Bağımsız Bilimsel Araştırma Projesi ile destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Arachnida ve Akrep	2
2.1.1. Akrelerin Genel Özellikleri	2
2.1.2. Akrelerin Morfolojisi	3
2.1.3. Akrelerin Taksonomisi	4
2.1.4. Türkiye’deki Akrep Türleri	4
2.1.5. <i>Androctonus Crassicauda</i> Türünün Genel Özellikleri.....	6
2.2. Toksinler	7
2.2.1. Biyotoksinler ve Venomlar.....	8
2.2.2. Akrep Zehiri ve Bileşenleri	9
2.3. Kanser	10
2.3.1. Meme Kanseri.....	12
2.3.2. Akrep Zehirinin İyon Kanalları Aracılığıyla Kansere Etkisi.....	14
2.3.3. Kanser Hücrelerine Karşı Sitotoksik Akrep Toksinleri	17
2.3.4. Akrep Zehirinin Etki Ettiği Kanser Türleri	18
2.4. Apoptoz.....	19
2.4.1. Akrep Zehiri ve Apoptoz İlişkisi	22
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	23
3.1. Akrep Ham Zehirinin Sağılması ve Hazırlanması	24

3.2. Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Devamlılığı	24
3.3. Hücre Sayımı ve Hücrelerin Deney İçin Hazır Hale Getirilmesi	25
3.4. Akrep Zehirinin Hücrelere Uygulanması	26
3.5. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Analizleri.....	26
3.5.1. MTT Testi	26
3.5.2. Apoptoz ve Nekroz Tayini.....	27
3.5.3. Mitokondriyal Transmembran Potansiyel ($\Delta\Psi_m$) Analizi	28
3.6. RNA İzolasyonu	30
3.7. cDNA Sentezi	31
3.8. Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR).....	34
3.9. İstatistiksel Analiz.....	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. Akrep Zehirinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	37
4.2. Akrep Zehiri ile Uyarılan Hücrelerde Canlılık ve Sitotoksosite Ölçümü	37
4.2.1. Farklı Konsantrasyonlarda Akrep Zehiri ile Uyarılan MDA-MB-231 ve Vero Hücrelerinde MTT Testi.....	37
4.2.2 Farklı Konsantrasyonlarda Akrep Zehiri ile Uyarılan MDA-MB-231 Hücrelerinde Apoptoz/Nekroz Tayini.....	40
4.2.3. Farklı Konsantrasyonlarda Akrep Zehirinin MDA-MB-231 Hücrelerinde Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Üzerine Etkisi	42
4.3. Optimum Dozda Akrep Zehiri Uygulanan Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik Genlerin İfadelerinin Belirlenmesi	43
5. YORUM.....	47
6. KAYNAKLAR.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Akreplerin morfolojik yapısı.....	3
Şekil 2.2. Türkiye’de bulunan akreplerin zehirlilik durumları.....	5
Şekil 2.3. Türkiye’de bulunan tehlikeli akrep türlerinin coğrafik dağılımları.....	6
Şekil 2.4. <i>Androctonus crassicauda</i> türü akrep görüntüsü.....	7
Şekil 2.5. Kanser oluşumu.....	11
Şekil 2.6. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları.....	12
Şekil 2.7. Meme anatomisi ve meme kanseri.....	13
Şekil 2.8. Kanser ile bağlantılı voltaj-kapılı Na^+/K^+ kanalları üzerinde akrep zehrinin etkisi.....	15
Şekil 2.9. Akrep zehir peptitlerinin kanser hücreleri üzerine farmakolojik etkileri.....	17
Şekil 2.10 Apoptoz yolları (dış yolak, mitokondri yolağı ve endoplazmik retikulum yolağı).....	20
Şekil 2.11 Apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar ve kanser bağlantısı.....	22
Şekil 3.1 MTT tetrazolyum tuzunun parçalanarak formazan kristallerine dönüştürülmesi.....	26
Şekil 3.2. Mitokondriyal membran potansiyel ölçümünde JC-1 boyasının agregat ve monomer yapılarının görüntüleri.....	29
Şekil 4.1. 5 farklı konsantrasyonda sağlıklı ve kanser hücrelerine 24 saat uygulanan akrep zehrinin MTT sonuçları.....	37
Şekil 4.2. IC50 değerinin elde edildiği Excel grafiği.....	38
Şekil 4.3. 5 farklı konsantrasyonda 24 saat boyunca akrep zehri uygulanan MDA-MB-231 ve VERO hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.....	38
Şekil 4.4.. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat boyunca akrep zehri ile uyarılan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz ve nekroz ayırımı için floresan boyama sonuçları.....	41
Şekil 4.5. <i>A. crassicauda</i> zehri ile 24 saat inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimlerin floresan mikroskobu altında gösterilmesi.....	42
Şekil 4.6. <i>A. crassicauda</i> zehri ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 0, 24 ve 48 saat inkübasyon sonucu Cas-3 (A), Noxa (B), Puma (C), p21 (D), p53 (E), Bcl-2 (F) ve Bcl-XL(G) genlerinin gerçek zamanlı PZR sonuçları.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Akrep sistematığı..	4
Çizelge 3.1. 0.saat inkübasyon cDNA sentez reaksiyonu içerikleri.....	32
Çizelge 3.2. 24.saat inkübasyon cDNA sentez reaksiyonu içerikleri.....	33
Çizelge 3.3. 48.saat inkübasyon cDNA sentez reaksiyonu içerikleri.....	33
Çizelge 3.4. 12 µl'lik son hacime sırasıyla eklenen ürünler.....	34
Çizelge 3.5 Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri.....	35
Çizelge 3.6. Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyon Koşulları.	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
rpm	Devir sayısı/dakika
h	İnkübasyon zamanı
$^{\circ}\text{C}$	Derece santigrat
cm ²	Santimetre kare
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
μg	Mikrogram
mM	Milimolar
U	Ünite
$\Delta\Psi\text{m}$	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
$\Delta\Delta\text{Ct}$	Delta Delta Eşik Değeri Döngüsü

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik Asit
cDNA	Komplementer DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür)
DMSO	Dimetilsülfoksit
PBS	Fosfat tamponlu salin
FBS	Fetal bovine serum
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PZR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
MDA-MB-231	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
Vero	Yeşil Maymun Böbrek Epitel Hücre Hattı

1. GİRİŞ

Kanser, dünyada önemli bir sağlık sorunu olarak kendini göstermiş ve önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmuştur. 2030 yılına kadar yılda 26 milyon yeni kanser vakası ve 17 milyon kanser ölümü olacağı tahmin edilmektedir [1]. Kanserın yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olması araştırmacıları daha iyi ve etkili tedavi bulma arayışlarına yönlendirmiştir. Kansere yönelik tedavi yöntemleri arasında kemoterapi, radyasyon terapisi, cerrahi, immunoterapi ve hormonal tedavi yer almaktadır. Kemoterapi, bugüne kadar kanser tedavisinde tümör ilerlemesini etkili bir şekilde kontrol edebildiği için ana seçeneklerden biri olmuştur. Ancak kemoterapi normal hücrelere de önemli ölçüde zarar vermektedir ve ilaca dirençli tümör hücrelerinin ortaya çıkma riskini arttırmaktadır. Bunun sonucunda da mevcut kemoterapötiklerin etkinliği sınırlanmaktadır [2]. Son yıllarda, anti tümör etkinliğe sahip biyolojik ajanlar ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Kanser tedavisinde anti-kanser ilaçlar ile yapılan kemoterapi yerine biyoterapi yöntemleri denenmektedir [3]. Monoklonal antikorlar, biyotoksinler ve interferonlar gibi bazı biyolojik ajanlar, düşük yan etkilere ve güçlü terapötik etkilere sahiptir. Biyotoksin kaynaklarından birisi olan akrep zehiri, zehir içeriklerindeki 100'den fazla peptit, toksinler, enzimler, büyüme faktörleri, aktivatörler ve inhibitörler gibi biyoaktif moleküller ile alternatif ajanların geliştirilmesi çalışmalarında kullanılmaktadır. Akrep zehiri bileşenleri, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitelerinin yanı sıra kanser hücre yüzeylerindeki spesifik reseptör ve iyon kanallarıyla etkileşime girerek anti-tümör etkinlik gösterirler. [4].

Meme kanseri, 40-55 yaş arası kadınlar arasında görülen en yaygın kanserlerden biridir. Yaygın tedaviler cerrahi, kemoterapi, immünoterapi veya radyoterapi olmakla birlikte bu tedaviler olumsuz etkiler de meydana getirmektedir. Bu nedenle, daha etkili ve seçici anti kanser ilaçları bulma konusu ön plana çıkmaktadır. Özellikle akrep zehirleri, öncelikle meme kanseri olmak üzere diğer kanser türlerinde de tedavi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır [5]. Bu tez çalışmasında *A. crassicauda* akrep türünün ham zehrinin MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında apoptoz ve hücre canlılığına etkisi incelenerek gen (*CASPASE-3*, *P21*, *P53*, *NOXA*, *PUMA*, *BCL-2* ve *BCL-XL*) ekspresyonu düzeyinde meydana gelen değişimleri ortaya koymak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Arachnida ve Akrep

Arachnidalar, *Arthropoda* şubesine ait olup yaklaşık 70.000 tür içeren eklembacaklılar sınıfıdır. *Acari* (akarlar, chiggers ve keneler), *Amblypygi* (kuyruksuz kırbaç akrepleri), *Araneae* (örümcekler), *Opiliones* (uzun bacaklılar), *Palpigradi* (palpigrades), *Pseudoscorpiones* (sahte akrepler), *Ricinulei* (risinuleidler), *Schizomida* (mikro kırbaç akrepleri veya şizomidleri), *Scorpionida* (akrepler), *Solpugida* (rüzgar akrepleri veya solifugidler) ve *Uropygi* (kırbaç akrepleri ve sirke) olmak üzere 11 alt türe ayrılmıştır. Bazı akarlar ve suda yaşayabilen birkaç örümcek dışında çoğu tür karada yaşamaktadır. Karasal yaşama uyum sağlamak için solunum amacıyla trakelerini veya kitap akciğer olarak adlandırılan modifikasyona uğramış solungaç benzeri yapıları kullanırlar. Böceklerden farklı olarak yetişkin arachnidaların sekiz bacağı bulunur. *Arachnida* türlerinden örümcekler ve akrepler genellikle zehirlidir [6].

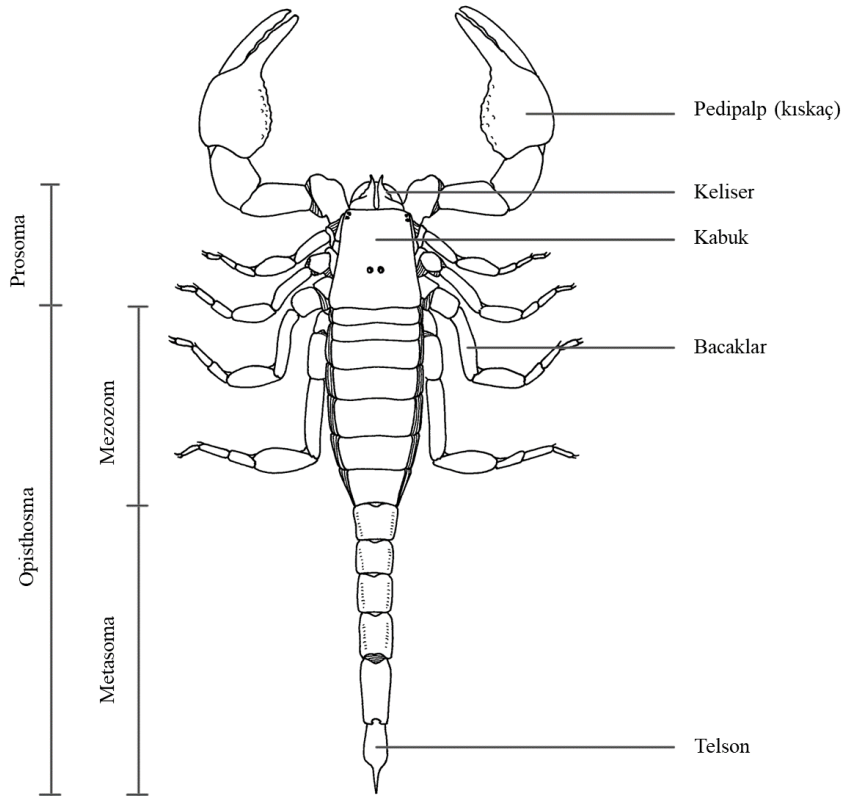
2.1.1. Akreplerin Genel Özellikleri

Akrepler, *Scorpiones* takımının yırtıcı *Arachnida* türlerinden biridir. Vücutlarının arkasında zehirli bir iğne ve ön tarafta bir çift kavrama kısıpacı ile bölümlenmiş kavisli bir kuyruğa sahiptir. Sekiz bacağı ve kavrama pedipalleri bulunur. Akreplerin büyüklüğü 9 mm (*Typhlochactas mitchelli*) ve 23 cm (*Heterometrus swammerdami*) arasında değişmektedir. Dünya'da yaklaşık 1750 tür akrep bulunmakla birlikte bu türlerden 25 tür insanı öldürebilecek kadar zehirlidir [7].

Antarktika ve Yeni Zelanda hariç tüm karasal habitatlarda bulunur. Çöllerde ve diğer kurak bölgelerde bulunan akrepler çoğunlukla sarımsı veya açık kahve renktedir, nemli ve dağ habitatlarında bulunanlar ise kahverengi veya siyah renktedir. Gün boyunca yuvalarının sınırlarında, taşlık bölgelerde veya kayaların altında saklanırlar. Genellikle gece aktif halde bulunurlar. Akrepler, kütiküllerindeki floresan varlığına bağlı olarak ultraviyole ışık altında mavi-yeşil renkte parlar [8].

2.1.2. Akrelerin Morfolojisi

Akrelerin en belirgin özellikleri vücutlarının arkasında bulunan kavisli uzun ince bir kuyruk ve zehiri enjekte etmek için kullanılan kuyruğun ucundaki stingerdir. Akrelerin gövdesi baş-göğüs (cephalothorax) ve karın (abdomen) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Karın kısmı ise mezozom (preabdomen) adı verilen ön karın ve metasoma (postabdomen) adı verilen kuyruk kısmına ayrılır. Preabdomen, yedi segmentten oluşur ve cephalothoraxa bağlanır. Cephalothorax gözleri, ağzı ve pedipalp adı verilen akrelere özgü olan pençelerden oluşur. Pedipalpler, avı yakalamak için kullanılan ek uzantılardır [9]. Mezozom, üreme, solunum ve diğer organları içeren segmentlerden oluşur ve yüzeylere tırmanmayı sağlayan 4 çift tırnaklı ayak içerir. Arachnidalar sınıfına ait olan akreler, sekiz bacağına sahip olup kanat ve antenleri yoktur. Metasoma akrebin kuyruk kısmını oluşturan kısımdır. Telson adı verilen bir çift zehirli salgı bezi ve zehiri avına enjekte etmesini sağlayan bir stinger içerir. Dış iskeletleri kitinden, polisakkaritten ve azottan meydana gelen sağlam ve koruyucu bir yapıya sahiptir (Şekil 2.1) [10].



Şekil 2.1 Akrelerin morfolojik yapısı [11]

2.1.3. Akreplerin Taksonomisi

Akrepler, hayvanlar aleminin *Arthropoda* şubesi, *Chelicerata* altşubesi, *Arachnida* sınıfının *Scorpiones* takımında yer alan eklem bacaklılardır (Çizelge 2.1). 18 familya ve yaklaşık 1500 tanımlanmış tür ve alt tür olduğu bilinmektedir. Akrepler, *Buthida* ve *Lurida* olmak üzere iki tane aynı soydan gelen gruplara ayrılmaktadır. İnsanlar için en tehlikeli akrepler, *Buthidae* familyasına ait olup 82 cins ve 756 türden oluşmaktadır. *Buthiade* familyasından yaklaşık 20 tür insanlar için öldürücü özelliktedir [12].

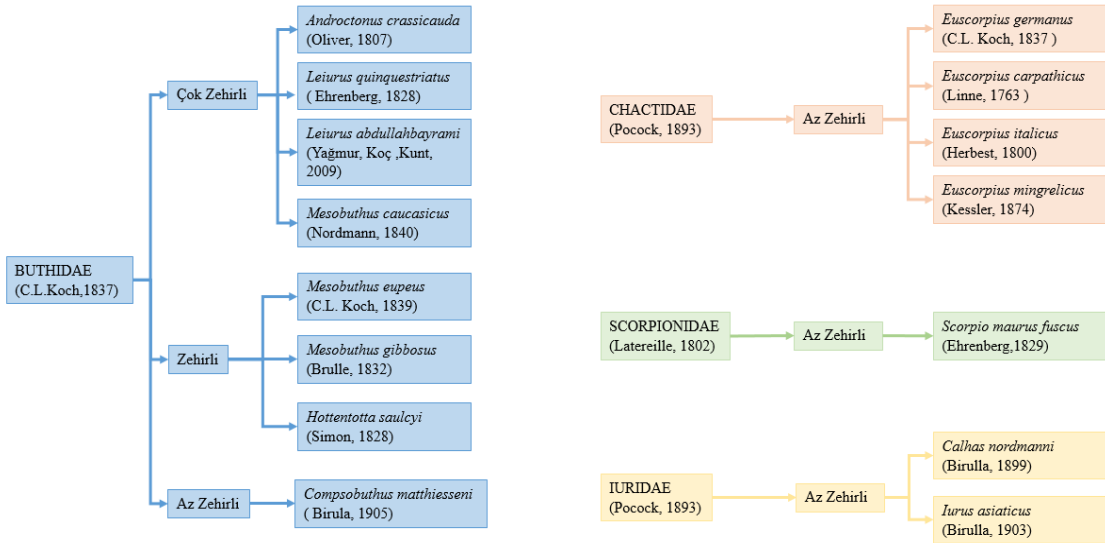
Çizelge 2.1. Akrep sistematigi

Üst Alem	<i>Eukaryota</i>
Alem	<i>Animalia</i>
Şube	<i>Arthropoda</i>
Alt Şube	<i>Chelicerata</i>
Sınıf	<i>Arachnida</i>
Takım	<i>Scorpiones</i>
	<i>Pseudochactoidea</i>
	<i>Buthidea</i>
Üst Familyalar	<i>Chaeriloidea</i>
	<i>Chactoidea</i>
	<i>Iuroidea</i>
	<i>Scorpionoidea</i>

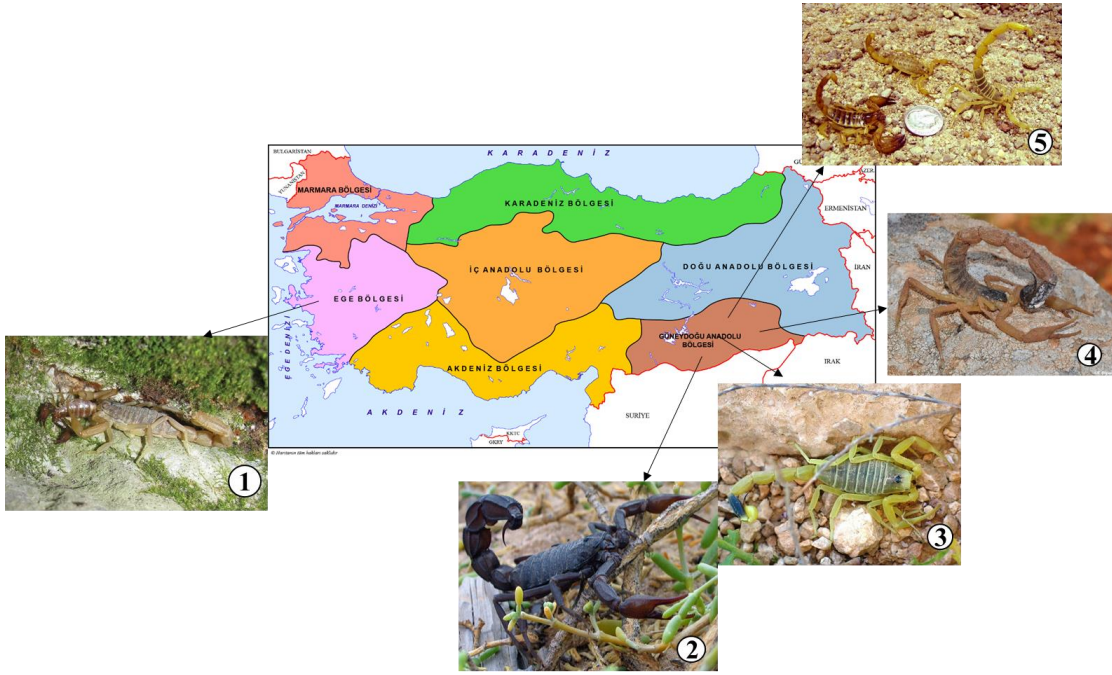
2.1.4. Türkiye'deki Akrep Türleri

Türkiye'de *Buthidae*, *Chacthidae*, *Scorpionidae* ve *Iuriadae* ait 8 soy ve 13 tür bulunmaktadır. Bugüne kadar *Buthidae* ailesinden 73 soy ve 529 türün tespiti yapılmıştır. Ülkemizde ise 4 soya ait 6 türü bulunmaktadır. Medikal öneme sahip olan bu ailenin türleri genellikle tropikal bölgelerde yaşar. Türlerin çoğu siyah, sarı ve kahve renklidir. *Buthidae* ailesinde yer alan soylar *Buthus*, *Parabuthus*, *Mesobuthus*, *Tityus*, *Leiuris*, *Androctonus*, *Centruroides*'tir. Ülkemizde bulunan tıbbi açıdan önemli türleri ise

Androctonus crassicauda, *Leiurus quinquestriatus*, *Leiurus abduallahbayrami*, *Mesobuthus gibbous*, *Mesobuthus eupeus*'dur. *Leiurus abduallahbayrami* Türkiye'de bulunan en zehirli ve ölümcül birinci akreptir. *Androctonus crassicauda* ise Türkiye'de bulunan en zehirli ve ölümcül ikinci akreptir (Şekil 2.2). En çok görüldükleri yerler Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgeleridir (Şekil 2.3). *Chactidae* ailesine ait bugüne kadar 11 soy ve 131 tür tayini yapılmıştır. Ülkemizde bulunan türleri *Euscorpius germanus*, *Euscorpius carpathicus*, *Euscorpius italicus*, *Euscorpius mingrelicus*'dur. Ege, Karadeniz ve Akdeniz bölgelerinde görülmektedir. *Scorpionidae* ailesine ait ise 9 soy ve 133 tür tayini yapılmıştır. En büyük akrep türü olan *Pandinus impertor-Heterometrus swammer dami* bu ailenin içinde yer almaktadır. Bu aileye ait ülkemizde bulunan tür *Scorpio maurus fuscus*' tur. Çoğunlukla Güney Doğu Anadolu ve Adana, Hatay taraflarında görülmektedir. *Iuriadae* ailesine ait 6 soy ve 21 tür tayini yapılmıştır. Bu aileye ait ülkemizde bulunan türler *Calhas nordmanni* ve *Iurus asiaticus*'dur. Kuzey Doğu Anadolu, Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde görülmektedir [13].



Şekil 2.2. Türkiye'de bulunan akreplerin zehirlilik durumları.



Şekil 2.3. Türkiye’de bulunan tehlikeli akrep türlerinin coğrafik dağılımları: 1. *Mesobuthus gibbosus* (Muğla, Türkiye), 2. *Androctonus crassicauda* (Şanlıurfa, Türkiye), 3. *Leiurus abduallahbayrami* (Gaziantep, Türkiye), 4. *Hottentotta saulcyi* (Mardin, Türkiye), 5. *Mesobuthus eupeus* (Diyarbakır, Türkiye)

2.1.5. *Androctonus Crassicauda* Türünün Genel Özellikleri

Androctonus crassicauda, Türkiye’de kara akrep olarak da bilinen bir akrep türüdür. *Buthidae* familyasına ait olan bu tür 9 ila 10 cm uzunluğunda siyah ve koyu kahve renklidir. Kıskaçları ince yapıda, kuyruğu kalın, kıvrımlı ve pedipalpleri ince ve uzundur (Şekil 2.4). En çok Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgesi olmakla beraber özellikle Elazığ, Diyarbakır, Şanlıurfa, Mardin illerinde görülmektedir. Dünya’da ise Orta Doğu ve Kuzey Afrika gibi kurak bölgelerde bulunduğu tespit edilmiştir. Sıcak ve kurak bölgelerde, taş altlarında, ev ve ahır gibi insana yakın yerlerde yaşarlar. Genellikle akşam karanlığından sonra ortaya çıkarlar. Dünyadaki en tehlikeli 25 akrep türünden biridir [13].



Şekil 2.4. *Androctonus crassicauda* türü akrep görüntüsü [14]

Ülkemizde ölümcül derecede zehirli olan ikinci akrep türüdür. Bu türün sokması sonucu sokulan bölgede şiddetli ağrı ve his kaybı meydana gelirken hipertansiyona neden olduğu bildirilmiştir [15]. Çocuklarda ve bebeklerde sokmanın etkisiyle merkezi sinir sisteminin etkilendiği ortaya konulmuştur. Ancak bunların yanında tıbbi yönden en önemli türlerden biri olduğu bilinmektedir. Akrep sokmasının zehirlenmelere neden olması dolayısıyla mortaliteye kadar götürebilecek düzeyde etkisi bulunmaktadır. Bir diğer açıdan ise terapötik etkisi sebebiyle tedavi amaçlı kullanılma potansiyeli vardır. Deneysel çalışmalarda kullanılıp biyolojik olarak nasıl bir aktivite gösterdiği anlaşılmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmalar neticesinde akrep zehirlerinin bileşenlerinin kanser hücreleri üzerinde anti-tümör etkinlik gösterebildikleri belirtilmiştir [4].

Androctonus crassicauda akrep türünün ülkemize özgü olan türü 2021 yılının Ekim ayında yeniden tanımlanmış ve Şanlıurfa bölgesindeki türün adı *Androctonus turkiyensis* olarak değiştirilmiştir [16].

2.2. Toksinler

Toksinler, savunma ve avlanma amacıyla bitkiler, hayvanlar veya mikroplar tarafından geliştirilmiş olan biyolojik moleküllerdir. Toksinler peptit ve peptit olmayan toksinler olarak iki gruba ayrılır ve peptit olmayan toksinler genellikle gıda kaynaklı toksinlerdir. Peptit ve peptit olmayan toksinler, hücre içerisinde sodyum kanallarını inhibe ederek etkilerini gösterirler. Gıda kaynaklı peptit olmayan toksinler genellikle protein fosfatazlara ve sodyum kanallarına tesir etmeleriyle bilinmelerine rağmen bazı toksinler

de sodyum kanallarını aktive edebilirler. Zehirli bir deniz yosunu türü olan dinoflagellat kaynaklı ciguatoksinler ve brevetoksinler, voltaja duyarlı sodyum kanallarını aktive ederken kabuklu deniz hayvanı zehirlerinin protein fosfatazları ve paralitik kabuklu deniz hayvanı zehirlerinin ise sodyum kanallarını inhibe ettiği bildirilmiştir [17]. Kirpi balığı ve yengeçler tetrodotoksin adı verilen ölümcül sodyum kanalı inhibitörlerini biriktirebilirler. Bazı kurbağaların ise batrakotoksin ve epibatidin gibi alkaloidleri beslenmeleri ile vücutlarında biriktirdikleri kanıtlanmıştır [18, 19]. Bu toksinlerin birçoğunun potansiyel terapötik ajan olarak kullanıldığı bilinmektedir. Epibatidin ve analogları, omurilikte nöradrenalin salımını uyaran bazı asetilkolin reseptörlerini aktive ederek güçlü bir antinosisepsiyon üretiminde rol oynamaktadır [20]. Peptid toksinleri ise hayvan zehirleri olarak bilinen venomların yapısında bulunan ve oldukça kompleks peptitler içeren bileşiklerdir.

2.2.1. Biyotoksinler ve Venomlar

Biyotoksinler bakteri, alg, mantar, bitki, balık ve hayvan gibi canlı bir organizma tarafından üretilmiş, insan ve hayvan dokusuna girdikleri anda bulaşıcı olmayan ancak dokuda toksik etki gösteren zehirli maddelerdir. Biyotoksinlerden bazıları, biyoteknolojide ve ilaç endüstrisinde biyokimyasal ajan olarak kullanılmıştır [21]. Ham zehirlerin birçoğu biyoaktif olan çeşitli ve farklı moleküller içerir. Zehirlerinde peptit olan türler içerisinde en bilindik olanları; koni salyangozları, örümcekler, yılanlar, deniz anemonları ve akrelerdir. Bu peptitlerden nikotinik asetilkolin reseptörleri, nöradrenalin taşıyıcı, Na⁺ kanalları, Ca²⁺ kanalları, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü ve nörotensin reseptörlerinin iyon kanalları ve ağrı sinyal yolları ile bağlantılı reseptörler için seçici oldukları bulunmuştur [20]. Hayvan zehiri olarak da bilinen venomlar, bir hayvanın başka bir canlıya zarar vermek için kendi vücudunda ürettiği bir veya birden fazla toksin içeren salgılardır. İçerdikleri toksin türüne göre farklı biyolojik etkilere sebep olurlar. Bunlar; bir tür nekrotoksin olan yılan zehirlerinde bulunan fosfolipazların nekroza neden olması, zehirlerinde nörotoksin içeren örümcek, akrep, denizanası, koni kabuklu salyangoz ve mavi ahtapotların iyon kanallarının etkinliğini bozması, miyotoksin içeren çingiraklı yılan ve kertenkele zehirlerinin kaslara zarar vermesi, bal arısında ve kara dul örümceğinin zehrinde bulunan sitotoksinlerin direk hücrelere etki etmesidir [22].

2.2.2. Akrep Zehiri ve Bileşenleri

Akrep zehirleri farklı peptit ve proteinlerin karışımından oluşan kompleks bileşiklerdir. Yapılan proteomik ve transkriptomik çalışmalar sonucunda her bir akrep türündeki zehirin boyut olarak 1 ve 9 kDa arasında değiştiği ve 100'den fazla peptit içerdiği ortaya konulmuştur [23]. Akrep zehirlerinin içeriğinde inorganik tuzlar, serbest amino asitler, heterosiklik bileşikler, peptitler ve proteinlerin yanında avlarını yakalamak için kullandıkları enzimler bulunur [24]. Akrep zehiri, farklı iyon kanallarına etki ederek membran proteinlerin etkileşmelerine neden olan zengin bir peptit toksini kaynağıdır. Akrep zehirleri içeriğindeki peptit boyutlarına göre; uzun zincirli toksinler ve kısa zincirli toksinler, disülfid köprüsüne sahip olmalarına göre; disülfid köprülü peptitler (DBPs) ve disülfid köprülü olmayan peptitler (NDBPs) olmak üzere iki çeşit peptit toksinlerinden oluşmaktadır. Bu peptit toksinleri sodyum, potasyum, klorür ve kalsiyum için iyon kanalı membran proteinlerini algılar ve bunlarla spesifik bir etkileşime girer [25].

Disülfid köprülü peptitler (DBPs); membrana bağlı iyon kanallarını hedefleyen nörotoksik etkilerden sorumlu akrep zehri bileşenleridir. DBP içeren akreplerin çoğunda 3-4 disülfid köprüsü bulunmaktadır ve etkileşime girdikleri membran kanal tipine göre Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Cl^- olmak üzere 4 alt gruba ayrılmaktadır. Bu kanallar, memelilerde hücresel fizyolojinin işleyişinde rol oynarlar. Akrep zehir peptitleri ile bu kanalların etkileşmesi durumunda kanalların işleyişi bozulur ve akrep zehirlenmelerine bağlı çeşitli semptomlar ortaya çıkarması görülür [26].

Sodyum kanalına etki eden toksinler (NaTx), genellikle 4 disülfid köprüsüne sahip 55-76 aminoasit kalıntısı uzunluğuna sahip moleküllerdir. Voltaj kapılı sodyum kanallarıyla etkileşimlerine bağlı olarak α -NaTx ve β -NaTx olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Memelilerde ve böceklerde akrep toksinleri farklı alt tiplerde incelenebilirler. α -NaTx, sodyum iyon kanallarının 3. bölgesini durdurur ve kanalların inaktivasyonunu engelleyerek aksiyon potansiyellerini uzatır. β -NaTx ise sodyum kanallarının 4. bölgesi ile etkileşerek kanalların aktivasyon voltajını daha negatif bir potansiyele kaydırarak kanalın inaktive olmasına neden olur [27].

Potasyum kanalına etki eden toksinler (KTx), 3 veya 4 disülfid köprüsüne sahip 23-64 aminoasit kalıntısı uzunluğunda peptitlerden oluşur. Potasyum kanallarının hücre dışı yüzeylerine bağlanarak iyonların geçişini engellerler. KTx'ler; α , β , γ , κ , δ , λ ve ϵ -KTx gibi alt gruplara ayrılarak incelenmektedir. Bu alt gruplar da farklı peptit uzunluklarına ve sarmal/katman yapılarına sahip olup olmadıklarına göre isimlendirilir. Bu toksinler

aynı zamanda kısa zincirli akrep toksinleri olarak da bilinmektedir [28]. γ -KTx, genellikle *Centruroides*, *Mesobuthus* ve *Buthus* cinslerinde bulunur ve hERG kanallarını inhibe ederek kalp kası hücrelerinin elektriksel aktivitesinin bozulmasına neden olur [29].

Kalsiyum kanalına etki eden toksinler (CaTx), sinir terminallerindeki Ca^{2+} akışını etkileyerek nörotransmitterlerin salınımını bloke eder. 33-36 amino asit uzunluğunda olup 2-3 disülfid köprüsü içerirler. Kalsiyum kanalına etki eden toksinlerden özellikle ryanodin reseptörleri (RyR), akrep zehirlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Ryanodin reseptörleri kas kasılmasında hücre içinden Ca^{2+} salınımına aracılık eden ve endoplazmik retikulumda bulunan kalsiyum kanallarıdır. CaTx'ler; kalsinler, liotoksinler ve omegaskorpinler olmak üzere üç alt kategoride incelenebilir. Kalsinler, [3H]-ryanodinin RyR1'e bağlanmasını artırarak sarkoplazmik retikulum veziküllerinden hızlı bir Ca^{2+} salınımını tetikleyebilirler. Liotoksinler, ryanodin reseptörleri (RyR1 ve RyR2) üzerinde kalsinlere benzer etkilere sahip olan insektisidal toksinlerdir [30]. Romero-Gutierrez ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Thorellius atrox* türünün zehirinin transkriptomik araştırmalar sonucunda CaTx dizilerine benzer özellikte olduğu ortaya konulmuştur [31]. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar neticesinde omegaskorpinler akrep zehirlerinden izole edilmemiştir, bu peptitlerin aktivitesi henüz deneysel olarak belirlenmemiştir [30].

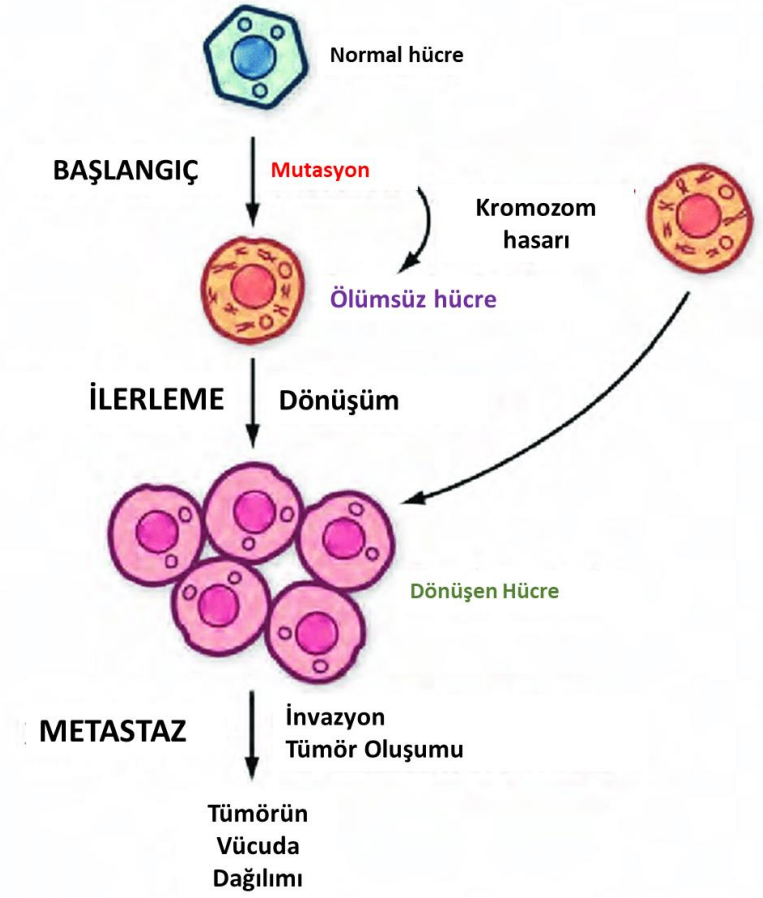
Klor kanallarına etki eden toksinler (ClTx), hücre yüzeyindeki Cl^- akışını azaltan peptitlerdir. Klor kanalları, hücre hacminin düzenlenmesi, düz kas kasılması, hücre içi organellerin asidifikasyonu ve epitel sıvıların salgılanması gibi hücreysel olaylarda etkili kanallardır. Klorotoksinler (ClTx), diğer akrep peptitlerinin aksine kan-beyin bariyerini geçebilirler. Klorotoksinlerin bazı türevleri FDA onayına sahiptir ve glioma tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır [32].

Disülfid köprüsü olmayan peptitler (NDBPs); heterojen bir yapıya sahip, küçük, yaklaşık olarak 13-56 amino asit uzunluğunda olan peptitlerdir. Bu peptitlerin çoğu katyonik moleküllerdir. Sulu çözeltilerde sarmal bir konformasyon gösterirler. Herhangi bir spesifik moleküler hedefleri yoktur. NDBP'ler, anti-mikrobiyal, anti-kanser, hemolitik, anti-inflamatuar ve immün düzenleyici gibi etkilere sahiptir [26].

2.3. Kanser

Kanser genetik veya çevresel faktörlerin hücre genomunda ard arda mutasyon meydana getirmesi ve bu mutasyonların zamanla birikmesi sonucu ortaya çıkan bir patolojidir. Yapılan çalışmalar sonucunda insan genomunda protein kodlayan yaklaşık 22.000 genin

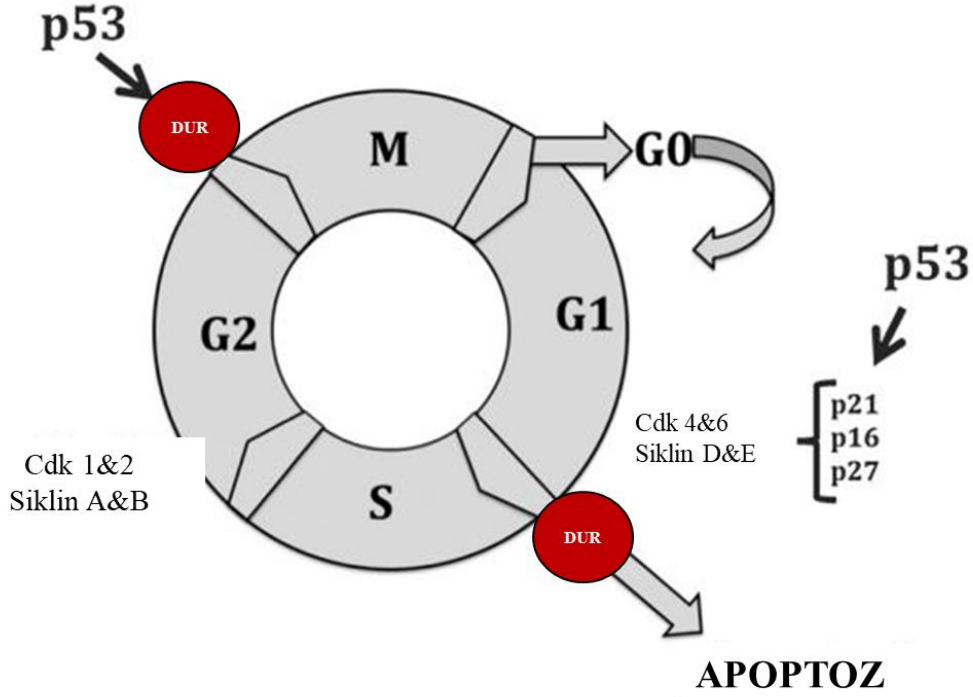
350'sinde kansere yol açan somatik mutasyonların olduğu görülmüştür. Kanser hücreleri normal hücrelerin aksine programlı hücre ölümünden kaçarlar. Böylece sınırsız çoğalma yeteneği elde ederler. Aynı zamanda kendi çoğalma sinyallerini oluşturup, büyümeyi baskılayan sinyallere karşı da duyarsız hale gelirler. Anjiyogenez adı verilen mevcut kan damarlarından yeni kapiller damar oluşumu, doku invazyonu ve metastaz yaparlar (Şekil 2.5). Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesine, yeni oluşan kanser hücrelerinin bağışıklık hücreleri tarafından tanınıp yok edilememeleri neden olur [33].



Şekil 2.5. Kanser oluşumu [34]

Hücre döngüsünü kontrol eden herhangi bir gen üzerinde meydana gelen mutasyon da kanser gelişimine katkıda bulunabilir. Hücre döngüsü kontrol noktalarında (G1/S veya G2/M) bir mutasyon oluşumu hücrenin DNA hasarını onaramamasını dolayısıyla büyümeye ve bölünmeye devam etmesine neden olarak hücrelerin tümörlere dönüşmesine yol açabilir. Hücre döngüsünü kontrol eden siklinleri kodlayan genlerde meydana gelen bir bozukluk da döngünün yanlış işleyişine ve kanser gelişimine neden olur

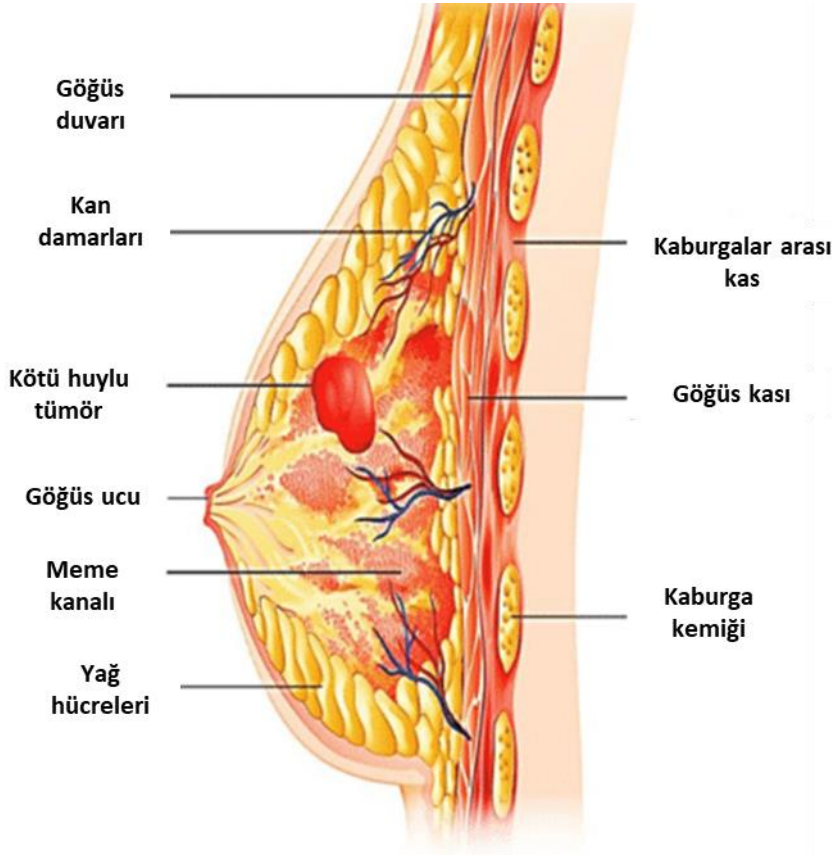
(Şekil 2.6). Kanser oluşumunda hücre döngüsünün işleyişini değiştiren 2 tip gen grubu etkilidir. Bunlar; Onkogenler (*Her2, Neu, Ras, Myc*) ve Tümör baskılayıcı genlerdir (*p53, Rb*). Onkogenler, kanser hücrelerinin büyümesini teşvik ederek doğrudan veya dolaylı olarak etki gösterirken, tümör baskılayıcı genler sağlıklı hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünü baskılamaktadır [35].



Şekil 2.6. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları [36]

2.3.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, akciğer ve kolon kanserinden sonra dünya genelinde en sık görülen 3. kanser türüdür. 2012 yılında yaklaşık 1,7 milyon kişiye meme kanseri teşhisi konulmuş ve bu kişilerin yarım milyona yakını hayatını kaybetmiştir [37]. Meme kanseri kadınlarda yaygın olarak görülen bir malignitedir ve moleküler düzeyde oldukça heterojen bir hastalıktır (Şekil 2.7). Tedavi ve prognoz hastalar arası büyük farklılıklar gösterebilir. Hastalığın derecesi; tümörün büyüklüğüne, lenf nodu tutulumuna, tümörün östrojen (ER) ve progesteron reseptörü (PgR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) durumuna bağlıdır.



Şekil 2.7. Meme anatomisi ve meme kanseri [38]

Hastalığın prognozu meme kanseri alt tiplerine göre değişmektedir. Bu alt tiplerin belirlenmesi ise genlerin ekspresyon profillerinin incelenmesi ile açığa çıkarılmıştır. Alt tiplerin bulunması hastalığın tedavi stratejilerini belirlemiş ve tümöre özgü tedavinin olması gerektiğini ortaya koymuştur [39].

Bu alt tipler 4'e ayrılmaktadır:

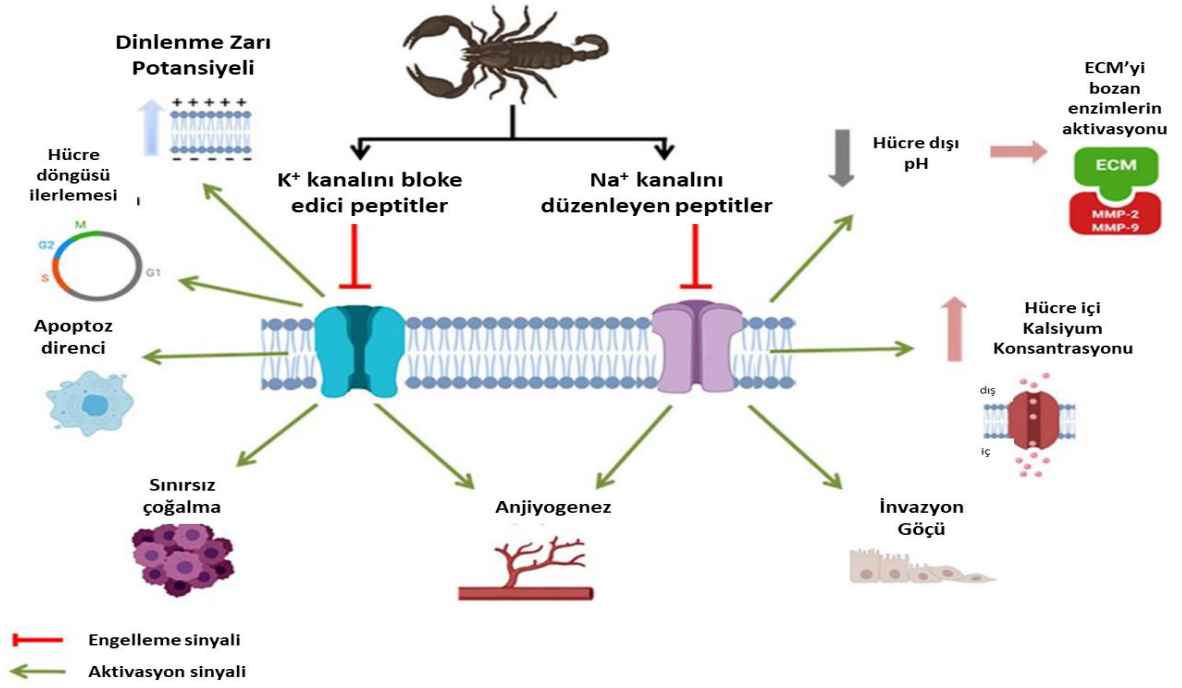
1. Östrojen hormonuna duyarlı tümörler (Luminal-A): HR+/ HER2- olarak ifade edilir. Tüm meme kanserlerinin %73'ünü oluşturmaktadır. En iyi hastalık seyrine sahip olan meme kanseri çeşididir.
2. Östrojen hormonuna duyarlı ve HER2 reseptörü taşıyan tümörler (Luminal-B): HR+/HER2+ olarak ifade edilir. Tüm meme kanserlerinin %10'unu oluşturmaktadır. Hormon reseptörü pozitif olmasına rağmen, Luminal A'ya göre daha agresif özelliklere sahiptir.

3. Östrojen hormonuna duyarsız HER2 reseptörü taşıyan tümörler (HER2-pozitif): HR-/HER2+ olarak ifade edilir. Tüm meme kanserlerinin %5'ini oluşturmaktadır. Meme kanserlerinin en seyrek görülen çeşididir.
4. Östrojen hormonu ve HER2 reseptörü taşımayan tümörler (Üçlü Negatif): HR-/HER2- olarak ifade edilir. Tüm meme kanserlerinin %13'ünü oluşturmaktadır. Agresif hastalık seyrine sahip olan meme kanseri çeşididir. Hücreler hızlı çoğalma eğiliminde olduğu için kemoterapiye daha duyarlıdır.

Üçlü negatif meme kanserleri, diğer meme kanseri türlerinden daha hızlı büyür ve yayılır. Luminal A, B ve HER2 ile zenginleştirilmiş alt tipi olan hastalar hedefe yönelik tedaviye duyarlı iken, üçlü negatif meme kanserine sahip hastalar kötü prognoz gösterirler. Üçlü negatif meme kanseri, doksorubisin, siklofoamid ve paklitaksel kombinasyonu ile tedavi edilir. İmmünoterapiler ve hedefe yönelik tedavilerle ilgili klinik çalışmalar hala devam etmektedir. Bu kanser türü endokrin reseptörüne sahip olmadığı için endokrin tedavisi yapılamamaktadır. Bu da bu alt tipin tedavisini zorlaştırmaktadır. Bunun için yeni tedavi stratejileri bulunması önem arz etmektedir [40].

2.3.2. Akrep Zehirinin İyon Kanalları Aracılığıyla Kansere Etkisi

İyon kanalları farklı dokularda aşırı eksprese edildiklerinden ve aktiviteleri dolayısıyla proliferasyon, tümör progresyonu, anjiyogenez, metastaz ve apoptoz ile bağlantılı olduğundan kanser araştırmalarında yeni terapötik hedef olarak kabul edilmişlerdir. Farklı iyon kanalı aileleri, farklı histolojik kökenlerle bağlantılı kanserlerle, kanser başlangıcı ve ilerlemesinin belirli aşamalarıyla ilişkilendirilmiştir [41]. Voltaja bağlı sodyum ve potasyum kanalları akrep zehirinin avı yakalama ve kendini savunmadaki ana hedeflerinden biridir. Bu kanallar aynı zamanda kanserle de yakından ilişkilidir. Voltaj kapılı potasyum kanalları (VGKC), hücre proliferasyonu, hücre döngüsüne geçiş, kanserin ilerlemesi ve apoptozda rol oynarken; voltaja bağlı sodyum kanalları (VGSC), hücre dışındaki pH'n düşmesine neden olarak kanser hücrelerinin göçünü ve istilasını artırır. Bununla birlikte, VGKC ve VGSC membran potansiyelini ve metastaz, invazyon ve proliferasyon gibi süreçlerle ilişkili olan Ca^{+2} kanal akışını düzenleyerek voltaja duyarlı Ca^{+2} kanal aktivitesini modüle eder. Akrep zehirleri, voltaj-kapılı Na^{+}/K^{+} kanal aktivitesini değiştiren yüksek oranda peptit toksinleri içerir (Şekil 2.8) [42].



Şekil 2.8. Kanser ile bağlantılı voltaj-kapılı Na⁺/K⁺ kanalları üzerinde akrep zehrinin etkisi [42].

Şimdiye kadar, yalnızca birkaç akrep türünün zehiri hematopoietik kanserler için anti kanser ajan olarak test edilmiştir. *B. martensii* ve *R. junceus* türleri ile fareler üzerinde toksikolojik deneyler yapılmıştır. Wang ve Ji (2005) yaptıkları bir çalışmada, *B. martensii* akrep zehrinin kemirgen ksenograft modelleri kullanılarak insan gliomu U251-MG'ye karşı anti kanser bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir [43]. Garcia-Gomez ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada *R. junceus* zehiri ile *in vivo* toksikoloji deneyleri yapılmış ve (10 mg/kg) intraperitoneal veya oral (2,000 mg/kg) yollarla uygulanan zehir sonrası toksik etkiler gözlenmemiştir [44]. Meme kanseri olan farelerle yapılan bir çalışmada, *R. junceus* zehiri (3.2 mg/kg) ardışık on doz olacak şekilde intraperitoneal yol ile farelere enjekte edilmiş ve tümör ilerlemesinde ve Ki67 ve CD31 tümör belirteçlerinde azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuç da zehirin anti kanser potansiyelini doğrulamıştır [45]. K⁺ kanallarını tanıyan peptitlerin çoğu porlardan geçişi engelleyen peptitlerdir ve bu peptitlerden bazıları kanserle bağlantılıdır. Örneğin, KAaH1 (K_v1.1 ve K_v1.3 engelleyici) ve KAaH2 (K_v1.1 engelleyici) *Androctonus australis Hector* zehirinden türetilen ve anti kanser potansiyel gösteren potasyum kanal peptitleridir. KAaH1, farklı kanser hücrelerinin adezyonunu ve göçünü engellerken, KAaH2 gliomaların çoğalmasını engellemektedir [46]. Jang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Centruroides margaritatus* akrep zehirinden izole edilen bir peptit olan margatoksinin (MgTX)

deneyisel kanser modellerinde hücre proliferasyonunu ve tümör ilerlemesini azalttığı ve pro apoptotik proteinlerin ekspresyon seviyesini artıran seçici bir $K_v1.3$ engelleyici olduğu bulunmuştur [47]. *Mesobuthus tamulus* akrebinden izole edilen bir toksin olan tapamin de SK ve $K_{Ca3.1}$ gibi kanserle alakalı bazı iyon kanallarını bloke edebilmekte ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterebilmektedir [48]. *Heterometrus fulvipes* akrebinin zehirinden izole edilen k-Hefutoxin 1 diğer voltaj-kapılı $K_v10.1$ kanallarını tanıyan ilk toksin olarak tanımlanmıştır [49].

Na^+ kanalını düzenleyen peptitler akrep zehirinden türetilen toksinler içerisinde en yüksek düzeye sahiptir. *Centruroides noxius Hoffmann* akrep zehirinden izole edilen bir β -toksin olan Cn2, nöroblastoma hücrelerinde $Na_v1.6$ aktivitesini düzenler. *In vitro* düzeyinde yapılan deneysel çalışmalarda Cn2'nin SubG1 ve G0/G1 aşamalarında proliferasyonu azalttığı ve apoptoz indüksiyonuna yol açtığı bulunmuştur [50]. *Buthus martensii*'den izole edilen AGAP, Na^+ kanallarını etkileyen bir α -toksindir. Guo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, AGAP'ın kanser hücrelerinde $Na_v\beta1$ alt biriminin translasyonunu etkilediği ve *in vivo* Ehrlich asit tümörü ve S-180 fibrosarkom modellerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu peptidin insan meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında epitel-mezenkimal geçişi (EMT), göçü ve invazyonu engelleyebildiği görülmüştür [51]. *Androctonus australis* zehirinden izole edilen AaHIV toksini de kanser hücrelerine karşı Na^+ kanalını düzenleyici bir toksindir. BenAissa ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, AaHIV'ın $Na_v1.6$ kanallarının inaktivasyon süresini uzatabildiği ve doza bağlı olarak kanser hücresi proliferasyonunu inhibe edebildiği ortaya konulmuştur (Şekil 2.9) [52].



Şekil 2.9. Akrep zehir peptitlerinin kanser hücreleri üzerine farmakolojik etkileri [53]

2.3.3. Kanser Hücrelerine Karşı Sitotoksik Akrep Toksinleri

Klorotoksin (CITx), *Leiurus quinquestriatus hebraeus* türü akrebin zehirinden izole edilen bir toksindir. Normal hücrelerde çok az bir aktivite gösterirken, gliomalarda klorür akışını engeller. CITx, tümör invazyonun rol oynayan matris metalloproteinaz 2 (MMP-2)'ye bağlanır ve klor akışını değiştirir [54].

AaCtx (*Androctonus Australis* Chlorotoxin), *Androctonus australis* akrep zehirinden izole edilen klorotoksin benzeri bir peptittir. İnsan glioma hücrelerinin göçünü engeller. Aktivitesi klorotoksine göre daha düşüktür [55].

BmKCT, *Buthus martensii Karsch* zehirinden izole edilen bir klorotoksin benzeri peptit içerir. Normal hücreler üzerinde herhangi bir etkisi olmazken, glioma hücrelerine spesifik olarak bağlanarak büyümeyi, metastazı ve proliferasyonu engeller [56].

BmK AGAP, *Buthus martensii Karsch* akrep zehirinden elde edilen antitümör-analjezik bir peptittir. İnsan ve sıçan glioma hücrelerinin çoğalmasını engeller, hücre döngüsü ilerlemesinin G1'den S fazına geçişini engelleyerek proliferasyonu inhibe eder. NF-κB

ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağında inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynayan PTX3'ün aşağı regülasyonunu artırır [51, 57].

Karibdotoksin (ChTX), *Leiurus quinquestriatus* zehirinden izole edilmiş spesifik bir kalsiyum ile aktive olan potasyum kanal engelleyici peptittir. Kanser hücrelerinin migrasyonunda doza bağlı azalmaya neden olur [58].

İberiyotoksin (IbTx), *Mesobuthus tamulus* akrep zehirinden izole edilen bir peptittir. Kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının bir engelleyicisidir. β -katenini eksprese eden meme kanseri hücrelerindeki büyümeyi azaltmıştır [59].

2.3.4. Akrep Zehirinin Etki Ettiği Kanser Türleri

Genel olarak olumsuz yönleriyle bilinen zehirler insanlarda ciddi sağlık sorunlarına neden olur. Bununla birlikte, olumsuz etkilerine rağmen farmakolojik olarak etkin bileşikler açısından da zengin bir kaynaktır. Akrep zehir toksinlerinin farklı kanser türlerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu kanser türlerinden meme kanseri, mide kanseri, karaciğer kanseri (hepatoselüler karsinom), rahim ağzı kanseri, kalın bağırsak kanseri (kolorektal kanser) ve akciğer kanseri (adenokarsinom) üzerinde akrep zehirlerinin tümör gelişimini azalttığı belirtilmiştir.

Meme kanseri kadınlarda en yaygın ve ölümcül kanserlerden biri olarak kabul edilmektedir. Akrep zehirlerinden izole edilen bazı toksinlerin meme kanseri hücrelerinde anti kanser etkiye sahip oldukları görülmüştür. Chang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, Çin kırmızı akrebinden (*Buthus martensi*) izole edilen enzimatik bir bileşik olan aynı zamanda Hiyalüronidaz olarak da bilinen BmHYA1 toksini MDA 435 hücrelerinde hyaluronanı parçalayarak apoptozu indükler. Hyaluronan, kanser hücrelerinin hücre dışı matrisinde bulunan bir polimerdir [60]. Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *Buthus mathensii* Karsch akrep zehirinin önemli bir bileşeni olan BmK toksininin MCF-7 meme kanseri hücre hattında kanser hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği ve apoptoza yönlendirdiği ortaya konmuştur. Bu çalışma neticesinde, BmK toksini potansiyel bir anti kanser ajan olarak öne çıkmıştır [61]. Çalışkan ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise, *Androctonus crassicauda* türünün zehirine özgü olan Acra1 ve Acra2 peptitlerinin Kaspaz-3 aktivitesini ve Nitrik oksit üretimini arttırdığı bulunmuştur [62]. Zargan ve arkadaşları, *Odontobuthus doriae* türünden izole ettikleri OD1 ve OdK1'in nitrik oksit üretimini arttırdığını, DNA sentezini engellediğini ve kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini belirtmişlerdir [63]. D'Suze ve arkadaşları yaptıkları bir

çalışmada, *Tityus discrepans* türüne özgü Neopladine 1 ve Neopladine 2'nin SKBR3 meme kanseri hücreleri üzerinde apoptozu indüklediğini, FasL ve Bcl-2 ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir [64].

Al-Asmari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, *Androctonus crassicauda* ve *Leiurus quinquestriatus* türünün ham zehirlerinin etkisiyle HCT-8 kolorektal kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin ve hücre döngüsünün duraklamasının artması nedeniyle kanser hücreleri apoptoza indüklenmiştir [65].

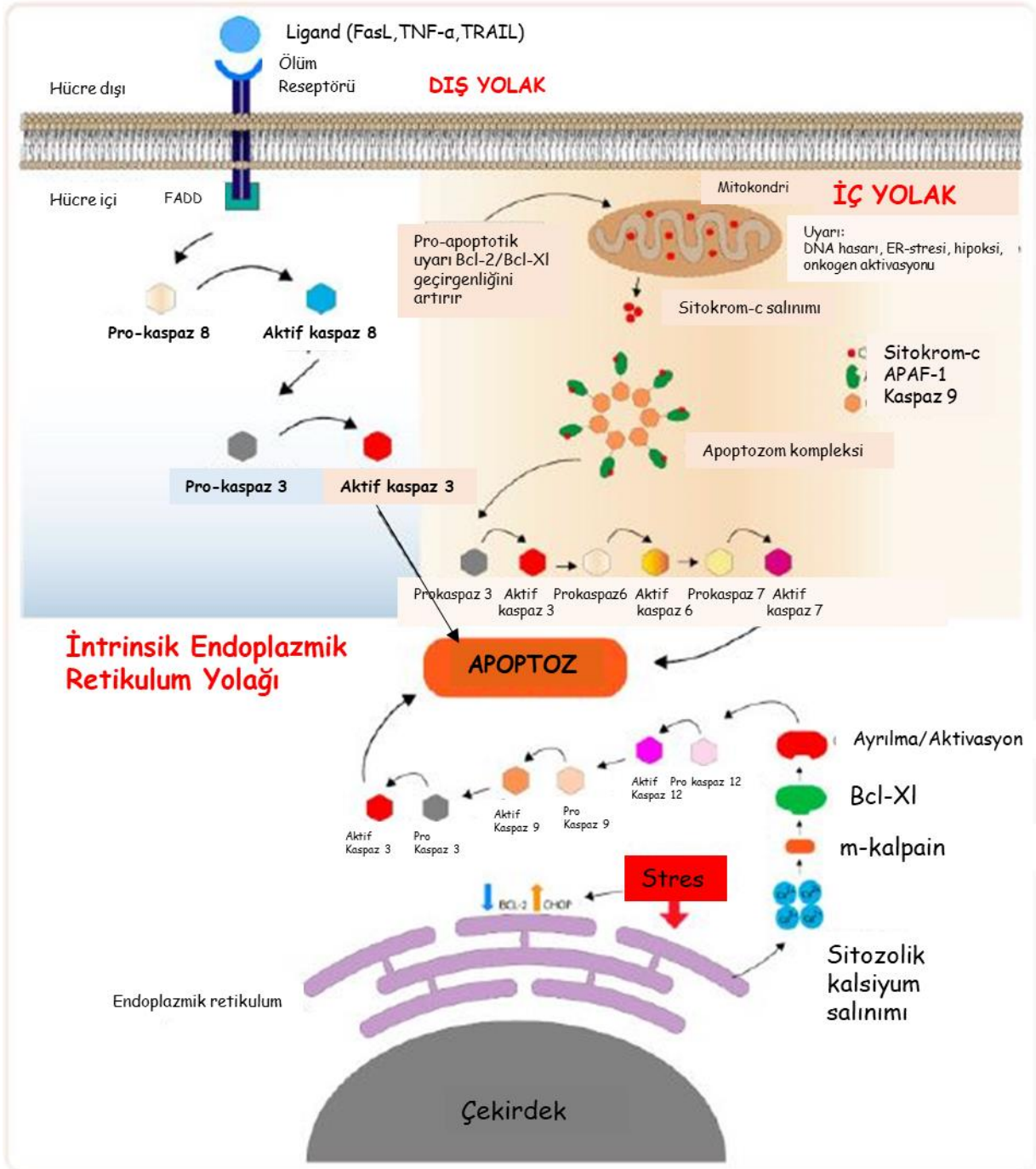
Bernardes-Oliveira ve arkadaşları, *Tityus serrulatus* türü akrep zehiriyle yaptıkları çalışmada, rahim ağzı kanser hücrelerinin (SiHa ve HeLa) zehir etkisiyle apoptoza indüklendiğini belirtmişlerdir [66].

Díaz-García ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Rhopalurus junceus* akrep zehirinin meme adenokarsinom modelinde anti tümör etki gösterdiği bulunmuştur [45].

2.4. Apoptoz

Apoptoz, programlı hücre ölümü olarak bilinen ve organizma gelişimi sırasında görülen genetik olarak düzenlenmiş fizyolojik bir süreçtir. Hücre homeostazisinin sağlanması için hücre çoğalması ve hücre ölümlerinin dengede kalması gerekir. Bu dengenin bozulması kansere, otoimmün veya dejeneratif birçok hastalığa sebep olabilir. Hücrenin apoptoz sinyali almasıyla, proteaz enzim ailesinden olan kaspazlar apoptozun erken evrelerinde salınır ve hücredeki diğer sindirim enzimlerini de harekete geçirerek apoptozun başlamasına neden olur. Apoptoz, kaspaz bağımlı üç sinyal yolu aracılığıyla tetiklenebilir (Şekil 2.10). Bunlar;

1. Ölüm Reseptörü Yolu
2. Mitokondriyal Yol
3. İntrinsik Endoplazmik Retikulum Yolu



Şekil 2.10. Apoptoz yolları (dış yolak, mitokondri yolağı ve endoplazmik retikulum yolağı) [67].

Ölümlü reseptörü sinyali, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinin üyeleri ve yağ asidi sentazı (FAS) ligand ailesinin üyeleri ilgili reseptörlerine bağlandığında hücre zarından aktive edilir. Ligand-reseptör etkileşimi ile prokaspazlar aktif kaspazlara dönüşerek apoptotik ilerlemenin başlamasını tetikler. Bu apoptotik yol, prokaspaz-3'ün aktive edilmesiyle kaspaz-8'in aktivasyonunu uyarır. Alternatif bir yol olarak da TNF- α kaspaz-2'nin

aktivasyonuna neden olan reseptör etkileşimli proteini (RIP) bağlayarak apoptozu indükleyebilir.

Mitokondriyal yol, hücre içinde meydana gelen ölüm uyarılarına bağlıdır. Bu uyarılar, DNA hasarı, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı, katlanmamış proteinlerin varlığı ve büyüme faktörü eksikliği olabilmektedir. Bu yol, zar geçirgenliğine bağlı olarak mitokondri tarafından sitoplazmaya salınan proteinler aracılığıyla gerçekleşir. Bu proteinlerden Sitokrom c, apoptoz proteaz aktive edici faktör (Apaf-1)'e bağlanarak dATP ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, kaspaz 3,6 ve 7'yi harekete geçirerek prokaspaz-9'un kaspaz 9'a dönüşümünü indükler. Mitokondriyal iç yolak, Bcl-2 ailesine ait proteinlerce düzenlenir. Bcl-2 ailesi proteinleri 2 protein grubundan oluşur:

- Pro-apoptotik proteinler: Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Hrk
- Anti-apoptotik proteinler: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1

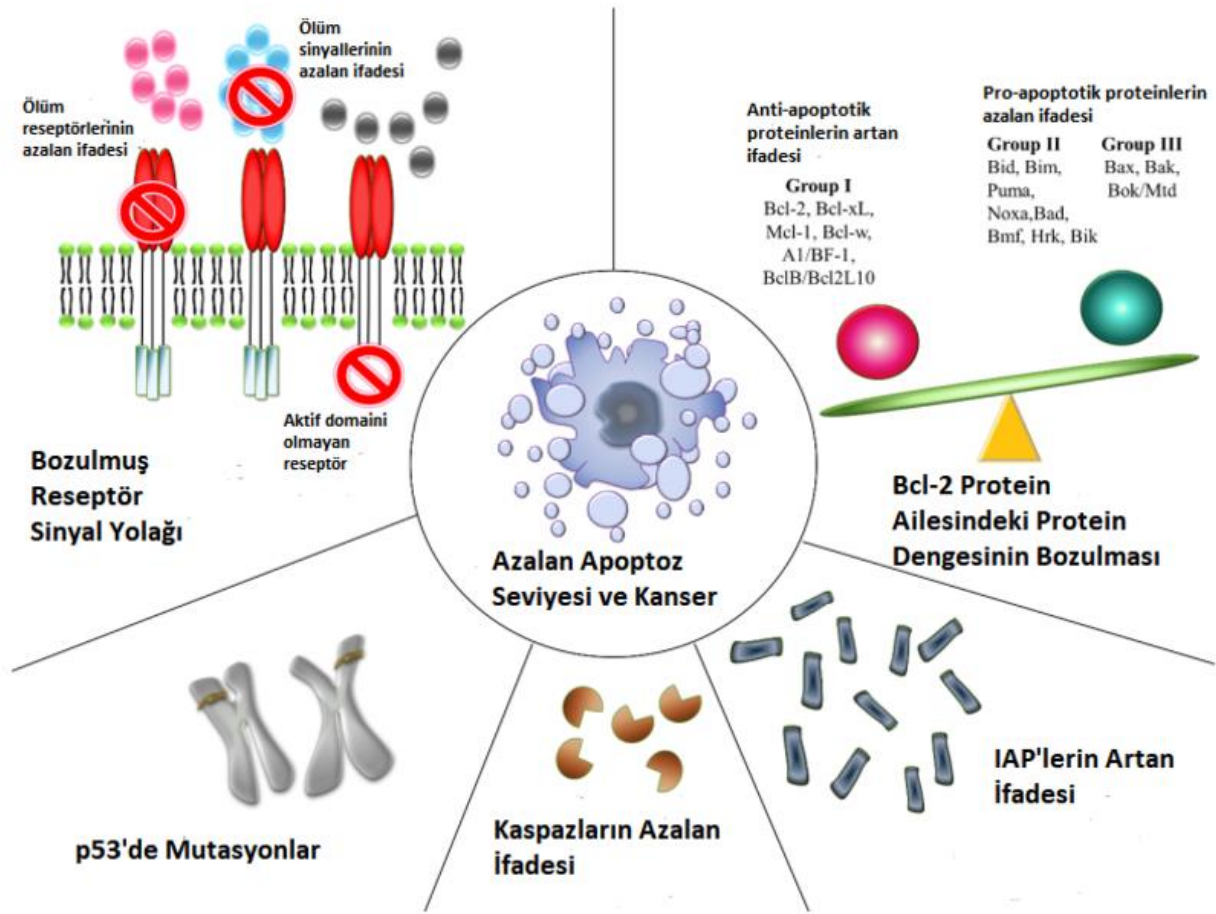
Pro-apoptotik proteinler, mitokondriden sitokrom-c salınımını indükler iken, anti-apoptotik proteinler sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu düzenler. Bu proteinler arasındaki denge apoptozun başlayıp başlamayacağını belirlemektedir.

Endoplazmik retikulum yolu, hidrofobik etkileşimler yoluyla protein kümelerinin oluşumu ile aktive edilebilir. Agregatlar, kalsiyum homeostazındaki dengesizliklerden, hipoksi, oksidatif stres veya ER'deki kontrolsüz protein artışından kaynaklanabilir. Bu durumda, ER kaspaz 12'yi uyararak apoptozu indükler ve hücre ölümünü başlatır [67].

Apoptoz ile ilişkili genlerden biri de tümör baskılayıcı bir gen olan p53'tür. Bu gen birçok kanser türü ile ilişkilidir. Apoptoz ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynar ve bu gendeki bir mutasyon apoptozda aksaklık meydana getirip kansere yol açabilir [68].

Apoptoz proteinlerinin inhibitörleri (IAPs), kaspazların endojen inhibitörleridir. Kaspazların aktif bölgelerine bağlanarak kaspaz aktivitesini engelleyebilirler. Bu proteinlerin kanserde düzensiz eksprese edildikleri bilinmektedir [69].

Apoptoz mekanizmasının düzgün çalışmaması hücre birikimine dolayısıyla karsinogeneze neden olmaktadır (Şekil 2.11). Bu mekanizmanın bozulma nedenleri; pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerdeki dengesizlik, kaspaz etkinliğinin azalması veya ölüm reseptörü sinyalindeki bir bozukluk olabilir [70].



Şekil 2.11. Apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar ve kanser bağlantısı [70].

2.4.1. Akrep Zehiri ve Apoptoz İlişkisi

Akrep zehirinin veya zehirin yapısında bulunan peptitlerin hücre çoğalmasını engelleyen etki mekanizmalarına bakıldığında, apoptozu indükleme, G0/G1 fazında duraksama ve DNA sentezinin inhibisyonu olduğu bilinmektedir. Özellikle kanser hücre hatlarında proliferasyonun azalmasının nedeni apoptotik ekspresyonun artırılarak apoptozun indüklenmesinden kaynaklanmaktadır. Apoptotik *Bax* geni, *Bax/Bcl* anti-apoptotik genlerin ekspresyonun oranı ve *Bcl* gen ekspresyonunun azalması akrep zehirinin apoptozu gen düzeyinde etkilediğini göstermektedir. Bununla birlikte, zehir *kaspaz 3, 8* ve *9* enzimlerinin aktivitesini artırarak ve Fas-L ekspresyonunu indükleyerek hücreyi apoptozu yönlendirebilir [63, 64].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Yapılan tez çalışmasında, *Androctonus crassicauda* türü akrep ham zehirinin agresif bir meme kanseri olan MDA-MB-231 hücreleri üzerinde sitotoksik ve gen ekspresyonları düzeyinde etkili olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Bu doğrultuda elde edilen verilerin, hastalığın tedavisine destek olması ve kemoterapiye alternatif tedavi yöntemleri geliştirilerek anti kanser ilaçların üretimi konusunda akrep zehrinin veya akrep zehriyle ilişkili proteinlerin ilaç araştırmalarında literatüre katkı sağlaması hedeflenmektedir. *Androctonus crassicauda* akrep türü 2021 yılında yeniden tanımlanarak *Androctonus turkiyensis* olarak kayıtlara geçmiştir.

Bu kapsamda;

- Akreplerden zehir sağlanması, zehirin liyofilizasyonu ve sulandırılması gerçekleştirilmiştir.
- Akrep zehirinin protein miktarı spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmiştir.
- Vero (böbrek epitel hücre hattı) ve MDA-MB-231 (meme kanseri hücre hattı) üzerinde zehirin nasıl bir etkisi olduğu gösterilmiştir.
- Sitotoksisite deneyleri yapılarak sağlıklı hücreler ve kanser hücrelerinde akrep zehirinin sitotoksik dozu belirlenmiştir.
- Akrep zehirinin sitotoksik dozunun kanser hücrelerini apoptoza/nekroza götürüp götürmediği gösterilmiştir
- Apoptozun hangi yolağının kullanıldığını saptamak için, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim gösterilmiştir.
- Zehir uygulaması yapılmış meme kanseri hücre hattından RNA izolasyonu yapılmıştır.
- RNA'lar izolasyonun ardından gen ekspresyonu bakılabilmesi için cDNA'ya dönüştürülmüştür.

- Pro-apoptotik ve anti-apoptotik bazı genler kullanılarak gen ekspresyonu düzeyinde zehirin herhangi bir etkisinin olup olmadığı, etkisi varsa bu etkinin hangi genler üzerinden gerçekleştiği açığa çıkarılmıştır.

3.1. Akrep Ham Zehirinin Sağılması ve Hazırlanması

Zehir, laboratuvarında canlı tutulan akrelerden Harran Üniversitesi Akrep Biyo-Ekolojik ve Moleküler Genetik Araştırma Grubu laboratuvarı araştırmacıları tarafından elektrik stimülasyonu ile çıkartılmıştır. Sağılan zehir, liyofilize edilmiş ve kullanılabileceği kadar -20 °C’de saklanmıştır. Her kullanımdan önce liyofilize haldeki zehir distile su ile sulandırılmıştır. Sulandırılan ham zehir +4 °C’de 15 dk boyunca 15000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım alınıp deneylere başlanmıştır. Zehir konsantrasyonu 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Quawell Q5000 UV) olarak ölçülmüştür.

3.2. Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Devamlılığı

Vero hücre hattı, 1962’de normal, yetişkin bir Afrika yeşil maymununun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek dokusuna ait, epitel ve adherent bir hücre hattıdır. Vero hücre hattı; Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) besiyeri içerisinde %10 FBS (Fetal Bovine Serum), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ilave edilerek üretilmiştir. %5 CO₂ içeren etüvde 37 °C’de inkübe edilmiştir. Hücreler %80-90 oranında konfluent olduklarında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Vero hücreleri için 1:4 oranında pasajlama yapılmıştır.

MDA-MB-231 hücre hattı ise 51 yaşındaki adenokarsinoma hastası olan bir kadının meme dokusundan izole edilen epitel ve adherent hücrelerdir. Bu hücreler kanser araştırmaları ve immüno-onkolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılır. MDA-MB-231 hücre hattı için; %10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. %5 CO₂ içeren etüvde 37 °C’de inkübe edilmiştir. Hücreler yüzeyi kapladıktan sonra 1:9 oranında pasajlama işlemi yapılmıştır.

Pasajlama işlemi için;

- Hücrelerin konfluent olup olmadıkları ışık mikroskobu altında kontrol edilmiş, %85’in üzerinde konfluent olan hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- İlk olarak hücre ortamındaki besiyeri dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.

- Pasajlama işlemi boyunca 25 cm²'lik ve 75 cm²'lik flasklar kullanılmıştır. 25 cm²'lik flask için 2 ml 1X DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), 75 cm²'lik flask için 6 ml 1X DPBS hücrelerin üzerine eklenip 1-2 dk beklenmiş ve ölü hücrelerden ve besiyeri artıklarından kurtulmak için 1X DPBS ortamdan dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır
- 25 cm²'lik flask için 0,5 ml %0,25 Tripsin-EDTA, 75 cm²'lik flask için 1,5 ml %0,25 Tripsin-EDTA hücrelerin üzerine eklenerek yüzeyden kalkmaları sağlanmıştır. %0,25 Tripsin-EDTA eklenen hücreler 37°C'lik etüvde 2 dk boyunca inkübe edilmiştir.
- Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra 25 cm²'lik flaska 4,5 ml DMEM (Vero hücre hattı için) veya 4,5 ml RPMI-1640 (MDA-MB-231 hücre hattı için) besiyeri ilave edilmiştir. 75 cm²'lik flask için ise 13,5 ml ml DMEM (Vero hücre hattı için) veya 13,5 ml RPMI-1640 (MDA-MB-231 hücre hattı için) besiyeri kullanılmıştır.
- Besiyerlerinin eklenmesinin ardından hücrelere pipetaj yapılmış ve homojen hale gelmeleri sağlanmıştır. Homojen hale gelen hücrelerden sonraki deney seti için gerekli miktarda hücre alınıp yeni flask içerisindeki besiyerlerine eklenmiştir.
- Deneyler süresince genellikle 25 cm²'lik flasklar kullanılmıştır. Vero hücre hattı için homojen hale gelmiş hücrelerden 1 ml alınıp 4 ml yeni besiyeri ortamı içeren flaskın üzerine eklenmiş toplam hacim 5 ml hale getirilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattı için ise 0,5 ml hücre alınıp 4,5 ml yeni besiyeri ortamı içeren flaska ilave edilerek son hacim 5 ml'ye tamamlanmıştır.
- Yeni besiyeri ortamına alınan flask içerisindeki hücreler ışık mikroskobu altında kontrol edilerek 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.3. Hücre Sayımı ve Hücrelerin Deney İçin Hazır Hale Getirilmesi

Vero hücre hattı ve MDA-MB-231 hücre hattı deneylerde kullanılmadan önce yapılacak deneye uygun şekilde hücre sayımı yapılması gerekir. Hücre sayımı, 1 ml'deki hücre sayısının Thoma lamı kullanılarak hesaplanması ile bulunur. Thoma lamında sayılan hücreler yapılan deneye göre besiyeri içerisinde süspanse edilerek hazırlanır.

- MTT testi için Vero ve MDA-MB-231 hücreleri 1,5x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir.

- Apoptoz/nekroz tayininde ve mitokondriyal membran potansiyel ölçümünde kullanılan hücreler MDA-MD-231 hücreleridir ve 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir.
- RNA izolasyonu için ise MDA-MB-231 hücreleri kullanılmış ve 10×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 24 kuyucuklu plaklara ekim gerçekleştirilmiştir.

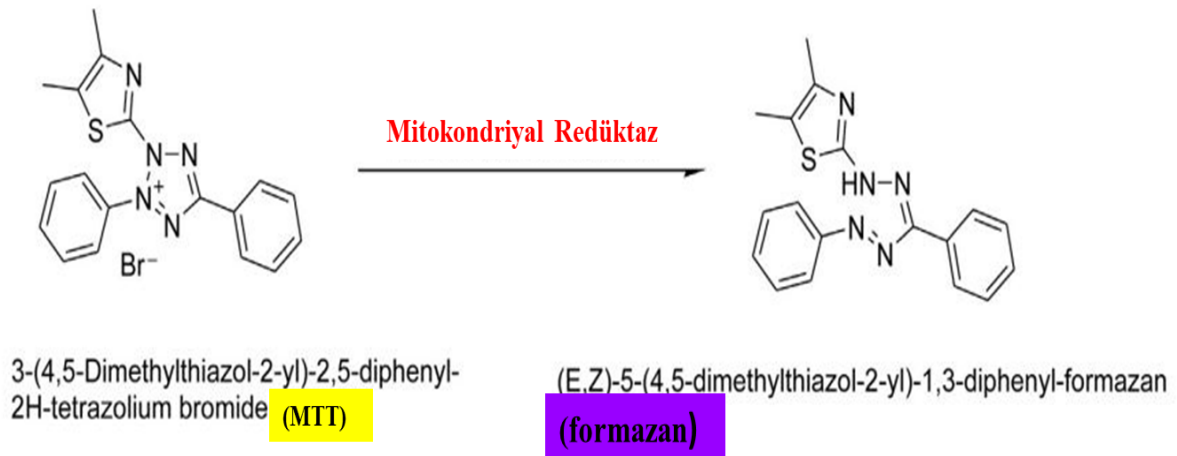
3.4. Akrep Zehirinin Hücelere Uygulanması

Akrep ham zehiri 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml ve 31,2 µg/ml'lik konsantrasyonlarda olacak şekilde hücelere uygulanmak için hazırlanmıştır. Zehir uygulaması sonrası hüceler 24 saat süreyle 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.5. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Analizleri

3.5.1. MTT Testi

Hücelerin metabolik aktivitesini ölçerek hücre canlılığı ve çoğalmasını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimlerinin bir tetrazolyum boyası olan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür)'yi mor renge sahip suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgemesine dayanır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. MTT tetrazolyum tuzunun parçalanarak formazan kristallerine dönüştürülmesi.

MTT testinde, çözünmeyen mor formazan ürününü çözdürmek için DMSO veya asitleştirilmiş etanol çözücü kullanılır ve renkli bir çözelti elde edilir. Bu renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometre ile belirli bir dalga boyunda (500-600 nm arasında) ölçülebilir [71].

- 96 kuyucuklu plaklara 100 µl'de $1,5 \times 10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldı.
- 24 saatlik inkübasyon sonrası hücelere yukarıda belirtilen akrep zehri dozları 24 saat süre ile uygulandı.
- İnkübasyonun ardından besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonra deney karanlık ortamda devam ettirildi.
- 1:9 (5 mg/ml MTT:Serumsuz Besiyeri) oranında karışım hazırlandı ve 100 µl olacak şekilde kuyucuklara eklendi.
- Hücreler 37°C'de etüvde 4 saat boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde besiyeri-MTT karışımı ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 150 µl DMSO eklenerek formazan kristallerinin mor renge dönüşmesi gerçekleştirildi.
- Plaka okuyucuda 570 nm'de absorbans ile okuma yapıldı ve elde edilen sonuçlardan % canlılık değerleri hesaplandı.

Hücre canlılığını inhibe eden konsantrasyonlar belirlenerek bu konsantrasyon üzerinden IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri, hücrelerin % 50'sini inhibe eden inhibitör konsantrasyon olup düşük IC₅₀ değeri yüksek inhibisyon değerini belirtmektedir. 24 saat inkübasyon sonunda hücelere uygulanan zehir konsantrasyonlarından uygun dozlar bu inkübasyon değerinde görüldüğü için bu inkübasyonda deneysel çalışmalara devam edilmiştir.

3.5.2. Apoptoz ve Nekroz Tayini

Apoptoz ve nekroz tayini için ticari Apoptoz/Nekroz Tespit Kiti (Abcam ab176749) kullanılmıştır. Bu kit ile apoptotik, nekrotik ve sağlıklı hücreler aynı anda tespit edilebilmektedir. Kitte PS (fosfatidilserin) sensörü kullanılmış ve bu sensör PS membranına bağlandığında yeşil floresan ışımaya vermektedir. Zar geçirgenliği olmayan bir 7-AAD boyası ile çekirdek etiketlenerek plazma zar bütünlüğü bozulan ve nekroza uğrayan hücreler kırmızı renge boyanır. Canlı hücre sitoplazmasını göstermek için ise CytoCalcein Violet 450 boyası ile mavi renge boyanır.

Kit protokolü takip edilerek apoptoz/nekroz tespiti gerçekleştirilmiştir.

- Deneye başlamadan 1 gün önce 96 kuyucuklu plaklara 20×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 100 μ l hücre ekimi yapıldı.
- 24 saatlik inkübasyon sonrası hücelere belirlenen IC_{50} ve $\frac{1}{2} IC_{50}$ dozunda uygulama yapıldı ve 24 saat boyunca da zehir ile inkübasyona bırakıldı. Zehir ile inkübasyonun ardından apoptoz/nekroz tespitine geçildi.
- Deney boyunca karanlık ortam kullanıldı ve buz üzerinde çalışıldı.
- Hücelere eklemek için kit içeriğindeki boyalardan belli oranlarda bir karışım hazırlandı. Karışımın içeriği;

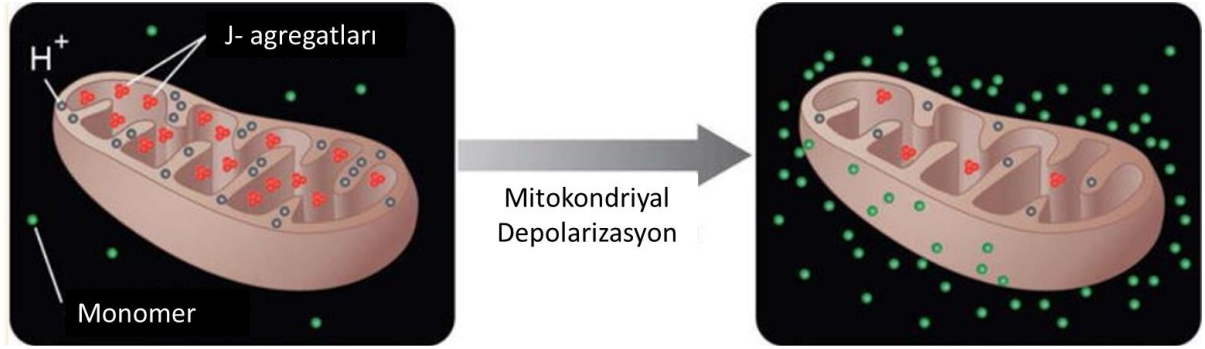
<i>Kit içeriğindeki malzemeler</i>	<i>1 Örnek İçin</i>
<i>Assay Buffer</i>	100 μ l
<i>CytoCalcein Violet</i>	0,5 μ l
<i>Apoptin</i>	1 μ l
<i>7-AAD</i>	0,5 μ l

- Kuyucuklardaki besiyeri ortamı uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklar 50 μ l Assay Buffer ile 1 kez yıkandı.
- Hazırlanan boya karışımından 102 μ l olacak şekilde her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- Hücreler 60 dk boyunca karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon bittikten sonra karışım ortamdaki uzaklaştırıldı.
- Hücreler 100 μ l Assay Buffer ile yıkandı.
- Yıkamanın ardından 100 μ l Assay Buffer eklenerek EVOS Floid Cell Imaging Station (Thermo Fischer Scientific) floresan mikroskop ile görüntüleme yapıldı.

3.5.3. Mitokondriyal Transmembran Potansiyel ($\Delta\Psi_m$) Analizi

Mitokondriyal disfonksiyonlar, kanser gibi apoptoz ile bağlantılı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Toksikiteyle ilişkili bileşikler mitokondrideki çeşitli makromolekülleri bozarak mitokondriyal fonksiyonları etkiler ve MMP'yi azaltır. MMP'yi değerlendirmek için hücre zarı geçirgen katyonik floresan boyalar kullanılır. Bu protokolda katyonik floresan boya olarak JC-1 boyası tercih edilmiştir. Sağlıklı hücrelerde J-agregatları mitokondride kırmızı floresan kümeleri olarak birikirken MMP

depolarize olduğunda ve hücreler daha az sağlıklı hale geldiğinde J-agregatları yeşil floresan monomerlere dönüştürülür ve sitoplazmada kalır (Şekil 3.2) [72].



Şekil 3.2. Mitokondriyal membran potansiyel analizinde JC-1 boyasının agregat ve monomer yapılarının görüntüleri.

- Katı halde satın alınan JC-1 (Sigma-Aldrich T4069) boyası 10 mM stok için 766,6 μ l DMSO ile çözdürüldü. Çözdürülen miktar 10 μ l'lik alikotlar halinde -20°C'de saklandı.
- Pozitif kontrol olarak kullanılan valinomycin (Sigma-Aldrich V0627) firmasından katı halde satın alındı ve 899 μ l DMSO içinde çözdürülerek 10 mM stok elde edildi. Stok ürün -20°C'de saklandı. Deney esnasında stoktan 10 μ M Valinomycin kullanıldı.
- MDA-MB-231 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 100 μ l'de 20×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi.
- 24 saatlik inkübasyon sonrası hücreler IC₅₀ ve 1/2 IC₅₀ oranında zehir ile uyarıldı ve 24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde JC-1 boyaması yapılmadan önce pozitif kontrol olarak kullanılan 10 μ M Valinomycin 10 dk boyunca hücrelere uygulandı.
- Hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1X DPBS ile 1 kez yıkandı.
- 10 mM stoktan alınan JC-1 boyası 2 μ M olacak şekilde 1X DPBS ile karıştırıldı.
- DPBS ile yıkanan hücrelerin üzerine 100 μ l JC-1 karışımı eklendi.
- Hücreler 37 °C'de 30 dk boyunca etüvde ve karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde hücreler 1X DPBS ile 2 kez yıkandı.
- Hücrelere yeni besiyeri eklendi ve floresan mikroskopta incelendi.

3.6. RNA İzolasyonu

MDA-MB-231 hücreleri 500 µl 10x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde 24 kuyulu plaklara ekilmiştir. 1 gün inkübasyona bırakılan hücrelere ½ IC₅₀ oranında zehir uygulanmış, negatif kontrol için 1 kuyu da zehir uygulaması yapılmayan hücreler hazırlanmıştır. Uyarılmış ve uyarılmamış hücreler 0 saat, 24 saat ve 48 saat olmak üzere 3 ayrı zaman aralığında etüvde inkübe edilmiştir. Deney 3 kez tekrar edilmiştir. İnkübasyon bitiminde RNA izolasyonu protokolüne başlanmıştır. RNA izolasyonu için RiboZol™ (VWR Life Science) RNA ekstraksiyon ürünü kullanılmıştır.

RNA izolasyon protokolü;

1. Homojenizasyon/Lizis

- 24 kuyulu plakalarda büyütülen hücreler izolasyon için steril kabine alındı.
- Hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Her kuyuya 200 µl Ribozol (1 ml Ribozol/10 cm²) eklendi.
- Hücreler yüzeyden kazınarak pipetaj yapıldı ve hücrelerin parçalanması sağlandı.
- Pipetajla parçalanmış hücreler RNaz içermeyen tüplere aktarıldı ve 2. adıma geçildi.

2. Fazların Ayrılması

- Nükleoprotein komplekslerin tam olarak ayrışmasını sağlamak için homojenize numuneler oda sıcaklığında 5-10 dk inkübasyona bırakıldı.
- Hücrelerin üzerine 40 µl kloroform (200 µl kloroform/1 ml Ribozol) eklendi ve tüpler sıkıca sabitlendi.
- Karıştırmak için 15 sn boyunca kuvvetlice çalkalandı ve 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 12000 xg'de 15 dk +4°C'de santrifüjlendi.
- Santrifüj ardından 3 belirgin faz oluştu. a) açık kırmızı faz (fenol-kloroform fazı)
b) beyaz interfaz
c) renksiz üst faz
- RNA, yalnızca renksiz üst fazda yer alır. Üst fazın %80'i dikkatlice ayrıldı.
- Kalan fenol çözeltisine eşit hacimde nükleaz içermeyen su ilave edilerek orijinal üst fazın kalan %20'sini geri kazanmak için yeniden ekstrakte edildi.

- Çözelti vortekslendi ve katmanlara ayırmak için tekrar 12000 xg'de 15 dk +4°C'de santrifüjlendi. Üst faz yukarıdaki gibi dikkatlice çıkarıldı.
- İki üst faz birleştirildi ve 3. adıma geçildi.

3. RNA'nın Çöktürülmesi

- Üst faz yeni RNaz içermeyen bir tüpe aktarıldı ve 100 µl izopropanol (0,5 ml izopropanol/ 1ml Ribozol) eklenerek RNA çöktürüldü.
- Örnekler 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından 12000 xg'de +4°C'de 10 dk santrifüj edildi.
- Çökelmiş RNA'dan oluşan beyaz-jel benzeri bir pelet tüpün yan ve alt kısmında oluşmalıdır. Peletin boyu başlangıçtaki hücre miktarına bağlıdır. Bu pelet şeffaf renkte ve görülmesi zordur.

4. Yıkama

- RNA'yı parçalamadan süpernatant dikkatlice çıkarıldı.
- RNaz içermeyen su ile hazırlanan %75'lik etanol ile pelet kısmı en az 1 kez yıkandı.
- Her yıkama için 1 ml etanol (1 ml etanol/ 1ml Ribozol) eklendi ve vortekslendi.
- Vorteks ardından 7500 xg'de +4°C'de 5 dk boyunca santrifüj edildi.

5. RNA Pelet'inin Çözdürülmesi

- Son etanol yıkamasının ardından pelet parçalanmadan dikkatlice etanol uzaklaştırıldı.
- Pelet 5-10 dk havada kurutuldu.
- RNA, 25 µl RNaz içermeyen su ile çözdürüldü.
- Pelete birkaç kez pipetaj yapıldı ve RNA konsantrasyonu A260 nm'de nanodrop ile ölçüldü.

3.7. cDNA Sentezi

RNA'dan komplementer DNA (cDNA) sentezi için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific K1622) kullanılmıştır.

Kit Protokolü;

- RNA izolasyonu yapılan her bir örnek cDNA'ya dönüştürülmeden önce 500 ng RNA olacak şekilde ayarlandı.
- -20 °C'den çıkarılan kit bileşenleri çözdürüldükten sonra buz üzerine konuldu.
- 500 ng'a ayarlanan RNA'lardan her bir RNA örneğine son hacim 11µl'ye tamamlanacak şekilde nükleaz içermeyen su eklendi.
- Kit içeriğinde bulunan 1µl Oligo dT primer bu karışıma ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı.
- Bu adımın ardından isteğe bağlı olarak eğer RNA ürünü GC açısından zenginse 65° C'de 5 dk thermal cyclera konuldu.
- Devamında her bir örneğin üzerine sırasıyla kit içeriğinde bulunan 4 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl Ribolock RNase, 2 µl 10 mM dNTP mix ve 1 µl RevertAid Reverse Transcriptase eklendi.
- Hazırlanan örnek tüpleri 42°C'de 60 dk ve 70°C'de 5 dk olacak şekilde termal döngüleyiciye konuldu.
- Reaksiyonun ardından cDNA miktarları nanodrop ile ölçüldü ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Çizelge 3.1. 0.saat inkübasyon cDNA sentez reaksiyonu içerikleri

	<i>Kontrol 1</i>	<i>Kontrol 2</i>	<i>Kontrol 3</i>	<i>Zehir</i> <i>Uyarım 1</i>	<i>Zehir</i> <i>Uyarım 2</i>	<i>Zehir</i> <i>Uyarım 3</i>
<i>RNA ürünü</i>	4,4 µl	4,6 µl	4,3 µl	10,4 µl	4,65 µl	6,7 µl
<i>Oligo dT</i>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<i>Nükleaz içermeyen su</i>	6,6 µl	6,4 µl	6,7 µl	0,6 µl	6,3 µl	4,3 µl
<i>Son hacim</i>	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl


Çizelge 3.2. 24.saat inkübasyon cDNA sentez reaksiyonu içerikleri

	<i>Kontrol 1</i>	<i>Kontrol 2</i>	<i>Kontrol 3</i>	<i>Zehir</i>	<i>Zehir</i>	<i>Zehir</i>
				<i>Uyarım 1</i>	<i>Uyarım 2</i>	<i>Uyarım 3</i>
<i>RNA ürünü</i>	7,4 µl	2,9 µl	6,5 µl	6,9 µl	3,9 µl	4,8 µl
<i>Oligo dT</i>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<i>Nükleaz içermeyen su</i>	3,6 µl	8,1 µl	4,5 µl	4,1 µl	7,1 µl	6,2 µl
<i>Son hacim</i>	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl

Çizelge 3.3. 48.saat inkübasyon cDNA sentez reaksiyonu içerikleri

	<i>Kontrol 1</i>	<i>Kontrol 2</i>	<i>Kontrol 3</i>	<i>Zehir</i>	<i>Zehir</i>	<i>Zehir</i>
				<i>Uyarım 1</i>	<i>Uyarım 2</i>	<i>Uyarım 3</i>
<i>RNA ürünü</i>	2,7 µl	1,7µl	3,5 µl	1,7 µl	3,6 µl	2,5 µl
<i>Oligo dT</i>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<i>Nükleaz içermeyen su</i>	8,3 µl	9,3 µl	7,5 µl	9,3 µl	7,4 µl	8,5 µl
<i>Son hacim</i>	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl

Çizelge 3.4. 12 µl'lik son hacime sırasıyla eklenen ürünler

5X Reaction Buffer	4 µl		Reaksiyon Koşulu; 42 °C 60 dk 70 °C 5 dk
Ribolock RNase	1 µl		
10 mM dNTP Mix	2 µl		
RevertAid	1 µl		
Reverse Transcriptase			
Son hacim	20 µl		

3.8. Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR)

Gerçek zamanlı PZR ile gen ifadeleri LightCycler 480 (Roche) cihazı kullanılarak ortaya konulmuştur. Hücrelerden izole edilen RNA'ların ardından cDNA'ya çevrilen örneklerin SYBR Green Master Mix (Ampliqon RealQ Plus)'i ile ışımaya vermesi sonucu elde edilen ekspresyon eğrileri gen ifade profillerinin belirlenmesini sağlar. Apoptoz ile ilişkili olduğu düşünülen genlerden Kaspaz-3 (sistin-aspartik asit proteaz), *P21* (cyclin-dependent kinase inhibitörü), *P53* (tümör baskılayıcı gen p53), *NOXA* (phorbol-12-myristate-13-acetate-indükleyici protein 1(PMAIP1)), *PUMA* (BCL2 bağlama bileşeni 3(Bbc3)), *BCL-2* (BCL2 apoptoz regülatör) ve *BCL-XL* (BCL2-like 1)'in ifadesi incelenmiştir. Kontrol geni olarak da β-ACTIN (beta-aktin) geni tercih edilmiştir. RT-PZR reaksiyonunda kullanılan genlerin primer dizileri Çizelge 3.5'te ve reaksiyon koşulları Çizelge 3.6'da gösterilmiştir. Reaksiyon bitiminde elde edilen CT değerlerinden $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplanarak gen ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu için LightCycler®480 (Roche) cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyonunda Kullanılan Primer Dizileri [73]

Gen	İleri Primer	Geri Primer
β -ACTIN	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG	GGAGCAATGATCTTGATCTTC
<i>CASP3</i>	AGAACTTAGGCATCTGTGGGC	ATCCAGGGGCATTGTAGCAC
<i>P21</i>	CAGGGGACAGCAGAGGAAGA	GGCAGAAGATGTAGAGCGGG
<i>P53</i>	GGGTTAGTTTACAATCAGGCAC ATT	GGCCTTGAAGTTAGAGAAAATTC A
<i>NOXA</i>	TTCAATGTGTTTCCTGTTGGGC	GTGACAAGGAGCATTTCCTCGA
<i>PUMA</i>	GTCCTCAGCCCTCGCTCT	CTGCTGCTCCTCTTGTCTCC
<i>BCL-2</i>	ATGGGCTGGACATTGGACTTC	GGGAGGTCAGCAGGGTAGAT
<i>BCL-XL</i>	ACCCCTTAGCCTCCCTGAAA	CCATAAACAGCTCTGGGGCA

Çizelge 3.6. Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyon Koşulları

Döngü Sayısı	Döngü Süresi	Sıcaklık
1	15 dakika	95 °C
40	15 saniye	95 °C
	60 saniye	60 °C
	10 saniye	72 °C
1	30 saniye	40 °C

3.9. İstatistiksel Analiz

Yapılan tez çalışmasındaki istatistiksel analizler GraphPad Prism (Versiyon 8.0.2) programı kullanılarak elde edilmiştir. Tekrarlı ölçümler için yapılan analizlerden ortalama \pm standart sapma değerleri bulunmuştur. Farklı grupları istatistiksel olarak karşılaştırmak için 2 farklı grup karşılaştırmalarında t-test ve Mann-Whitney U test kullanılmıştır. $p < 0,05$ değerlerinin anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Akrep Zehirinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

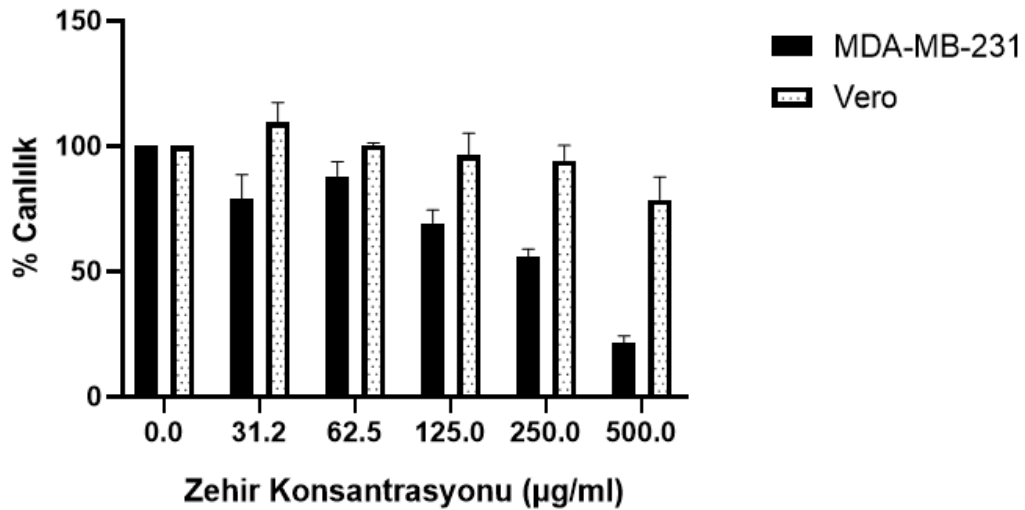
Sulandırılan zehirin nanodrop ile yapılan ölçüm sonrası elde edilen konsantrasyonu 1,06 mg/ml olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonrası belirlenen dozlar (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml ve 31,2 µg/ml) hazırlanmış ve hücelere uygulanmıştır.

4.2. Akrep Zehiri ile Uyarılan Hücrelerde Canlılık ve Sitotoksosite Ölçümü

Çalışma kapsamında hücelere uygulanan akrep zehrinin etkisini görebilmek için uygun doz ve sürenin belirlenmesi önemlidir. Bu amaç doğrultusunda hücre canlılığını belirleyebilmek için sitotoksosite deneyleri yapılmıştır. MTT testi, Apoptoz/Nekroz Tayini ve Mitokondriyal Membran Potansiyelinin analizi yapılmıştır.

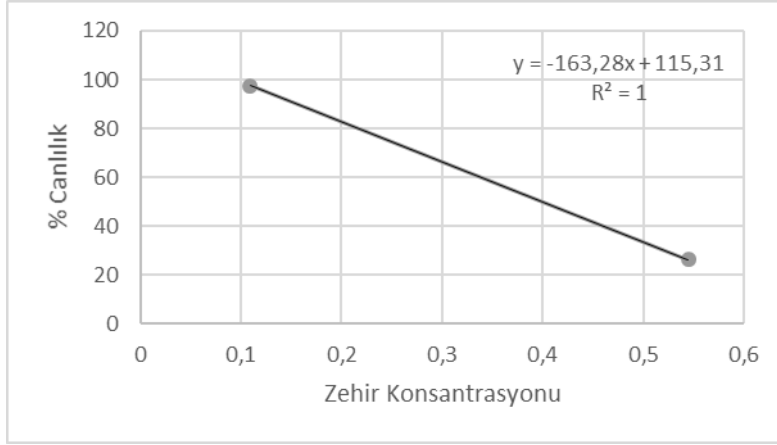
4.2.1. Farklı Konsantrasyonlarda Akrep Zehiri ile Uyarılan MDA-MB-231 ve Vero Hücrelerinde MTT Testi

Kanser hücrelerine (MDA-MB-231) ve sağlıklı hücelere (Vero) 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan akrep zehrinin sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Deneyler 3 bağımsız tekrarlı olarak yapılmıştır.



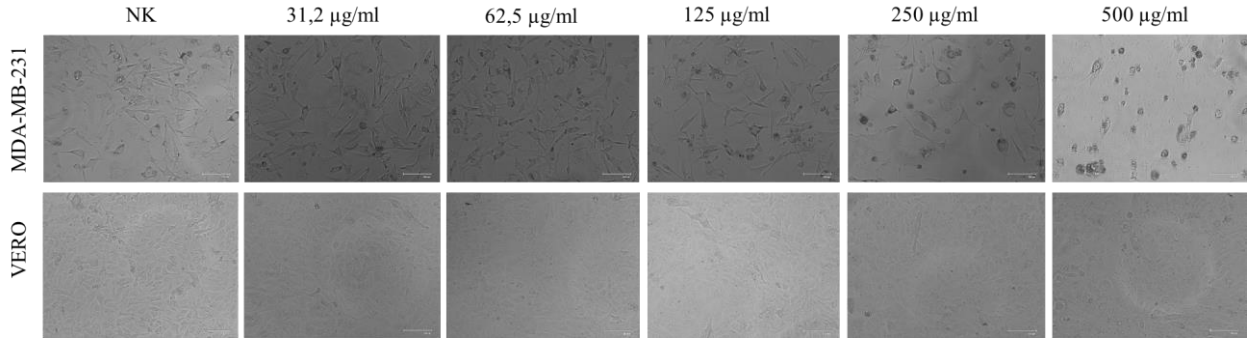
Şekil 4.1. 5 farklı konsantrasyonda sağlıklı ve kanser hücelere 24 saat uygulanan akrep zehrinin MTT sonuçları.

Elde edilen verilerden Microsoft Excel (2016) programı kullanılarak oluşturulan grafik üzerindeki eğim çizgisi denklemi yardımıyla IC₅₀ değeri hesaplanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. IC₅₀ değerinin elde edildiği Excel grafiği.

IC₅₀ değeri 399 µg/ml olarak bulunmuştur. Deneylere IC₅₀ ve ½ IC₅₀ değerlerindeki konsantrasyonlar ile devam edilmiştir.



Şekil 4.3. 5 farklı konsantrasyonda 24 saat boyunca akrep zehiri uygulanan MDA-MB-231 ve VERO hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.(NK: Negatif Kontrol, MDA-MB-231: Kanser hücre hattı, VERO: Sağlıklı hücre hattı)

2 farklı hücre hattı üzerinde yapılan deneysel çalışmalar sonucu, kullanılan akrep zehrinin kontrol hücrelerine kıyasla kanser hücrelerinde doza bağlı olarak etkisinin arttığı (doz arttıkça hücre sayısı azalır) ancak sağlıklı hücrelerde doza bağlı herhangi bir etki görülmediği söylenebilir (Şekil 4.3). Bu değerlendirme neticesinde, akrep zehiri kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterirken, sağlıklı hücrelerde sitotoksik bir etkiye neden

olmamaktadır. Sonuçlara göre p değeri 0.045 bulunarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

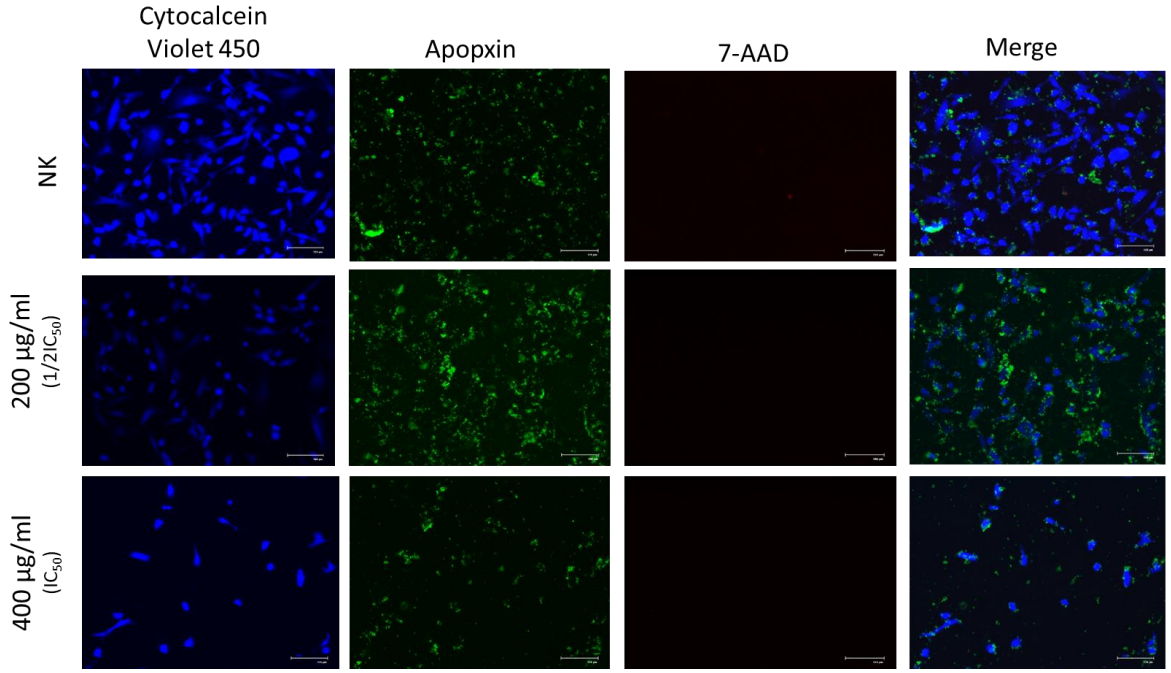
IC₅₀ değeri, çalışma için seçilen hücre hattına ve akrep zehirinin türüne göre değişiklik göstermektedir. Al-Asmari ve arkadaşlarının (2018), meme kanseri ve kolorektal kanser üzerine yaptıkları çalışmada MTT sonuçları değerlendirildiğinde; 24 saat boyunca zehir ile inkübasyon sonucunda *Androctonus crassicauda* zehirinin meme kanseri hücreleri üzerine uygulanması sonucunda IC₅₀ değeri 950 µg/ml, kolorektal kanser hücreleri üzerine uygulama sonrası ise 850 µg/ml olarak bulunmuştur. *Leiurus quinquestriatus* zehirinin meme kanseri ve kolorektal kanser hücreleri üzerine uygulanmasında da IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 900 µg/ml ve 850 µg/ml olduğu belirtilmiştir. Hücrelerin zehir ile inkübasyon süreleri arttığında IC₅₀ değerlerinde bir miktar azalış görülmektedir. 48 saat boyunca zehir ile inkübe edilen hücreler zehire daha fazla maruz kaldıkları için hücre canlılık oranları azalmıştır. Meme kanseri hücrelerine *Androctonus crassicauda* zehirinin 48 saat uygulanması sonucunda IC₅₀ değerinin 850 µg/ml'ye kolorektal kanser hücrelerine uygulama sonrası ise 752 µg/ml'ye düştüğü bildirilmiştir. *Leiurus quinquestriatus* akrep zehirinin ise meme kanseri hücrelerine 48 saat boyunca uygulanması ile IC₅₀ değeri 815 µg/ml'ye düşerken, kolorektal kanser hücrelerine uygulanma sonrası 695 µg/ml'ye düştüğü bildirilmiştir [65]. Díaz-García ve arkadaşları (2017) *Rhopalurus junceus* türü akrep zehiri ile MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerine yaptıkları bir çalışmada, 72 saat boyunca zehir ile inkübasyon sonucunda MTT sonuçlarına göre IC₅₀ değerini 750 µg/ml ve 500 µg/ml'lik bir konsantrasyon aralığında bulduklarını, sağlıklı hücrelerde ise bu akrep türünün herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığını açıklamışlardır [74]. Bernardes-Oliveira ve arkadaşları (2019), *Tityus serrulatus* türü akrep zehrinin serviks (rahim ağzı) kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, 48 saat boyunca 250 µg/ml zehir ile inkübasyon sonucunda SiHa hücre hattı üzerinde % 64,36, HeLa hücre hattı üzerinde ise %78,7 sitotoksosite bulduklarını belirtmişlerdir [66]. Çalışkan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2013), *Androctonus crassicauda* türünün ham zehirinin BC3H1 hücre hattında 24 saat ve 48 saat boyunca 1, 10, 50, 100 ve 250 µg/ml zehir ile inkübasyon sonucunda, 48 saat inkübasyonda zehir ile muamelenin doza bağlı olarak hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı, 250 µg/ml dozun hücre canlılığını %50'ye kadar düşürdüğünü belirtmişlerdir. 24 saat inkübasyonda da hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla az

miktarda da olsa azalış göstermiştir. Ancak ham zehirin, F2408, CO25, 5RP7, A549, WM115 ve NIH3T3 hücre hatlarında önemli bir etki göstermediğini açıklamışlardır [75].

Akreplerin türü ve aynı tür olsalar bile bu türlerin farklı bölgelerde yaşamaları bile zehrin etkisini değiştirebilmektedir. Bizim çalışmamızda kullandığımız akrep türü ve kullanılan hücre hatları önceki çalışmalar ile kıyaslandığında IC₅₀ değerinin yaklaşık %50 oranında daha düşük çıktığı görülmektedir. Bu sonuç, zehrin etkinliğinin daha fazla olduğu olarak yorumlanabilir. Ancak zehrin kanser hücrelerine etki edip sağlıklı hücrelere etki etmemesi bizim de elde ettiğimiz bir sonuçtur. MTT sonuçları değerlendirildiğinde, sonuçlar literatür ile benzerlik göstermektedir.

4.2.2 Farklı Konsantrasyonlarda Akrep Zehiri ile Uyarılan MDA-MB-231 Hücrelerinde Apoptoz/Nekroz Tayini

Androctonus crassicauda türüne özgü akrep zehiri ile muamele edilen sağlıklı ve kanser hücrelerinden kanser hücrelerinde zehirin etki ettiği görülmüştür. Bu aşamadan sonra deneylere kanser hücrelerindeki etkiyi araştırmak için MDA-MB-231 kanser hücre hattı üzerinden devam edilmiştir. Kullanılan konsantrasyonlar ise IC₅₀ ve ½ IC₅₀ değerleri üzerinden hesaplanmıştır. Akrep zehirinin apoptoz mu yoksa nekroza mı yol açtığını belirlemek için Apoptoz/Nekroz Test Kiti (Abcam ab176749) ile floresan boyama yapılmıştır. Bu kit içeriğindeki Apopxin Green boyası ile apoptotik hücreler yeşil renge, 7-AAD boyası ile nekrotik hücreler kırmızı renge, Cytocalcein Violet 450 boyası ile canlı hücreler mavi renge boyanmıştır. Boyama sonrası alınan görüntüler ayrı ayrı ve birbiri üzerine çakıştırılarak oluşturulmuştur.



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat boyunca akrep zehiri ile uyarılan MDA-MB 231 hücrelerinde apoptoz ve nekroz ayırımı için floresan boyama sonuçları. (NK: Negatif Kontrol. Mavi renk: canlı hücre, Yeşil renk: apoptotik hücre, Kırmızı renk: nekrotik hücre).

Uygulanan akrep zehirinin kontrol hücrelerine kıyasla kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiği tespit edilmiştir. 7-AAD ile boyama sonucu nekrotik hücelere rastlanmamıştır. Bu sonuç, *Androctonus crassicauda* akrep zehirinin MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında apoptozu uyararak hücreleri ölüme götürdüğünü göstermektedir. Doz artışıyla beraber (400 µg/ml) ölü hücre sayısı artmış dolayısıyla görüntülenecek hücre sayısı (boyama sırasında hücrelerin yıkanması sebebiyle) azalmıştır (Şekil 4.4).

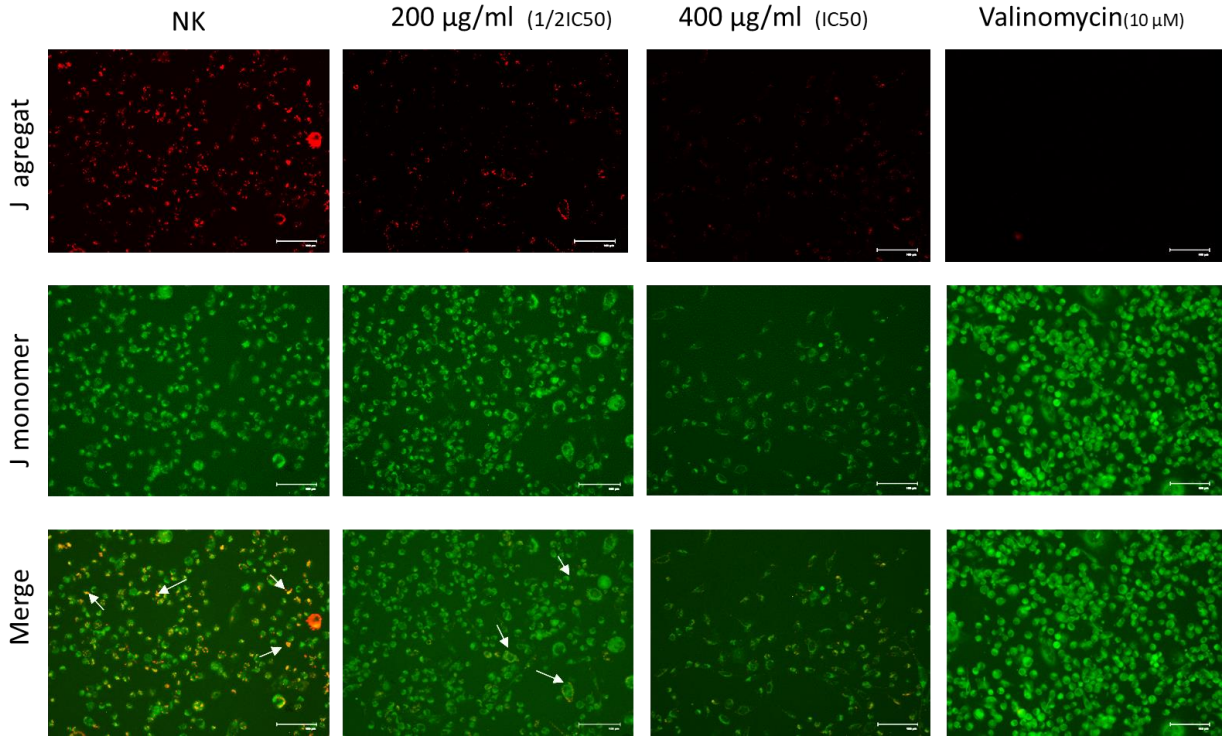
Fosfatidilserin (PS), ökaryotik hücre zarının bütünlüğü için önemli bir fosfolipiddir. PS, normal sağlıklı hücrelerde plazma zarında asimetrik olarak dağılık halde ve plazma zarının iç tabakasında bulunur. Fakat, kanser hücrelerinde plazma zarının dış tabakasında yüksek seviyelerde eksprese edilebilir. Kanser hücrelerinin yüzeyinde aşırı PS bulunması, kanser hücrelerinin terapötik olarak seçilebilmesine olanak sağlar [76]. Ayrıca kanser hücrelerinde az miktarda apoptozun meydana gelebileceği de bildirilmiştir [77]. Kit içeriğinde bulunan PS sensörü, kanser hücrelerinin yüzeylerinde aşırı bulunan PS'lere bağlandığı için Apopxin Green ile boyamada yeşil renk ile boyanmışlardır. Zehir ile muamele sonucunda ise kanser hücrelerinde apoptoz artışı olmuş, bu nedenle yeşil ile

boyanmada artış gözlenmiştir. Zehir ile muamele edilen hücrelerde zehir etkisiyle yüzeydeki canlı hücrelerin sayısında da azalış tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçların neticesinde *Androctonus crassicauda* zehrinin 200 µg/ml konsantrasyonda üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olduğu görülmektedir.

4.2.3. Farklı Konsantrasyonlarda Akrep Zehrinin MDA-MB-231 Hücrelerinde Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Üzerine Etkisi

Mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim katyonik bir boya olan JC-1 boyası ile değerlendirilmiştir. IC_{50} ve $\frac{1}{2} IC_{50}$ değerindeki dozlar üçlü negatif meme kanseri hücrelerine uygulanmıştır. Negatif kontrole herhangi bir zehir uygulaması yapılmamıştır (Şekil 4.5).



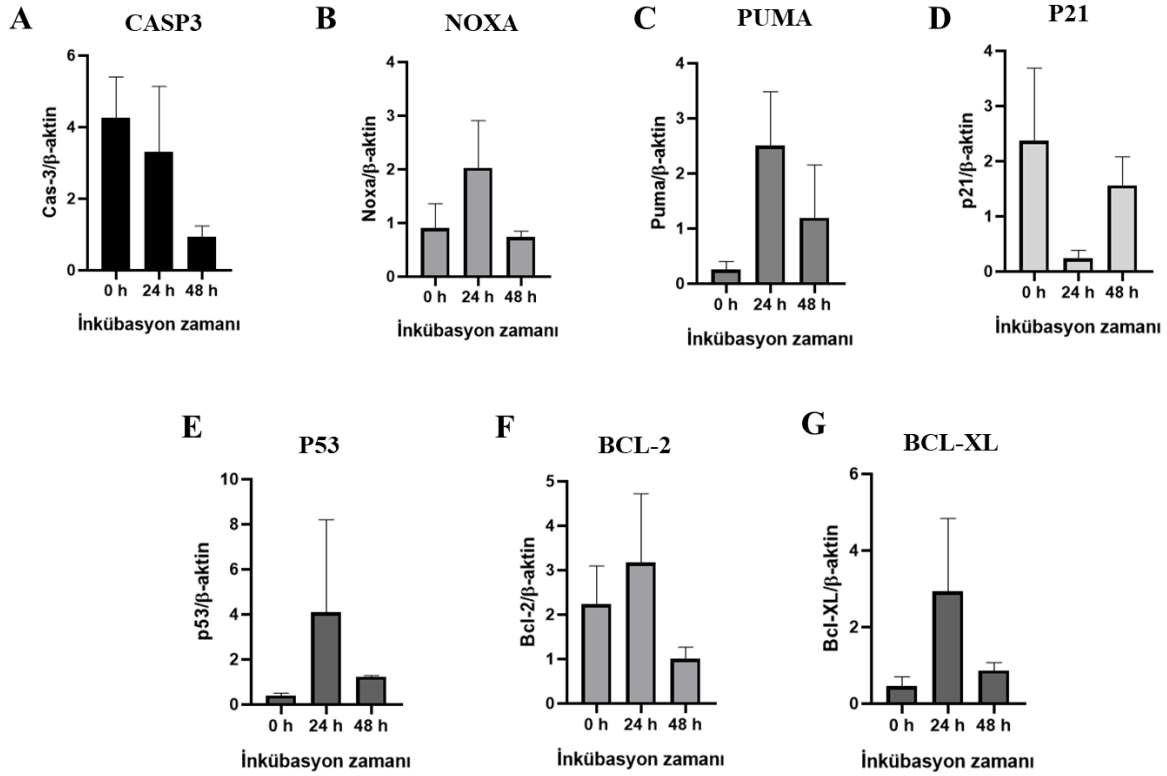
Şekil 4.5. *A. crassicauda* zehiri ile 24 saat inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimlerin floresan mikroskobu altında gösterilmesi. (Beyaz oklar J-agregatlarını gösterir ve mitokondriyal membran potansiyelindeki azalışı ifade eder. (NK: Negatif Kontrol, Valinomycin: Pozitif Kontrol))

24 saat boyunca *A. crassicauda* zehiri uygulanan üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli azalmıştır (Şekil 4.5). 200 µg/ml konsantrasyonda J-agregat sayısındaki azalış ve J-monomer sayısındaki artış hücrelerin hasar alarak mitokondri zarının destabilize hale geldiğini dolayısıyla da hücrelerin apoptoza yönlendiğini belirtmektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan valinomycin bir K⁺ iyonofordur, mitokondri iç zarının stabilizasyonu bozarak mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı bilinmektedir [78]. Bu sonuçlardan sayısal analiz yapılamadığı için değerler grafik üzerinde gösterilememiştir.

Mitokondriyal membran bütünlüğünün değişmesi erken apoptoz olaylarından biridir. Bu değişim mitokondriyal membran gözeneklerinin açılmasından kaynaklanır. Akrep zehirlerinden izole edilen toksin peptitleri ile yapılan çalışmada, Das Gupta ve arkadaşları (2010), Hint kara akrep zehirinden izole edilen yeni bir protein Bengal'in lösemik hücrelerde (U937 ve K562) apoptoz indüklemeye etkisine baktıklarında JC-1 floresansında önemli bir artış gördüklerini belirtmişlerdir [79]. Zargan ve arkadaşları (2011), *Odontobuthus doriae* zehirinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde etkisini incelediklerinde, 24 saat zehir ile inkübasyon sonucunda JC-1 yeşil/kırmızı floresan yoğunluğunun arttığını dolayısıyla MMP'nin önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir [63].

4.3. Optimum Dozda Akrep Zehiri Uygulanan Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik Genlerin İfadelerinin Belirlenmesi

A. crassicauda zehiri uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 24 saat ve 48 saat boyunca zehir ile inkübe edilmiş ve inkübasyonlar sonucunda akrep zehirinin zamana bağlı etkisi ve apoptoz ile ilişkili genlerin (*Kaspaz-3*, *NOXA*, *PUMA*, *P21*, *P53*, *BCL-2* ve *BCL-XL*) ifadeleri gerçek zamanlı PZR yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *A. crassicauda* zehiri ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 0, 24 ve 48 saat inkübasyon sonucu *CASP3* (A), *NOXA* (B), *PUMA* (C), *P21* (D), *P53* (E), *BCL-2* (F) ve *BCL-XL*(G) genlerinin gerçek zamanlı PZR sonuçları.

Şekil 4.6 'da ifade edilen genler ve ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre hesaplanmıştır. Referans geni olarak β-aktin geni kullanılmış ve seçilen genler β-aktin genine kıyasla grafiksel ifadeye dönüştürülmüştür. Akrep zehirinin (200 µg/ml) zamana bağlı etkisine bakıldığında 0.saat kontrol grubuna göre kıyaslama yapılmış ancak zehrin etkisi zamana bağlı gen ekspresyon seviyesinde anlamlı bir fark göstermemiştir ($p=0.5003$). 0.saat ve 24.saat inkübasyon sonucu gen ifadeleri karşılaştırıldığında zehrin *NOXA*, *PUMA*, *P53*, *BCL-2* ve *BCL-XL* genlerinin ekspresyonlarını arttırdığı görülürken; *CASP3* ve *P21* genlerinin ekspresyonlarını azalttığı görülmüştür. 0.saat ve 48.saat inkübasyon sonucunda ise *PUMA*, *P53* ve *BCL-XL* genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre artmış; *CASP3*, *NOXA*, *P21* ve *BCL-2* genlerinin ifadelerinde azalış gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre zehrin etkisi zaman bağlı anlamlı bir fark oluşturmamıştır. 24.saat inkübasyon sonucu kontrol ile kıyaslandığında pro-apoptotik genlerden *NOXA*, *PUMA*, *P53*'ün ekspresyonu olması gerektiği gibi artmış ancak anti-apoptotik gen olan *BCL-2* ve *BCL-XL* genlerinin ekspresyonun da arttığı görülmüştür.

Sonuçlara bakıldığında, gerçek zamanlı PZR yöntemi ile gen ifade profilleri analizinde zehrin etkisi anlamlı bir fark göstermemiştir. Akrep zehrinin moleküler düzeyde etkisi bir tümör baskılayıcı gen olan *P53* geninin ekspresyonunu yüksek düzeyde indüklemiştir (Şekil 4.6). Ancak *P21* geninin ifadesini azalttığı görülmektedir. Bunun nedeni zehrin apoptoz sürecinde hücre döngüsünü geçtikten sonraki apoptoz yollarında etkili olması olabilir. Mitokondriyal membran potansiyel değerlendirmesi deneyinde de hücrelerin mitokondriyal disfonksiyonundan dolayı apoptoza gittiği görülmüştür. Bu nedenle apoptoz mekanizmasında zehrin etkili olduğu yolağın mitokondriyal iç yolak olduğu ifade edilebilir. Anti-apoptotik genlerin ifadesinin artması apoptoz mekanizmasında apoptozu engeller, bu da hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olur. Elde ettiğimiz sonuçlarda da *BCL-2* ve *BCL-XL*'nin ifadesinin arttığı görülmektedir. Bununla birlikte *CASP3*'ün gen ifadesi ise azalmıştır (Şekil 4.6). *BCL-2* ve *BCL-XL*'deki artış *CASP3*'ün azalışını indüklemiş olabilir. Anti-apoptotik genlerdeki artışın nedeni kullanılan zehir dozundan da kaynaklanabilir. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu boyunca akrep zehri ½ IC₅₀ dozunda kullanılmıştır. Bu doz hücrelerin apoptozunu RNA düzeyinde analiz etmek için yeterli gelmemiş olabilir. Eğer doz miktarı artırılıp gen ekspresyonlarına tekrar bakılırsa daha etkili ve istenilen sonuçlar ortaya konulabilir.

Apoptotik yollar üzerine yapılan çalışmalarda, Moradi ve arkadaşlarının (2019) elde ettiği sonuçlara göre, *Hemiscorpius lepturus* türü akrep zehrinin CT26 hücre hattı ve VERO hücre hattı üzerinde etkisi incelenerek kanser hücre hattı üzerinde pro-apoptotik gen ekspresyonlarında artış meydana gelmiştir. CT26 hücre hattında, zehrin IC₅₀ değeri 120 µg/ml olarak bulunmuş ve GZ-PZR analizi de bu değer kullanılarak hesaplanmıştır. Zehir ile inkübasyon sonrası, doza bağlı olarak (52 µg/ml, 120 µg/ml, 322 µg/ml) *BAX*, *CASP3* ve *TRP53* genlerinde anlamlı bir mRNA ekspresyon artışı gözlenmiştir. Tümör dokusunda *Bcl-2* mRNA ekspresyonunda ise yüksek bir azalış tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar, *H. Lepturus* zehrinin Trp53/Bcl2/Casp3 yolağı aracılığıyla CT26 hücreleri üzerinde anti-proliferatif bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir [80]. Díaz-García ve arkadaşları (2017), *Rhopalurus junceus* zehrinin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde apoptotik yollara etkisini incelediklerinde *P53*, *BAX*, *NOXA*, *PUMA*, *P21* ve *CASP3* genlerinin aşırı ekprese olduklarını; *BCL-2* ve *BCL-XL* genlerinin ise ekspresyonlarının azaldığını ifade etmişlerdir [74].

Akrep zehrinin kanser tedavisi için kullanılması son yıllarda araştırmacılar için odak noktası haline gelmiştir. Antikanser ajanların tümör hücreleri ve normal hücreler üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması bu bileşiğin anormal ve normal hücre davranışını

ayrıt edip edemediğini göstermek için gereklidir. Kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü ve apoptotik yolları hedeflemek, kanser tedavisi ve ilaç geliştirmede önemli bir yaklaşımdır. Yapılan çalışmalar neticesinde, *Buthus martensi* türü akrep zehirinin MDA 435 melanoma hücrelerinde, *Buthus mathensii* Karsch türü akrep zehirinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, *Tityus discrepans* zehirinin SKBR3 meme kanseri hücrelerinde, *Tityus serrulatus* zehirinin rahim ağzı kanser hücrelerinde anti-tümör etki gösterdiği belirlenmiştir. Meme kanseri türleri çeşitlilik gösterdiği için etki eden zehirler ve etkili oldukları hücre hatları da farklı olmaktadır. Ülkemizde de akrep zehirinin anti tümör etkisi üzerine yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır. *Androctonus crassicauda* türü ile yapılan çalışmalarda zehirin farmakolojik etkileri ve etki mekanizmaları aydınlatılmıştır [81]. Zehirden izole edilen Acra1, Acra2, Acra3 ve Acra4 peptitlerinin BC3H1 beyin tümör hücrelerinde kanser hücrelerinin gelişimini engelleyici bir etkisi olduğu ortaya konulmuştur [82].

5. YORUM

Bu tez çalışmasında, MCF-7 hücrelerine göre daha agresif bir meme kanseri türü olan üçlü negatif meme kanseri (TNBC) MDA-MB-231 hücreleri üzerinde *Androctonus crassicauda* ham zehirinin sitotoksik etkisi ve apoptotik gen düzeyindeki etkisi incelenmiştir. Hücre canlılığı deneyi yapılarak hücreler için inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değeri belirlenmiştir. Uygun dozun belirlenmesinin ardından çalışmalara hücreleri öldüren optimum dozlar üzerinden devam edilmiştir. Mevcut bulgular, *A.crassicauda* zehirinin insan meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerine karşı kayda değer bir anti kanser aktiviteye, normal hücrelerde (VERO) ise minimal bir etkiye sahip olduğunu desteklemektedir.

Bu araştırma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Kanser hücreleri ve normal sağlıklı hücreler üzerinde MTT testi ile yapılan hücre canlılığı çalışmalarında farklı konsantrasyonlarda ham akrep zehiri ile uyarılan hücrelerden elde edilen sonuçlar literatürle uyumludur. Zehir, 24 saat boyunca 399 µg/ml'den fazla doz uygulanan kanser hücreleri üzerinde %50'den fazla sitotoksik etki gösterirken normal hücrelerde anlamlı bir etki gözlenmemiştir. Bu çalışmada en yüksek doz olarak kullanılan 500 µg/ml konsantrasyondaki zehir meme kanseri hücrelerinde %79 oranından hücre canlılığını inhibe ederken en düşük doz olarak kullanılan 31,2 µg/ml konsantrasyon miktarı %21'lik bir azalışa neden olmaktadır. Sağlıklı hücre olarak kullanılan Vero hücrelerinde ise 500 µg/ml konsantrasyon hücre canlılığını %21 azaltırken 31,2 µg/ml konsantrasyon hücre canlılığında herhangi bir azalışa neden olmamıştır. Zehrin sadece kanser hücrelerinde etki etmesinin ardından bu aşamadan sonraki bütün çalışmalar kanser hücreleriyle devam ettirilmiştir.
- Apoptoz/Nekroz tayini için yapılan hücre boyama çalışmalarında kullanılan floresan boyalar hücre zarında bulunan fosfatidilserine (PS) bağlanarak etki gösterir. Fosfatidilserinin hücre yüzeyindeki görünümü, apoptozun erken/ara evrelerinin ayırt edici özelliklerinden biridir. Bu çalışmada, 200 µg/ml ve 400 µg/ml'lik dozlarda uygulanan akrep zehri MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoza uğrayan PS'lere bağlanarak yeşil ışığa vermiştir. Kontrol hücrelerine kıyasla zehir uygulanan hücrelerde apoptotik hücre oluşumları gözlenmiştir.

- Sitotoksisite deneylerinin devamı niteliğinde yapılan mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesinde, hücrelerin doz artımına bağlı olarak membran potansiyellerinin azaldığı dolayısıyla J-agregat sayısındaki azalış nedeniyle apoptoza yöneldikleri anlaşılmıştır.
- Gen ekspresyon düzeyindeki değerlendirmelerde, zehir ile 24 saat inkübasyon sonucunda pro-apoptotik genlerden *NOXA*, *PUMA* ve *P53*'ün ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış görünürken, anti-apoptotik genlerden *BCL-2* ve *BCL-XL*'de de beklenmedik bir artış gözlenmiştir. 48 saat inkübasyon sonucunda ise kontrole ve 24 saat inkübasyona kıyasla pro-apoptotik gen ekspresyonlarında azalış söz konusudur. Elde edilen bu sonuçlar gen ekspresyon seviyelerinde istenilen sonuçlara ulaşılmadığını göstermektedir. Pro-apoptotik gen düzeyinde artış literatürle uyumludur ancak anti-apoptotik genlerde azalış göstermesi beklenmiştir.
- *A.crassicauda* türü akrep zehirinin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde 24 saat inkübasyon ile apoptozu indüklediği ancak normal sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermediği anlaşılmıştır. *A.crassicauda* akrep türüyle MDA-MB-231 hücre hattında ve Vero hücre hattında karşılaştırmalı olarak yapılan tek çalışma olması ve elde edilen sitotoksik çalışmaların gen düzeyinde de devam ettirilmesi bu çalışmanın özgün yönlerindedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] D.M. Parkin, Global cancer statistics in the year 2000, *The Lancet Oncology*, 2 (2001) 533-543.
- [2] R. Baskar, K.A. Lee, R. Yeo, K.W. Yeoh, Cancer and radiation therapy: current advances and future directions, *Int J Med Sci*, 9 (2012) 193-199.
- [3] C.C. Liu, H. Yang, L.L. Zhang, Q. Zhang, B. Chen, Y. Wang, Biotoxins for cancer therapy, *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (2014) 4753-4758.
- [4] İ. Kelle, Kanser Tedavisinde Biyotoksinler, *Dicle Tıp Dergisi*, 34 (2007) 226-232.
- [5] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 61 (2011) 69-90.
- [6] J. Cracraft, M.J. Donoghue, *Assembling the Tree of Life*, OXFORD UNIVERSITY PRESS, Oxford, 2004.
- [7] Harper, Douglas, "scorpion", *Online Etymology Dictionary*.
- [8] R.J. Howard, G.D. Edgecombe, D.A. Legg, D. Pisani, J. Lozano-Fernandez, Exploring the evolution and terrestrialization of scorpions (Arachnida: Scorpiones) with rocks and clocks, *Organisms Diversity & Evolution*, 19 (2019) 71-86.
- [9] Ö. Özkan, Z. Karaer, Akreplerin Vücut Yapıları, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 28 (2004) 54-58.
- [10] N. Yiğit, M. Benli, Fine structural analysis of the stinger in venom apparatus of the scorpion *Euscorpium mingrelicus* (Scorpiones: Euscorpiidae), *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, 16 (2010) 76-86.
- [11] Anonim, General information on scorpions, 2022.
- [12] W. Bucherl, Classification, biology, and venom extraction of scorpions, v. 1971, 3 (1971).
- [13] Ö. Özkan, Z. Karaer, TÜRKİYE AKREPLERİ, TÜRK HİJ DEN BİYOL DERGİSİ, 60 (2003) 55 - 62.
- [14] S.A. Ozcan OZKAN, Selçuk YAKIŞTIRAN, Yıldırım CESARETLİ., K.Z.K. Mehmet ORMAN, *Androctonus crassicauda* (Olivier 1807) Scorpionism in the Sanliurfa Provinces of Turkey, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30 (2006) 239-245.
- [15] A. Filazi, Ö. Özkan, The history of scorpion serum in Turkey, *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 78 (2021) 107-116.

- [16] E.A. Yağmur, *Androctonus turkiyensis* sp. n. from the Şanlıurfa Province, Turkey (Scorpiones: Buthidae), *Occasional Publications in Scorpiology*, 341 (2021).
- [17] R.E. Honkanen, T. Golden, Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era?, *Curr Med Chem*, 9 (2002) 2055-2075.
- [18] T. Noguchi, D.F. Hwang, O. Arakawa, H. Sugita, Y. Deguchi, Y. Shida, K. Hashimoto, *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*, *Marine Biology*, 94 (1987) 625-630.
- [19] J.W. Daly, Ernest Guenther Award in Chemistry of Natural Products. Amphibian Skin: A Remarkable Source of Biologically Active Arthropod Alkaloids, *Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (2003).
- [20] X. LÌ, J.C. Eisenach, Nicotinic Acetylcholine Receptor Regulation of Spinal Norepinephrine Release, *Anesthesiology*, 96 (2002) 1450-1456.
- [21] Y.S. Chan, R.C.F. Cheung, L. Xia, J.H. Wong, T.B. Ng, W.Y. Chan, Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 100 (2016) 6165-6181.
- [22] J.B. Harris, A. Goonetilleke, Animal poisons and the nervous system: what the neurologist needs to know, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75 Suppl 3 (2004) iii40-46.
- [23] K. Luna-Ramirez, V. Quintero-Hernandez, L. Vargas-Jaimes, C.V. Batista, K.D. Winkel, L.D. Possani, Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoii*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity, *Toxicon*, 63 (2013) 44-54.
- [24] F.G. Amorim, H.T. Longhim, C.T. Cologna, M. Degueldre, E. Pauw, L. Quinton, E.C. Arantes, Proteome of fraction from *Tityus serrulatus* venom reveals new enzymes and toxins, *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 25 (2019) e148218.
- [25] X.C. Zeng, F. Luo, W.X. Li, Molecular dissection of venom from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii*: identification and characterization of four novel disulfide-bridged venom peptides, *Peptides*, 27 (2006) 1745-1754.
- [26] A. Almaaytah, Q. Albalas, Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review, *Peptides*, 51 (2014) 35-45.
- [27] M. Goyffon, J.N. Tournier, Scorpions: a presentation, *Toxins (Basel)*, 6 (2014) 2137-2148.
- [28] S. Ahmadi, J.M. Knerr, L. Argemi, K.C.F. Bordon, M.B. Pucca, F.A. Cerni, E.C. Arantes, F. Caliskan, A.H. Laustsen, Scorpion Venom: Detriments and Benefits, *Biomedicines*, 8 (2020).
- [29] J.M. Jimenez-Vargas, R. Restano-Cassulini, L.D. Possani, Toxin modulators and blockers of hERG K(+) channels, *Toxicon*, 60 (2012) 492-501.

- [30] J.I. Cid-Urbe, J.I. Veytia-Bucheli, T. Romero-Gutierrez, E. Ortiz, L.D. Possani, Scorpion venomics: a 2019 overview, *Expert Rev Proteomics*, 17 (2020) 67-83.
- [31] T. Romero-Gutierrez, E. Peguero-Sanchez, M.A. Cevallos, C.V.F. Batista, E. Ortiz, L.D. Possani, A Deeper Examination of *Thorellius atrox* Scorpion Venom Components with Omic Technologies, *Toxins (Basel)*, 9 (2017).
- [32] L. Dardevet, D. Rani, T.A. Aziz, I. Bazin, J.M. Sabatier, M. Fadl, E. Brambilla, M. De Waard, Chlorotoxin: a helpful natural scorpion peptide to diagnose glioma and fight tumor invasion, *Toxins (Basel)*, 7 (2015) 1079-1101.
- [33] B.S. PS Roy, Cancer and cure: A critical analysis, *Indian Journal of Cancer*, 53 (2016) 441-442.
- [34] A. Tompa, J. Major, M. G, Application of UV-Induced Unscheduled DNA-Synthesis Measurements in Human Genotoxicological Risk Assessment, *DNA Repair and Human Health* 2011.
- [35] R.A.W. Douglas Hanahan, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100 (2000) 57–70.
- [36] D.E. Malarkey, M. Hoenerhoff, R.R. Maronpot, Carcinogenesis, Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology 2013, pp. 107-146.
- [37] L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, Global cancer statistics, 2012, *CA Cancer J Clin*, 65 (2015) 87-108.
- [38] A.G.T. Al-Ziyadi, The Mono and Combined Anti-Proliferative Activity of D-Mannoheptulose and Newcastle Disease Virus Against Breast Cancer Cell Lines Targeting Glycolysis Inhibition, Nahrain University, 2020.
- [39] K.K. Bozkurt, Ö. Durak, İ.M. Çiriş, N. Kapucuoğlu, T. Devrim, Meme Kanserinde Moleküler Alt Tiplerin Klinikopatolojik Özelliklerle İlişkisi, *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, (2021).
- [40] A. Ahmad, Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance, in: A. Ahmad (Ed.) *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- [41] P. Kischel, A. Girault, L. Rodat-Despoix, M. Chamlali, S. Radoslavova, H. Abou Daya, T. Lefebvre, A. Foulon, P. Rybarczyk, F. Hague, I. Dhennin-Duthille, M. Gautier, H. Ouadid-Ahidouch, Ion Channels: New Actors Playing in Chemotherapeutic Resistance, *Cancers (Basel)*, 11 (2019).
- [42] A. Diaz-Garcia, D. Varela, Voltage-Gated K(+)/Na(+) Channels and Scorpion Venom Toxins in Cancer, *Front Pharmacol*, 11 (2020) 913.
- [43] W.X. Wang, Y.H. Ji, Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro, *J Neurooncol*, 73 (2005) 1-7.
- [44] G.P.G. Alexis Díaz-García, Tais Basaco Bernabeu, Juan C. Rodríguez Aurrecochea, Hermis Rodríguez Sánchez, Iraida, M.H.G. Sánchez Monzón, Caridad Rodríguez Torres,

Maria Regla Rodríguez Capot and Irania Guevara Orellanes, Pharmacokinetics and Biodistribution of *Rhopalurus junceus* Scorpion Venom in Tumor-Bearing Mice after Intravenous and Oral Administration, *Iranian Biomedical Journal*, 23 (2019) 287-296

[45] A. Diaz-Garcia, J.L. Ruiz-Fuentes, Y. Frion-Herrera, A. Yglesias-Rivera, Y.R. Garlobo, H.R. Sanchez, J.C.R. Aurrecochea, L.X. Lopez Fuentes, *Rhopalurus junceus* scorpion venom induces antitumor effect in vitro and in vivo against a murine mammary adenocarcinoma model, *Iran J Basic Med Sci*, 22 (2019) 759-765.

[46] D. Aissaoui, S. Mlayah-Bellalouna, J. Jebali, Z. Abdelkafi-Koubaa, S. Souid, W. Moslah, H. Othman, J. Luis, M. ElAyeb, N. Marrakchi, K. Essafi-Benkhadir, N. Srairi-Abid, Functional role of Kv1.1 and Kv1.3 channels in the neoplastic progression steps of three cancer cell lines, elucidated by scorpion peptides, *Int J Biol Macromol*, 111 (2018) 1146-1155.

[47] S.H. Jang, S.Y. Choi, P.D. Ryu, S.Y. Lee, Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and in vivo, *Eur J Pharmacol*, 651 (2011) 26-32.

[48] B. Ramirez-Cordero, Y. Toledano, P. Cano-Sanchez, R. Hernandez-Lopez, D. Flores-Solis, A.L. Saucedo-Yanez, I. Chavez-Uribe, L.G. Briebe, F. del Rio-Portilla, Cytotoxicity of recombinant tamapin and related toxin-like peptides on model cell lines, *Chem Res Toxicol*, 27 (2014) 960-967.

[49] L. Moreels, S. Peigneur, Y. Yamaguchi, K. Vriens, E. Waelkens, S. Zhu, K. Thevissen, B.P.A. Cammue, K. Sato, J. Tytgat, Expanding the pharmacological profile of kappa-hefutoxin 1 and analogues: A focus on the inhibitory effect on the oncogenic channel Kv10.1, *Peptides*, 98 (2017) 43-50.

[50] M.P. Escalona, C.V. Batista, R.R. Cassulini, M.S. Rios, F.I. Coronas, L.D. Possani, A proteomic analysis of the early secondary molecular effects caused by Cn2 scorpion toxin on neuroblastoma cells, *J Proteomics*, 111 (2014) 212-223.

[51] S. Kampo, B. Ahmmed, T. Zhou, L. Owusu, T.W. Anabah, N.R. Doudou, E.D. Kuugbee, Y. Cui, Z. Lu, Q. Yan, Q.P. Wen, Scorpion Venom Analgesic Peptide, BmK AGAP Inhibits Stemness, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Down-Regulating PTX3 in Breast Cancer, *Front Oncol*, 9 (2019) 21.

[52] R. BenAissa, H. Othman, C. Villard, S. Peigneur, S. Mlayah-Bellalouna, Z. Abdelkafi-Koubaa, N. Marrakchi, K. Essafi-Benkhadir, J. Tytgat, J. Luis, N. Srairi-Abid, AaHIV a sodium channel scorpion toxin inhibits the proliferation of DU145 prostate cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 521 (2020) 340-346.

[53] A.G. Mikaelian, E. Traboulay, X.M. Zhang, E. Yeritsyan, P.L. Pedersen, Y.H. Ko, K.Z. Matalka, Pleiotropic Anticancer Properties of Scorpion Venom Peptides: *Rhopalurus princeps* Venom as an Anticancer Agent, *Drug Des Devel Ther*, 14 (2020) 881-893.

[54] J. Deshane, C.C. Garner, H. Sontheimer, Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2, *J Biol Chem*, 278 (2003) 4135-4144.

- [55] I. Rjeibi, K. Mabrouk, H. Mosrati, C. Berenguer, H. Mejdoub, C. Villard, D. Laffitte, D. Bertin, L. Ouafik, J. Luis, M. Elayeb, N. Srairi-Abid, Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom, *Peptides*, 32 (2011) 656-663.
- [56] S. Fan, Z. Sun, D. Jiang, C. Dai, Y. Ma, Z. Zhao, H. Liu, Y. Wu, Z. Cao, W. Li, BmKCT toxin inhibits glioma proliferation and tumor metastasis, *Cancer Lett*, 291 (2010) 158-166.
- [57] R.-L.M. Yan-Feng Liu, Si-Ling Wang, Zi-Yuan Duan, Jin-Hai Zhang, Li-Jun Wu, Chun-Fu Wuc, Expression of an antitumor–analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii* karsch in *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, 27 (2003) 253–258.
- [58] A. Schwab, P. Hanley, A. Fabian, C. Stock, Potassium channels keep mobile cells on the go, *Physiology (Bethesda)*, 23 (2008) 212-220.
- [59] B.M. Schickling, S.K. England, N. Aykin-Burns, L.A. Norian, K.K. Leslie, V.P. Frieden-Korovkina, BKCa channel inhibitor modulates the tumorigenic ability of hormone-independent breast cancer cells via the Wnt pathway, *Oncol Rep*, 33 (2015) 533-538.
- [60] N.-S. CHANG, Transforming growth factor- β protection of cancer cells against tumor necrosis factor cytotoxicity is counteracted by hyaluronidase (Review), *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*, 2 (1998) 653-659.
- [61] D.-C.W. Hong-Min Li, Zong-Hao Zeng, Lei Jin and Ren-Qiu Hu, Crystal Structure of an Acidic Neurotoxin from Scorpion *Buthus martensii* Karsch at 1.85 Å Resolution, *J. Mol. Biol.*, 261 (1996) 415–431.
- [62] F. Caliskan, B.I. Garcia, F.I. Coronas, C.V. Batista, F.Z. Zamudio, L.D. Possani, Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes, *Toxicon*, 48 (2006) 12-22.
- [63] J. Zargan, S. Umar, M. Sajad, M. Naime, S. Ali, H.A. Khan, Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7), *Toxicol In Vitro*, 25 (2011) 1748-1756.
- [64] G. D'Suze, A. Rosales, V. Salazar, C. Sevcik, Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line, *Toxicon*, 56 (2010) 1497-1505.
- [65] A.K. Al-Asmari, A. Riyasdeen, M. Islam, Scorpion Venom Causes Apoptosis by Increasing Reactive Oxygen Species and Cell Cycle Arrest in MDA-MB-231 and HCT-8 Cancer Cell Lines, *J Evid Based Integr Med*, 23 (2018) 2156587217751796.
- [66] E. Bernardes-Oliveira, K.J.S. Farias, D.L. Gomes, J.M.G. de Araujo, W.D. da Silva, H.A.O. Rocha, E.A. Donadi, M.F. Fernandes-Pedrosa, J.C.O. Crispim, *Tityus serrulatus*

Scorpion Venom Induces Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019 (2019) 5131042.

[67] R.A. Duenas-Cuellar, C.J.C. Santana, A.C.M. Magalhaes, O.R. Pires, Jr., W. Fontes, M.S. Castro, Scorpion Toxins and Ion Channels: Potential Applications in Cancer Therapy, *Toxins (Basel)*, 12 (2020).

[68] A.W.L. Scott W.Lowe, Apoptosis in cancer, 21 (2000) 485–495.

[69] E.C. LaCasse, D.J. Mahoney, H.H. Cheung, S. Plenchette, S. Baird, R.G. Korneluk, IAP-targeted therapies for cancer, *Oncogene*, 27 (2008) 6252-6275.

[70] R.S. Wong, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30 (2011).

[71] V. Kuete, O. Karaosmanoğlu, H. Sivas, Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables, *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* 2017, pp. 271-297.

[72] S. Sakamuru, M.S. Attene-Ramos, M. Xia, Mitochondrial Membrane Potential Assay, *Methods Mol Biol*, 1473 (2016) 17-22.

[73] Y. Frion-Herrera, A. Diaz-Garcia, J. Ruiz-Fuentes, H. Rodriguez-Sanchez, J.M. Sforcin, Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway, *J Pharm Pharmacol*, 67 (2015) 1448-1456.

[74] J.L.R.-F. Alexis Díaz-García, HermisRodríguez-Sánchez, José A Fraga Castro, *Rhopalurus junceus* scorpion venom induces apoptosis in the triple negative human breast cancer cell line MDA-MB-231, *Journal of Venom Research*, Vol 8 (2017) 9-13.

[75] F. Caliskan, E. Ergene, I. Sogut, I. Hatipoglu, A. Basalp, H. Sivas, G. Kanbak, Biological assays on the effects of Acra3 peptide from Turkish scorpion *Androctonus crassicauda* venom on a mouse brain tumor cell line (BC3H1) and production of specific monoclonal antibodies, *Toxicon*, 76 (2013) 350-361.

[76] K.F. N'Guessan, P.H. Patel, X. Qi, SapC-DOPS - a Phosphatidylserine-targeted Nanovesicle for selective Cancer therapy, *Cell Commun Signal*, 18 (2020) 6.

[77] R.S. Wong, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *J Exp Clin Cancer Res*, 30 (2011) 87.

[78] R. Singh, S. Pervin, G. Chaudhuri, Caspase-8-mediated BID cleavage and release of mitochondrial cytochrome c during Nomega-hydroxy-L-arginine-induced apoptosis in MDA-MB-468 cells. Antagonistic effects of L-ornithine, *J Biol Chem*, 277 (2002) 37630-37636.

[79] S.D. Gupta, A. Gomes, A. Debnath, A. Saha, A. Gomes, Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins, *Chem Biol Interact*, 183 (2010) 293-303.

[80] M. Moradi, R. Najafi, R. Amini, R. Solgi, H. Tanzadehpanah, A.M. Esfahani, M. Saidijam, Remarkable apoptotic pathway of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom on CT26 cell line, *Cell Biol Toxicol*, 35 (2019) 373-385.

[81] M.A. Orhan ALTINKURT, Urfa Yöresi Akrep (*Androctonus crassicauda*) Zehirinin Deney Hayvanlarındaki Farmakolojik Etkileri İle Bu Etkilerden Bir Çoğuna Streptomisin'in Antagonistik Cevapları, *Ankara Ecz. Fak. Mec.*, 10 (1980) 41.

[82] F. Caliskan, V. Quintero-Hernandez, R. Restano-Cassulini, F.I. Coronas-Valderrama, G. Corzo, L.D. Possani, Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na(+)-channel alpha-type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom, *Biochimie*, 95 (2013) 1216-1222.

