

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***MESOBUTHUS GIBBOSSUS* (SCORPIONES: BUTHIDAE) AKREP HAM
ZEHRİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİNİ KULLANARAK
MCF-7 MEME KANSER HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ONUR BÜYÜKKARTAL

EKİM 2018

Biyoloji Anabilim Dalında Onur BÜYÜKKARTAL tarafından hazırlanan “*Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae) Akrep Ham Zehrinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemini Kullanarak MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof.Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN

Danışman

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof.Dr. Nursel GÜL

Üye (Danışman) : Prof.Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN

Üye: : Prof.Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

15/09/2018

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof.Dr. Recep ÇALIN

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

MESOBUTHUS GIBBOSSUS (SCORPIONES: BUTHIDAE) AKREP HAM ZEHİRİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİNİ KULLANARAK MCF-7 MEME KANSER HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BÜYÜKKARTAL, Onur

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof.Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN

Ekim 2018, 56 sayfa

Bu çalışmada, *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae) türü akrepler araziden canlı olarak toplanarak laboratuvara getirilmiş ve zehir elde etmek için beslenmiştir. Canlı akreplerden belirli aralıklarla elektrositimülasyon tekniği kullanılarak edilen ham zehirin, iki kanser hücre hattı (MCF-7 meme kanseri ve A549 akciğer karsinomu) ve normal fare fibroblast (L929) hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak incelendi. MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinde düşük dilüsyonlarda dahi zehrin etkili olduğu, dilüsyon miktarı arttıkça zehir etkisinin azaldığı ve hücre proliferasyonuna etki yapmadığı gözlemlendi. Aynı yöntemle A549 akciğer karsinomu hücreleri üzerine zehrin antiproliferasyon etkisi çok daha zayıf olarak gözlemlendi. *M. gibbosus* akrep zehri her ne kadar farklı yöntemler kullanılarak kanser hücre hatları üzerine denenmiş olsa da, bu çalışmada ilk kez gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak antiproliferatif etkisi gösterilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akrep Zehri, Kanser, Anti-Tümör, Hücre Proliferasyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS OF CRUDE SPIDER VENOM OF *AGELENA LABYRINTHICA* ON THE MCF-7 BREAST CANCER CELL LINE BY USING REAL TIME CELL ANALYZING SYSTEM

BÜYÜKKARTAL, Onur

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN

October 2018, 56 pages

In this study, *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae) alive scorpion species were collected from field studies and they were fed to obtain crude venom. Various dilutions of crude venom obtained from scorpion by means of electrostimulation technique were tested on two type cancer cells (MCF-7 breast cancer and A549 lung carcinoma cell line) and L929 fibroblast cells, and then anti-proliferative effects on these cell lines were examined. At the end of the present study, it was determined that mcf-7 and fibroblast cells were more effective at low dilutions of venom doses than A549. It was observed that the amount of dilution decreased the venom effect on the cells. Although *M. gibbosus* scorpion venom has been tried on cancer cell lines by using different methods, the antiproliferative effect of this study was first time tried to be demonstrated by using real-time cell analysis system.

Keywords: Scorpion Venom, Cancer, Anti- Tumor, Cell Proliferation

TEŐEKKÖR

Bu tez alıőmasında bana her tŒrlŒ imkanı sağlayan engin bilgi ve tecrŒbeleri ile bana her zaman yol gŒsteren, çalışma azmi ve baőarılarıyla her daim örnek aldığım sayęı değer hocam Prof. Dr. Nazife Yiğit Kayhan'a teőekkŒr eder ve sayęılarımı sunarım.

TŒm hayatım boyunca olduğu gibi tez çalıőmamın bitimine kadar maddi ve manevi desteklerini bir an olsun esirgemeyen annem Leyla BŒyŒkkartal'a ve babam Ferhat BŒyŒkkartal'a Őukranlarımı sunarım.

Ayrıca kardeőim Sıla BŒYŒKKARTAL'a yardımlarından dolayı teőekkŒr ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1. Akreplerin Biyolojisi ve Ekolojisi	2
1.2 Üreme ve Gelişmeleri.....	5
1.2.1.Çiftleşmeleri	5
1.2.2. Gebelikleri ve Embriyolojik Gelişimi	7
1.2.3 Doğumları	9
1.2.3.4 Yavruların Gelişimi	12
1.2.3.4.5 Gömlek Değişimi	13
1.3 Duyusal Yapıları.....	14
1.4 Akreplere Özgü Özellikler	15
1.4.1 Floresans Özelliği	15
1.4.2 Kütikula Yapısı Ve Metaller.....	16
1.4.3 Radyasyon Direnci (Radyoresistans).....	16
1.4.4 Venom (Zehirleri).....	16
1.4.5 Venom Eldesi.....	17
1.5.1 Morfolojisi	20
1.5.2 Biyolojisi.....	20
1.5.3 Habitat.....	21

1.6. Kanserin Özellikleri.....	21
1.6.1 Kanser Nedeni	22
1.7. Kanser Ve Tedavi Yöntemleri.....	22
1.7.1. Akrep Toksini Ve Kanser	23
1.7.2. Akrep Toksini ve Glioma	24
1.7.3. Akrep Toksini ve Lösemi	24
1.7.4. Akrep Toksini ve Meme Kanseri.....	25
1.7.5. Akrep Toksini ve Beyin Kanseri	25
1.7.6. Akrep Zehiri ve Prostat Kanseri	26
1.7.7. Akrep Toksini ve Cilt, Akciğer, Özefagal, Servikal Ve Kolon Kanseri.....	26
1.7.8. Akrep Zehiri Ve İnsan Akciğer Adenokarsinoma	27
1.7.9. Akrep Zehiri Ve Melanoma.....	27
2. MATERYAL VE METOD	28
2.1. Arazi Çalışmaları ve Akrep Zehirlerinin Toplanması.....	28
2.1.1. Arazi Çalışması ve Tür Teşhisi.....	28
2.1.2. Elektriksel Uyarı (Elektrostimülasyon) Tekniği İle Akrep Ham Zehrinin Sağılması.....	30
2.1.3. Akrep Ham Zehrinin Protein İçeriğinin Belirlenmesi	31
2.1.4. Testler İçin Akrep Ham Zehrinin Hazırlanması	32
2.2 Akrep Zehrinin Hücre Kültüründe Uygulanması	32
2.2.1. MTT testi ile sitotoksitenin belirlenmesi	33
2.2.2. İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi	33
2.2.3. Gerçek Zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre proliferasyonunun belirlenmesi.....	34
3. BULGULAR.....	36
3.1. Arazi Gözlemleri	36

3.2. Ham Zehrin Hücrelere Uygulanması.....	38
3.2.1. MTT testi sonuçları.....	38
3.2.2. Apoptotik nekrotik indeks sonuçları.....	41
3.2.3. Gerçek Zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre proliferasyonunun belirlenmesi.....	46
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
KAYNAKLAR	51



1.1 Bir akrebin vücut kısımlarının gösterimi (http://www.floridiannature.com/scorpions.htm).....	4
1.2 Erkek ve dişinin çiftleşme öncesi pedialpleri ile birbirlerini kavramaları.....	6
1.3 Akrep embriyoları (<i>Parabuthus sp.</i>) (Ythier, 2003).	8
1.4 Akrep (<i>Opisthophthalmus laevipes</i>) embriyosu (Visser, 2008a).	9
1.5 Akrepte doğum pozisyonu (Hjelle, 1974).	10
1.6 Akrepte Doğum (<i>Uroplectes sp.</i>) (Visser, 2008b).	10
1.7 Akrepte doğum (<i>Uroplectes sp.</i>) (Visser, 2008b).	11
1.8 Doğan yavruların doğum kesesinden kurtularak annelerin sırtına çıkışı (Lourenço, 2000).	11
1.9 Ayrılan yavruların anneleri tarafından sırta alınışı(Lourenço, 2000b)	13
1.10 Gömlek değişimini tamamlamış akrep (B) gömlek (A).....	14
1.11 Akreplerin savunma ve beslenmede kullandıkları içinde oval armut şeklinde zehir bezinin bulunduğu son segment telson	18
1.12 Elektrik akımı ile istem dışı olarak elde edilen şeffaf venomun görünüş (Ö. Özcan)	18
1.13 Anadolu sarı akrebi (google).....	20
2.1 Çalışmamızda kullandığımız akreplerden biri beslenirken.....	29
2.2 Canlı besin için kullanılan un kurdu kültürümüzün görüntüsü.....	30
2.3 Elektrostimülasyon tekniği ile akrep zehri sağımak için kullanılan düzeneğin görüntüsü.....	31
2.4 Kalibrasyon eğrisi (x eksenini protein konsantrasyonu , y eksenini ise absorbans değerlerini göstermektedir)	32
3.1 Arazi alanlarından birinin genel görüntüsü.....	36
3.2 <i>M.gibbosus</i> akrebinin arazide taş altında bulunduğu pozisyon (oklar).....	37
3.3 <i>M.gibbosus</i> 'un dorsal ve ventral genel görüntüsü	38
3.4 İkili boyama ile MCF-7 hücrelerinde apoptoz ve nekrozun gösterilmesi	42
3.5 İkili boyama ile A549 hücrelerinde apoptoz ve nekrozun gösterilmesi.....	45
3.6 MCF-7 hücrelerine ait proliferasyon grafiği	46
3.7 L929 fibroblast hücrelerine ait proliferasyon grafiği	47
3.8 A549 hücrelerine ait proliferasyon grafiği	48

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

3-1 MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri	39
3-2 L929 hücrelerine ait % canlılık değerleri	40
3-3 A549 hücrelerine ait % canlılık değerleri	40
3-4 MCF-7 hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks değerleri.....	41
3-5 L929 Fibroblast hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks oranları	43
3-6 A549 hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks değerleri	44



1. GİRİŞ

Kanser, sık görülmesi ve ölüm oranının yüksek olması nedeniyle 21. yüzyılın temel sağlık sorunlarından biridir [1]. Günümüzde tüm dünya ülkeleri için büyük sorun teşkil eden hastalıkların başında da kanser gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumunun (IARC) 2030 yılı için öngörüsü, kanserin ölüm nedenleri arasında birinci sırada olacağı yönündedir [2]. Türkiye’de ise kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra %15 ile en sık görülen ikinci ölüm nedenidir ve ölüm nedenleri arasındaki oranı giderek artmaktadır [3].

Organ ve dokular oluşurken hücreler belirli bir düzen içinde, belirli iş bölümleri yaparak bir araya gelirler. Organizmanın temel birimi olan bu hücreler belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar. Öte yandan yaşlanan hücrelerde belirli bir hızda yıkılmaktadırlar. Kanser en kısa tanımı ile hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları demektir. Bu çoğalma sırasında kanser hücresinde, normal hücrelere göre yapısal farklılıklar çıktığı gibi, işlevleri açısından da farklılıklar çıkacaktır; bazen hücre normalde yaptığı işlevlerini yapmazken, bazen de normalde olmayan bazı yeni işlevleri de yapmaya başlayabilecektir. Anormal şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler buldukları yerdeki doku ve organları işgal edecek hatta daha uzaktaki organları işgal edecek ve işgal ettiği bu bölümlerin görevlerini engelleyecektir. Hücre kontrolünün bozulup bir hastalık olarak kanser tablosu çıkıncaya kadar geçen kanser oluşum süresi, kanser çeşitlerine göre değişiklik göstermekle birlikte ortalama 15-20 yıldır. Sebebi iyi bilinmeyen bu hastalıkların oluş mekanizması da tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu konuda son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. Kanserler köken aldıkları doku ve organlara göre isimlendirilirler. Belirti, bulgu ve tedavileri de kanserin cinsine göre değişmektedir. En sık görülen kanser türleri ise deri, akciğer, meme, sindirim ve üreme sistemlerinden kaynaklanan kanserlerdir [4].

Günümüzde kanser tedavisinde standart kemoterapi yerine biyoterapi yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Monoklonal antikolar, biyotoksinler ve interferonlar gibi biyolojik ajanlara, düşük yan etki potansiyelleri ve güçlü terapötik etkinliklerinden dolayı

yakın gelecekte klasik yöntemlerin yerlerini alacakları gözüyle bakılmaktadır [5]. Hayvansal kaynaklı zehirler ve bileşenleri olan biyotoksinler uzun yıllardır geleneksel Çin tıbbında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Biyotoksin kaynaklarından birisi olan akrepler, zehir bileşimlerindeki farklı toksinler, enzimler, büyüme faktörleri, aktivatörler ve inhibitörler gibi biyoaktif moleküller ile alternatif biyoajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalarda özellikle aranan canlılar durumundadır. Özellikle akrep zehrinde bulunan biyoaktif moleküllerin karsinogenezde kanser önleyici etkilerinin olması araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Bu nedenle, farklı kanser türleri üzerinde çeşitli akreplerin zehirlerinin sitotoksik, antiproliferatif ve anti-kanser özellikleri sıklıkla çalışılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, İç Anadolu Bölgesi'nde geniş bir yayılışa sahip olan bir akrep türü olan *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832) ham zehrinin insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerine değişik konsantrasyonlarda uygulayarak hücre proliferasyonu üzerine etkilerini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi (xCELLigence) kullanarak araştırmaktır. Bunun yanında bu çalışmada, sarıakrep zehrinin sitotoksik, apoptotik ve nekrotik özellikleri de gösterilmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, kontrol grubu olarak düşünülen normal fare fibroblast hücre hattı (ki sağlıklı hücre olarak) ve akciğer kanser hücre hattında (başka bir kanser türü olarak) elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

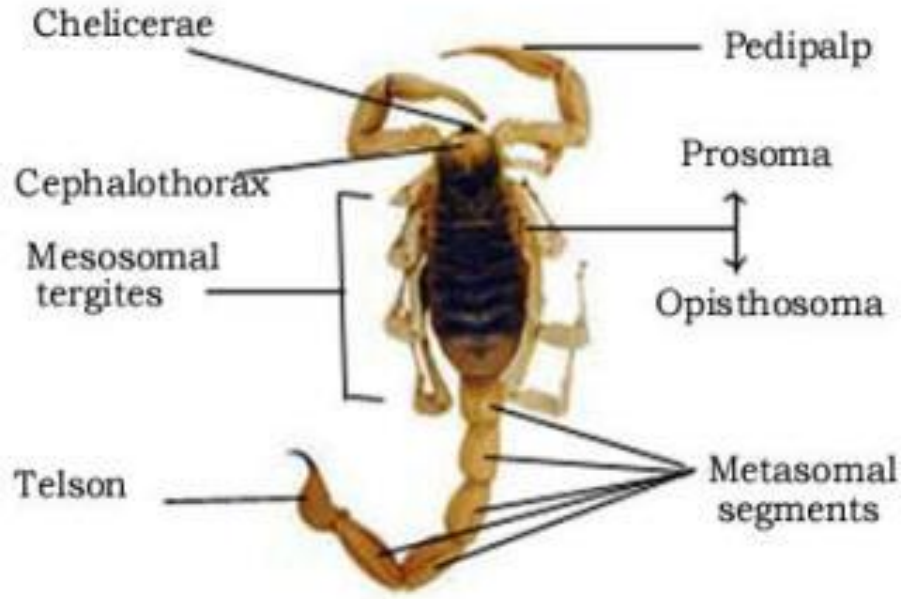
1. Akreplerin Biyolojisi ve Ekolojisi

Akreplerin dünya üzerinde varlığının 420 yıl öncesine dayandığı fosillere bakarak anlaşılmaktadır. Bu dönemlerde yaşamış akreplerin, yengeç görünümünde boyu yaklaşık iki metre olan deniz hayvanı Merostomata'dan köken aldığı ve karaya çıkışlarının Silurian döneminde olduğunu bilinmektedir [6,7].

Akreplerin karada ve denizde yaşadıklarına dair birçok tartışmaya yol açacak düşünce vardır. Yaklaşık 300 milyon yıl önce Karbonifer dönemin sonunda ilk görülen akrep modern akrep neslidir. Bu nesilde günümüze kadar çok az değişiklik olmuştur. Bu

nedenle akrep yaşıyan fosiller olarak nitelendirilmektedirler [6,8]. Birbirine benzerlik gösteren 16 akrep familyası içinde yaklaşık 1.500 kadar türün günümüze kadar nesillerini devam ettirdiklerini bilmekteyiz. Tüm akrepler zehre sahiptir ve zehirlidir. Ancak bunlardan yaklaşık 50 türün zehri insanlar için tehlikeli olmakla birlikte tıbbi önlemleri vardır [9]. Akrepler genellikle tropikal ve subtropikal iklim kuşaklarında yaygın olmakla birlikte Yeni Zelanda ve Okyanus adaları hariç tüm Dünyaya yayılıp, yerleşmişlerdir [10,11]. Akrepler karakteristik yapıları ile çok kolay tanınan ve uzunlukları 13-220 mm arasında değişen arthropodlardır [12]. Akrepler yaşadıkları ortama uyum sağlamak adına saman renginden sarıya, açık kahverenginden siyaha kadar değişen renk tonlarına sahiptirler [13].

Vücutları, sefalothoraks (prosoma) ve abdomen (opisthosoma) olmak üzere iki bölümden oluşmuştur. Sefalothoraks nispeten kısa, sırt taraftan da yekpare bir zırh (karapaks) ile örtülüdür. Abdomen, preabdomen (mesosoma) ve postabdomen (metasoma) kısımlarına ayrılır. Sefalothoraksa bütün genişliğiyle bağlanan preabdomen yedi geniş segmentten oluşur. Sefalothoraksta dört çift bacak bulunur. Kuyruk ya da postabdomen ise iğne (telson) dahil olmak üzere altı segmentten oluşur. İlk beş segmentin her biri yekpare bir kitin zırhla örtülüdür. Son segment olan telsonun içinde iki zehir bezi, ucunda da bir zehir iğnesi vardır. Zehir bezlerine ait kanallar iğnenin ucunda bulunan deliklerden dışarı açılırlar. Zehir, nörotoksin etkili olup, genellikle avını yakalamada ve sindirimde kullanırlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Bir akrebin vücut kısımlarının gösterimi (<http://www.floridiannature.com/scorpions.htm>).

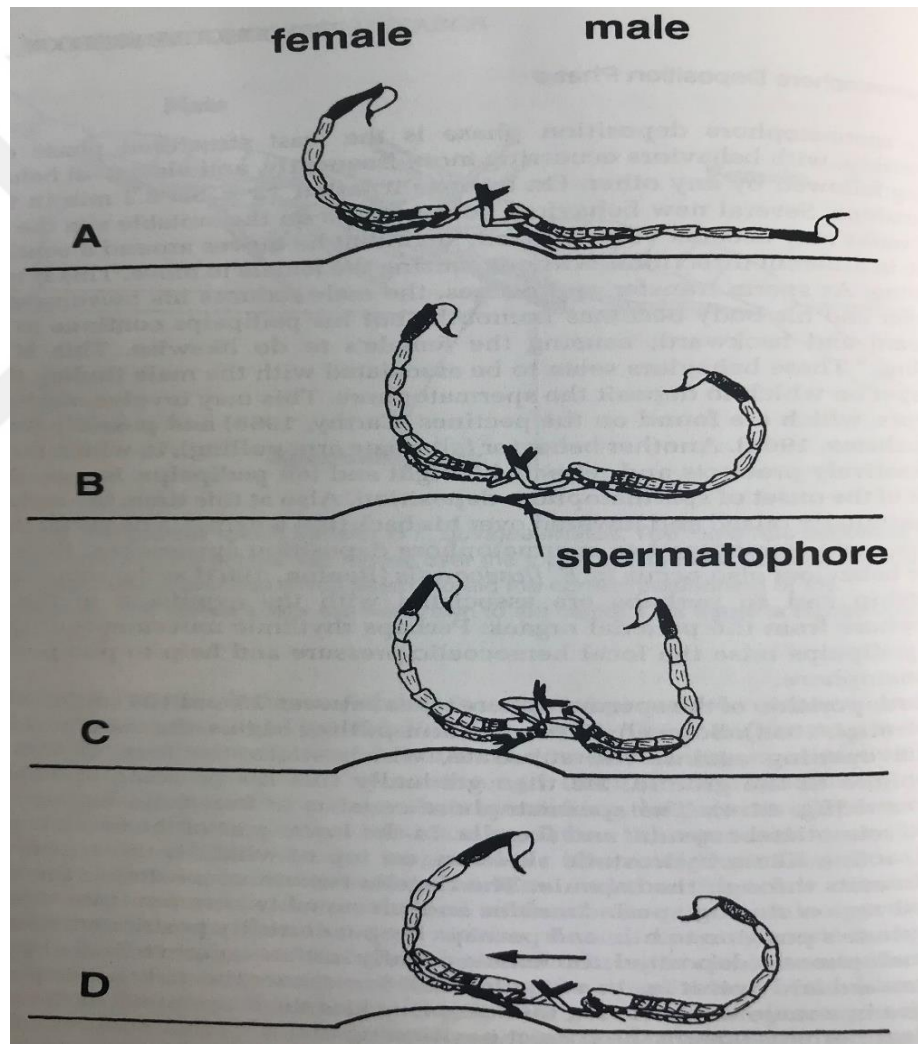
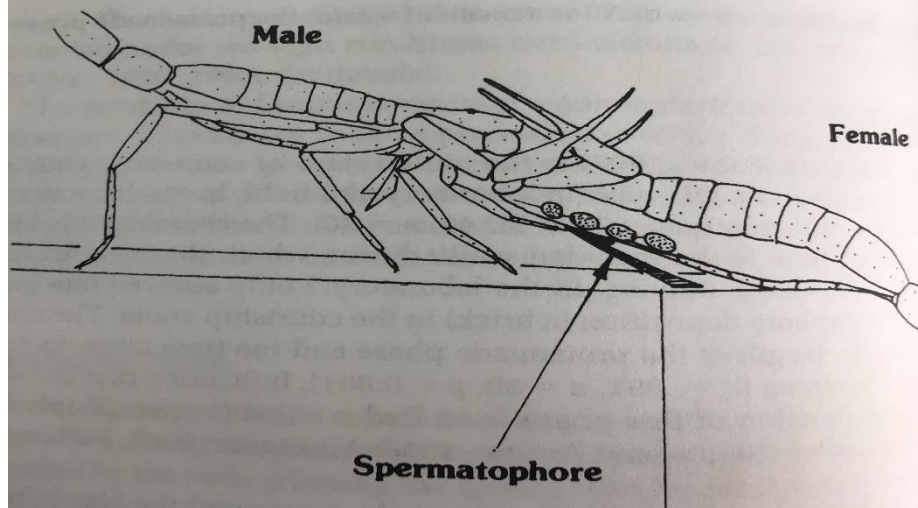
Akrepler, ormanlık bölgelerde, çöllerde, taşlık ve kayalık yerlerde yaşarlar, geceleri aktifleşerek, böcekler ve bazen de küçük rodentlerle beslenirler [14]. Akrepler en zor ortamlarda ve şartlarda hayatta kalma anlamında uzmandırlar. Aylarca hatta iki yıla kadar açlığa dayanıklılığıyla bilinen hayvanlardır. Soğukkanlı hayvanlar arasında metabolik hızları en düşük hayvanlardır. Bu nedenle çok az yiyecek yetinebilip uzun süre yaşamasını beceren hayvan türüdür. Besinlerden aldıkları sıvı nedeniyle uzun süre susuz da yaşayabilirler. Akrepler kısıkaçlarını kullanarak çukur kazarlar bu sayede hem ortamı nemli tutarlar ve kazdıkları bu çukurları da tuzak olarak kullanırlar ve akrepler besine ihtiyaç duymadan bu çukurda uzun süre kalabilirler. Gün içerisinde karanlık yerlerde gizlenen akreplerin kamuflajları yoktur, çoğunlukla geceleri aktif olurlar. Akrepler fiziksel etkenlere karşı son derece dirençlidir. Yırtıcı ve yağmacı tabiatlı olmakla birlikte akrepler avlanma konusunda uzman değillerdir ve yemek konusunda titiz olmayan canlılardır. Hava ve yerden gelen titreşimleri algılayarak avlarının peşine düşmek yerine sabırlı bir şekilde pusuda bekleyerek avlarını avlarlar. Besinleri genellikle böcekler, örümcekler, kırkayak ve un kurtlarıdır. Bunun yanı sıra büyük akrepler küçük

yılanları, kertenkeleleri ve hatta fareleri dahi yiyebilir. Akrepler avlarını kıskaçlarıyla yakalayıp sıkarak ve kemer şeklindeki kuyruğunu avına uzatarak sokan akrep, venomu (zehri) ile böcekleri hemen öldürebilir. Akrepler ne kadar venom salgılayacaklarını avlarına göre belirlerler. Akrepler venomlarını kullanarak avını sokar ve felç ederek öldürür. İnsanları ve büyük hayvanları beslemek amacıyla değil, akreplere rastgele dokunulduğunda veya üzerine basıldığında kendilerini tehlikede hissettikleri için korunmak amaçlı sokarlar [15].

1.2 Üreme ve Gelişmeleri

1.2.1.Çiftleşmeleri

Akreplerin üremeleri ile ilgili iki görüş bulunmaktadır: Çiftleşmek amacıyla erkekler ve dişiler bir araya gelmez. Ancak ilkbaharda çok kısa bir dönemde erkekler, dişileri arayarak dölemeye çalışır. Erkekte sperm bir kese içerisinde oluşur; genellikle sperm kesesi eşey deliğinden dışarı çıkmış vaziyettedir [16]. Bu kese içerisindeki sperm kıskaçları ile alır ve bir dişiyi gördüğü anda onu oyalayarak veya ansızın yakalayıp, kıskaçları ile taşıdığı sperm kesesini dişinin eşey deliğine yapıştırır. Bu olayı gerçekleştirdikten sonra hemen kaçar. Aksi halde ölümden kaçamaz. Zira dişi onu parçalar [16-20]. Çiftleşme ile ilgili diğer bir görüş de şöyledir: Erkek ve dişi akrepler birbirlerini feromon sayesinde bulur. Bunun için tarak organını kullanırlar. İlk hareketi erkek yapar. Erkek akrep, karmaşık bir kur yaparak kendini dişiyeye gösterir. Çiftleşme sırasında, üreme organları karşılaşmaz. Çoğunlukla erkek, dişinin kıskaçlarını yakalar, karşılıklı olarak şiddetli bir şekilde birbirlerini çekerler [17,19,20](Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Erkek ve dişinin çiftleşme öncesi pedipalpleri ile birbirlerini kavramaları (Polis, 2001)

Birleşme sırasında kısıkaçlarını birbirine geçiren erkek ve dişi akrepler dönmeye başlar. Bu olay tıpkı insanların yaptığı dansa benzer. Dans sırasında erkek abdomenini bükerek kuyruğunu olabildiğince ön tarafa doğru uzatır. Kuyruk ucundaki iğnesini kullanarak dişinin abdomen segmentleri arasındaki yumuşak membranı kaşırçasına araştırır [17,20]. Erkek akrep, vücudunun alt tarafında bulunan tarak organını çiftleşmenin başından sonuna kadar titretir ve dönme hareketlerinin sayesinde 15 – 40 cm²'lik bir alan temizlenmiş olur. Dans sırasında erkek, içerdiği yapışkan sayesinde kese tarzındaki sperm paketini yere bırakır [17,19,20].

Bu arada erkek, dişiyi yerdeki spermlerin üzerine bazı manevralar yaptırarak çekmeye çalışır. Bu çekme mücadelesi sırasında dişinin genital deliği yerdeki spermlere değer. Spermler yapışkan olduğu için dişinin genital deliğine yapışır ve yine mücadele sürdüğü için sperm keseciği patlar, spermler genital delikten içeri girme şansını bulurlar. Sonra erkek ve dişi birbirinin canını acıtacak şekilde ayrılırlar. Çiftleşmeleri yaklaşık 45 dakika sürer. Küçük erkek akrep hızlıca kaçar fakat çoğu zaman bu kaçış başarılı olmaz. Erkek akrep, dişi tarafından öldürülür [17,20,21]. Çiftleşmelerin daha çok geceleri ve yeni ay veya ayın olmadığı dönemlerde olduğu bilinmektedir. Yeni doğum yapmış dişi akrepler tekrar çiftleşebildikleri gibi erkek akreplerde fazla sayıda çiftleşme yeteneğine sahiptir, bu nedenle erkek akrep çok kısa sürede yeni sperm keseciği üretebilir [21].

1.2.2. Gebelikleri ve Embriyolojik Gelişimi

Dişiler, spermleri bazen yumurtaları dölleninceye kadar biriktirebilirler. Örneğin; *Isometrus maculatus* gibi türler tek çiftleşme ile birkaç doğum doğabilir. Dişi akrebin vücudunun içindeki kuluçka odasında, döllenmiş yumurtalar içinde embriyolar gelişir. Akreplerde embriyolojik gelişim iki farklı yolla sağlamaktadır: Apoikogenikal gelişimde ovum ve kese vardır ve yavru kapalı membran içinde doğar. Katoikogenikal gelişimde ise kese bulunmaz ve yavru membransız doğar. *Centruroides* gibi apoikogenikal gelişim

gösteren türlerde bile ova keseden beslense dahi gelişen embriyo bazı besinleri direkt olarak annenin sisteminden alır [17,20-22].

Embriyonun, ovariterus ile direkt temasta olduğu apoikogenik gelişimden farklı olarak katoikogenik gelişimde, gelişen embriyo dişi ovariterusundan kaynaklanan özel bir divertikül aracılığıyla tüm besinleri alır. Bazı yerlerde apoikogenikal gelişim gösteren akrelerin ovoviviparous olarak kabul edilmesine karşın apoikogenik embriyoların bazı besinleri; anne sisteminden alması nedeniyle, tüm akreler viviparous olarak düşünülmektedir [20].

Yumurtalık içinde gelişmenin ilk safhasında sekiz segmentli olan preabdomenin ilk yedi segmentinde sonradan kaybolan ekstremite taslaklarını meydana getirir (Şekil 1.3,4). Gebelikleri oldukça uzun zaman alır, birkaç ay sürdüğü gibi birkaç yılda sürebilir [17,20,24].



Şekil 1.3 Akrep embriyoları (*Parabuthus sp.*) (Ythier, 2003).

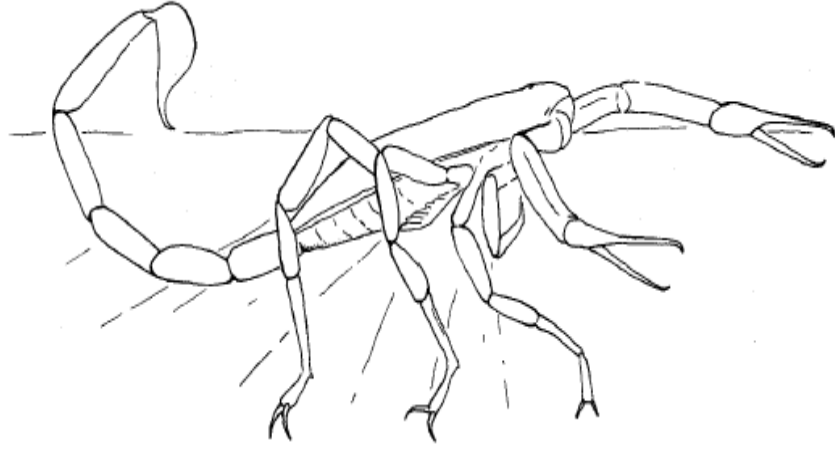


Şekil 1.4 Akrep (*Opisthophthalmus laevipes*) embriyosu (Visser, 2008).

1.2.3 Doğumları

Yavrular, annelerinin vücudunda 7-12 ay kalarak gelişir, genellikle ilkbahar/yaz aylarında dünyaya gelirler. Fakat tropikal iklimlerde türe bağlı olarak yıl içerisinde kendi tercih ettikleri aylarda doğururlar [17,21, 23]. Dişi akrepler doğum başlangıcından birkaç saat önce kendilerini doğum yapacakları şekli ve pozisyonunu ayarlarlar. Bu şekil ve pozisyon türlere göre değişiklik gösterir, genellikle son iki çift bacaklar karın ve vücudun ön kısmını yerden yükselterek sağlar [24].

İlk iki çift bacaklar havada serbest olarak bulunur (Şekil 1.5). Pedipalpler vücuttan uzak ve bükük vaziyettedir. Doğum esnasında hareket etmeleri gerekirse bu pozisyonu korurlar [24].



Şekil 1.5 Akrepte doğum pozisyonu (Hjelle, 1974).

Doğum; doğum süresi yavru sayısına, büyüklüğüne ve türlere göre değişkenlik göstermekle birlikte saatlerce hatta günlerce sürebilmektedir. Birinci çift bacakların birleşme noktasında doğum sepeti (Birth basket) içerisinde bulunan yavrular, genital operculumun açılmasıyla birer birer dışarı çıkarlar. Doğan yavrular bir zarla kaplıdır (Şekil 1.6,7) [16,18,20-26].



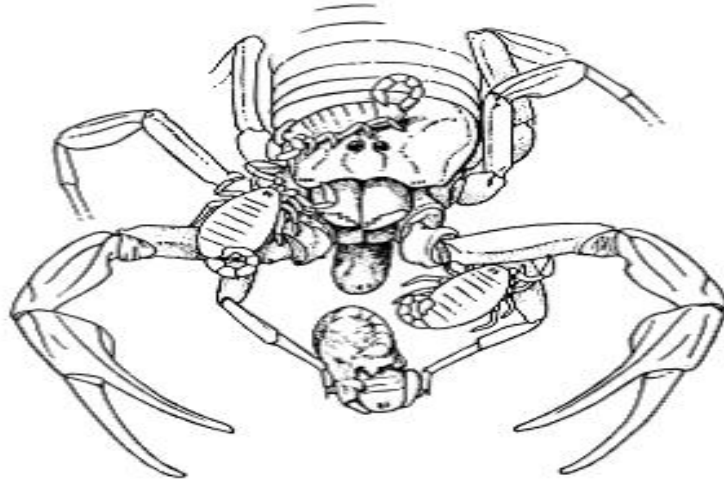
Şekil 1.6 Akrepte Doğum (*Uroplectes sp.*) (Visser, 2008b).

Doğumdan hemen sonra ya yavrular tarafından ya da annelerin yardımıyla bu zardan kurtulurlar şekildeki gibi;



Şekil 1.7 Akrepte doğum (*Uroplectes sp.*) (Visser, 2008b).

Doğum pozisyonunu devam ettiren dişi akrep birinci çift bacaklarını kullanarak yavruların zardan kurtulmasına yardım eder ve yavruların anında annelerin sırtına çıkarlar (Şekil 1.8) (20,21).



Şekil 1.8 Doğan yavruların doğum kesesinden kurtularak annelerin sırtına çıkışı (Lourenço, 2000b).

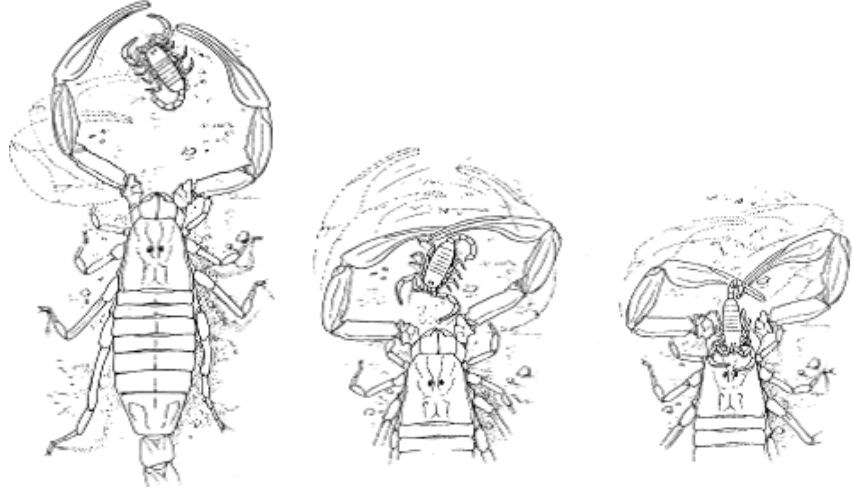
Doğum sepetinden yavrular baş önde, kuyruk önde, sağ yan geliş veya sol yan geliş gibi pozisyonlarda doğabilmektedir. Ancak genellikle yavrular baş önde, kuyruk önde ya da sağ yan geliş pozisyonunda doğarlar. Türe bağlı olarak 3–4 yavrudan 110 yavruya kadar değişkenlik gösterebilmektedir. Yavrular bir batında doğdukları için cinsiyet oranları genellikle 1:1 olur. Ancak bazı türlerde cinsiyet oranı 3:1 ya da 4:1 (dişi:erkek) oranında da olabilmektedir [16-18, 20, 25].

1.2.3.4 Yavruların Gelişimi

Akrelerin doğan yavruları annelerinin yardımıyla sırtına doğru çıkarlar. Neonatal veya birinci instar akrep yavruları doğdukları an akrepten ziyade, çok toplu beyaz cisimcikler gibi, ince kıskaçlı, bacaklı ve bir kuyruklu büyük sinek kurtçukları gibi görünür. Bu dönem içerisinde annelerinden düşen yavrular tekrar annelerinin sırtına çıkmadıklarında su kaybı sonucu ölür. Yavruların gelişmeleri iki farklı döneme ayrılır pro-juvenil ve juvenil olarak, anne sırtında bulunan yavrular ilk gömlek değişimini burada yapar ve bu döneme pro-juvenil dönemi denilmektedir. Bu dönemde yavruların sokma ve yeme özelliği yoktur [17,20,26].

Yavrular birinci gömlek değişimini tamamladıktan sonra juvenil olarak kabul edilir. Yenilenen kabukları ile pembemsi rengine bürünen akrepler ergin akreplerin kopyası gibidir. Fakat birkaç gün sonra renkleri giderek grimsi kahve rengine dönüşür ve annelerinin sırtında kalmaya devam ederler [17,20,26].

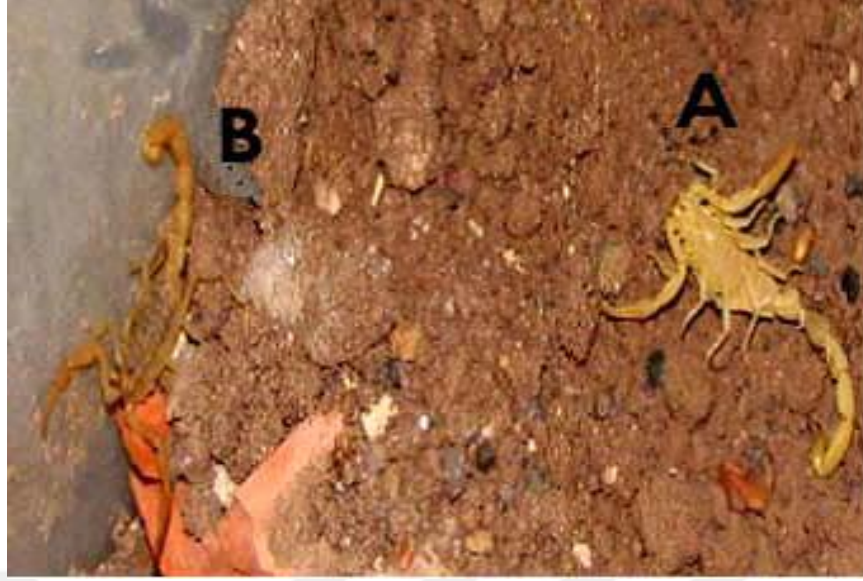
Yavrular birkaç hafta sonra annelerinden ayrılarak kısa geziler yaparak çevrelerini ve ortam koşullarını keşfederler. Bu gezilerden sonra yavru akreplerler tekrar annelerinin pedipalp ile çevrelediği alandan sırtlarına çıkarlar (Şekil 1.9.) [17,20,21].



Şekil 1.9 Ayrılan yavruların anneleri tarafından sırtta alınışı(Lourenço, 2000b)

1.2.3.4.5 Gömlek Değişimi

Anne sırtından inen akrepler yaklaşık 6-7 ay daha annelerinin peşinden giderler. Akreplerin büyük bir kısmı 1-3 yılda eşeyssel erginliğe ulaşır; ergin olarak da 1-3 yıl daha yaşarlar ve ömür uzunlukları 2-6 yıl arasında değişmektedir. Bu süre içerisinde akrepler 6-9 kez gömlek değiştirirler ve olası akrep ölmelerinin çoğu bu dönemde gerçekleşir (Şekil 1.10) [21,23].



Şekil 1.10 Gömlek değişimini tamamlamış akrep (B) gömlek (A) (Özkan ve Karaer, 2007)

1.3 Duyusal Yapıları

Duyu organı olarak dokunum tüyleri, bacaklardaki ince tüyler, abdomenin ikinci sternitindeki taraklar ve sefalotoraksdaki median ve lateral gözlerdir. Akrepler yürürken etrafı kollamak üzere pedipalplerini biraz yukarıda tutarlar. Pedipalplerin üzerinde bulunan küçük duyusal tüyler (trichobothrium) ile havadaki titreşimleri algılar [27-29].

Akrepler, karapaksta bir çift basit median göz ve her biri lateralde bulunan iki ile beş çift arası bir grup küçük göz taşır [29]. Median gözler; genellikle aynı yönde alttaki oküler tümsek üzerinde karapaksın anterior sınırından sonra, birlikte yerleşim gösterir. Median gözler, iki tabakadan oluşmuştur [29,30]. Lateral gözler; karapaksın ön kısmında köşelerde bulunur. Bazı akreplerde bu gözler körelmiştir. Bazı mağara ve mesken akrep türleri (*Sotanochoactas elliotti*) gözsüz de olabilir. Göz sayısı ve dağılımı tür ayrımında önemlidir [30].

1.4 Akreplere Özgü Özellikler

1.4.1 Floresans Özelliği

Akrelerin en dikkat çekici özelliği, ultraviyole ışınlarına maruz kaldıklarında bu ışığı parlak bir şekilde yansıtma kapasitelerine sahip olmalarıdır. Bu şaşırtıcı olay durum ve mekanizmasının ne de ekolojik fonksiyonlarının çözülmemiş olmasından dolayı bizim bilgi yetersizliğimizin bir göstergesidir. Bu aydınlatma kara hayvanlarında nadir görülür ve hiçbir yerde akreptekiler kadar parlak değildir. Çöl türleri olan *Paruroctonus mesaensis* 'lerde, kütikül aromatik bileşenler maksimum 400nm UV içine çeker ve tepesi yeşil sarı olan geniş bant yansıtma 500-550 nm ye ulaşır. Diğer türler, aracı floresansların bileşenleri ailesindeki bazı varyasyonları belirterek ren olarak mavi-yeşilden sarıyı yansıtır. En az iki akrep ailesinde, florogenik maddeler karbon olarak görülür ve diğer Trytophan aile türevlerinde olası çapraz bağlanmış epikütikular proteinler görülür [31]. Bunlar her deri değiştirme de yeniden salgılanır. Sadece göz lenslerinde ve sokma uzantılarında yansıtma olmaz. Akrelerin yansıtmasının fonksiyonel önemi bilinmemesine rağmen, hayvanların gece davranışlarını gözlemlemek için şans eseri pratik kullanımı muazzamdır. Alan odaklı çalışmalarda, tek bir araştırmacı taşınabilir bir siyah ışık ile özellikle bütün yerel bireyler o anda yüzeyde maruz kalmışken yüzlerce hayvanı bir akşamda yerleştirilebilir. Çoğu türlerin davranışları, laboratuvar veya doğal yaşamda kayıttı mümkün kılarak, UV ışınları altında daha geniş spektrum ışıklarından daha az etkilenir. Akrep yansımalarının fotoğrafı veya video kaydı, bütün yapıların ince ayrıntılarda doğal etiketlendiği konfokal yansıma mikroskop seviyelerinde bile yüksek kontrastta daha keskin resimler verir. Kütikular yansımanın bir şanssız sonucu, sağduyulu bir ticari toplayıcı veren yıkıcı avantajlıdır. Belirli ilgi alanlarından biri üreyen hayvanların giderek yerel nüfuslarının azaldığı kum tepelikleri gibi özel alanlarda yaşayan canlılardır [31].

1.4.2 Kütikula Yapısı Ve Metaller

Dış iskelet ve onun ekleri, eklem bacaklılar ve onların eşsiz evrim başarıları için tanımlayıcı karakterdedir; dış iskeletler böceklerin ilk ve en çok araştırılmış yapıları arasındadır. Nükleer mikroskoplar kullanılarak yapılan son akrep kütikula deneyi, dış iskeletlerin yeni bir karakterini ortaya çıkarmış, kütikular yapıyı dayanıklı hale getiren odak dağılımlı metaller olduğu belirtilmiştir. Keliser ve tarsus gibi kesici, delici ve aşınmaya elverişli yapılara dayanıklılık veren kitin yapısına entegre edilen metal atomlar tarafından pekiştirilir. Hatta metal konsantrasyonu, kütikulanın ağırlığının yüzde otuzuna kadar inanılmaz derecede yüksektir. Akrelerdeki bu yüksek orandaki metal formunun nasıl işlendiği sorusu ve bu durumun çözümü yeni kimyasal veya metabolizmanın aydınlatılması için gelişmiş yollar ortaya koyabilir [31].

1.4.3 Radyasyon Direnci (Radiyoresistans)

Akrelerin bir başka sıra dışı özelliği de, iyonize radyasyona karşı olan dirençleridir. Akrepler, Sahra ve Kuzey Amerika çözümlerindeki nükleer testlerde sıfır noktasında yaşayabilen nadir hayvanlar arasındadır. Radyasyona direnç mekanizmaları henüz çözümlenememiştir. Ancak son ışınlanmış genlerin tamirinde ve korunması üzerine kullanımları için bu konuyu tartışmışlardır [9].

1.4.4 Venom (Zehirleri)

Predatör olarak adlandırılan akrelerin evrimsel başarısı, onların zehirlerine dayandırılabilir. Akrep zehirleri yüksek seviyeden özel toksinlerin bir karışımıdır ve bazıları büyük kurbanlarını hareketsiz hale getirebilir, bazıları da diğer yırtıcıları caydırıcı kıvamdadır. Bu zehir toksinleri, kas hücrelerinde ve sinir zarlarındaki iyon kanallarına çok iyi uyum sağlayan küçük ve sağlam proteinlerdir. Yapılan araştırmalar, akrelerin zehirlerinde bulunan toksinlerin omurgalı sinir sistemlerini etkileyebileceklerinin çok az

olduğunu belirtmiştir. Fakat Buthidae ailesindeki birkaç tür, insanların yaşadıkları yerde ciddi sağlık problemleri ve insanlar için ölümcül zehirler retiler. İstatistikler kesin olmasa da, yıllık birkaç yüz insan müdahale edilmemiş akrep sokmalarından ya da panzehirler tarafından uyarılmış anafilaksi tarafından ölmektedir. Maalesef bu az sayıda türler ciddi zehirli türlerin sayısının çok altında olan zararsız türleri etkilemektedir.

Bu zehirler içinde bulunan toksinler farklı bir uygulama alanına sahiptir. Zehir toksinleri kas dokuları ve memelilerin sinir hücrelerinden iyon kanallarının çalışılması ve biyokimyasal izolasyonu için araçlar olmuştur. Diğer taraftan da tartışılan başka bir uygulama alanı ise, akrep zehirlerinden böceklere özgü toksinler elde etmek ve böceklerin tarımsal hareketlerinin kontrolünde kullanılmaktadır. Böceklere zel nrotoksinler için akreplerden alınan genler, insanlar, omurgalılar ve diğer canlı türlere karşı olumsuz bir yan etkiye karşı koruma olarak ve böceklerle mücadeleye karşı yüksek bir kontrol gücü olarak řu anda geliştirilmektedir. Çok az sayıda akrep zehri analiz edildiğinden dolayı taksonominin kullanılışında toksin evriminde ve toksin hareketlerindeki mekanizmayı geliştirmek için uygulamalı araştırmalar devam etmektedir [32].

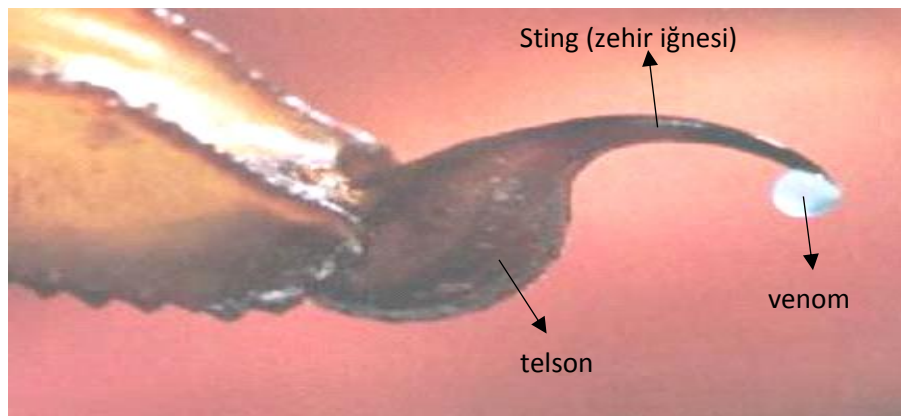
1.4.5 Venom Eldesi

İçeriğindeki etken maddelerin çeşitliliği nedeniyle fizyolojik ve farmakolojik çalışmalarda, araştırma materyali olarak sıkça kullanılan akrep zehri, akreplerin telsonunda (şekil 1.11) bulunan zehir bezlerinden salgılanır ve birçok protein, peptid ve biyolojik yönden etkin bileşiklerden oluşan nörotoksik etkili bir salgıdır [33-37].



Şekil 1.11 Akrelerin savunma ve beslenmede kullandıkları içinde oval armut şeklinde zehir bezinin bulunduğu son segment telson

Venomun toksisitesi, bölgeden bölgeye ve aynı tür içerisinde bile değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle akrep sokması sonucu oluşan zehirlenmelerde; akrebin türü, beslenme durumu, zerk edilen zehir miktarı ve içeriği, sokma sayısı, hastanın yaşı, kilosu, sağlık durumu ve bölgenin iklimi gibi faktörlere bağlı olarak değişik klinik tabloların oluşabileceği vurgulanmıştır (Şekil 1.12). Bu sebeplerden dolayı, antivenomun yani panzehrin kökeni (orijini) belirtilmelidir. Kaynağa yönelik bu bilgiler içerisinde akrebin türü ve bölgesinin tam olarak tanımlanması gereklidir [38,39].

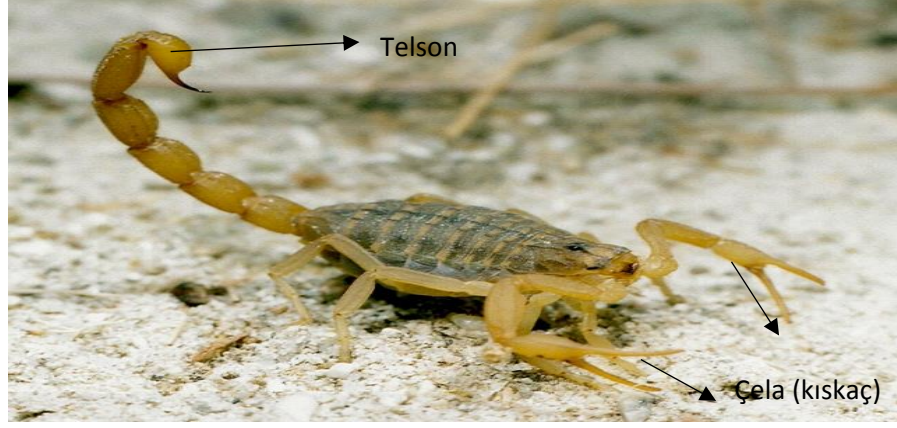


Şekil 1.12 Elektrik akımı ile istem dışı olarak elde edilen şeffaf venomun görünüşü (Ö. Özcan)

Akrelerde venom eldesinde maserasyon ve elektrostimülasyon yani elektriksel uyarımla sağım yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Zehir elde etmek için kullanılan meserasyon yöntemi, akrep telsonlarının toplanıp, kurutularak kahve değirmeninde öğütülmesinden elde edilen tozun fizyolojik tuzlu su (FTS) ile +4° C' de 72 saat süre ile yapılan ekstraksiyon işlemidir [40-42]. Elektrostimülasyon yöntemi ise, adından da anlaşılacağı üzere 0-50 V'luk bir elektrik kaynağı ile canlı akreplerin telson bölgesine verilen elektrik akımı ile zehrin akrepten istem dışı olarak elde edilmesidir. Elektrostimülasyon sağım sonucu elde edilen zehir, FTS ile sulandırılır ve liyofilize edilerek - 20 °C de kullanıncaya kadar muhafaza edilir [32].

1.5 Anadolu Sarı Akrebi (*Mesobuthus gibbosus*)

M. gibbosus Türkiye'de ilk kez Schenkel tarafından 1947 yılında Kayseri'de tespit edilmiştir. Boyutları 60–80 mm uzunluğunda sarı-kahve renklidir. Dördüncü metasomal segment on karinalıdır (Şekil1.13). Ege, Akdeniz, İç Anadolu Bölgesinden, Doğu Anadolu Bölgesine kadar oldukça geniş bir alanda dağılım gösterir. Özellikle Ege bölgesinde akrep sokma vakalarının tek sorumlusudur. Tıbbi önemi olan bir türdür. Bahçelik, ağaçlı ve taşlık nemli alanlarda bulunurlar [43].



Şekil 1.13 Anadolu sarı akrebi (google)

1.5.1 Morfolojisi

Küçük boylu akrepler olup ortalama 56 mm uzunluğundadır. Vücut sarımsı kahverengi; tarak organı beyazımsı krem renginde telson açık sarımsı kahverengi iğne kıvrımsı kahverengindedir. Karapaksta antero-lateral karinalar ile postero–median karinalar bileşerek lir şeklinde yapı göstermez mid-median karinalar ile postero median karinalar boyunca düz bir çizgi halinde birleşmişlerdir. İkinci ve üçüncü kuyruk segmentlerinin ventro-median karinalarını oluşturan granüller posteriore doğru büyümür. Hareketli parmak on iki, sabit parmak on bir eğik granül sırası taşır dördüncü kuyruk segmenti on tam karinalı tarak organı diş sayısı dişilerde on dokuz, yirmi üç, erkeklerde ise yirmi altı, otuz iki arasındadır. Metasomanın dördüncü segmenti on oluklu bu yönüyle 8 oluklu olan *M. eupeus* ve *M. caucasicus* türlerinden ayırt edilebilir [44].

1.5.2 Biyolojisi

Gececi bir tür olup daha çok sinek, hamamböceği vb gibi alt türleriyle beslenirler. Bu türün genç erkekleri yamyamlığa rastlanır. Avlanmak için hem otur-bekle, hem de gezmek suretiyle avlanma taktiği uyguladığı gözlemlenmiştir. Yapılan deneyler ve denemelerle birlikte 7 aya kadar açlığa direnç gösterdiği gözlenmiştir. Doğum yaz

aylarında gerçekleştirir dişi akrepler yavrularının sayısı 30-50 arasında, rakımı 800 metre den yüksek bölgelerde en aktif dönemi Ağustos ayıdır [44].

1.5.3 Habitat

Bozkır ve ormanlık alanlarda bulunurlar. Daha çok açık alanlarda, özellikle yerleşim bölgelerinde binalarda ve harabelerde ayrıca kurumuş dere yataklarında maki ve çam ormanları kenarlarında bazen orman içlerindeki açıklıklarda taşlar altında görülür. Dikey dağılımı, 0-1.500 metre arasındadır [43].

1.6. Kanserin Özellikleri

Kanser, kendini göstermesi, gelişimi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine göre değişken olan, karmaşık bir hastalıktır. Aynı heterojenlik ve çeşitlilik hücresel ve moleküler düzeyde de kendini gösterir. Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve nihai olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süredir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar. Bu süreç, regülasyonu bozulmuş, normal hücre büyümesini ve davranışını denetleyen kurallara uymadıkları için “asi” olarak nitelendirilebilecek hücrelerden oluşan bir kitlenin oluşumuna neden olur. Böylesi bir kitle uzun bir süre asemptomatik olabilir yani hiç belirti vermeyebilir. Bununla birlikte, sonunda büyüyerek, fizyolojik işlevleri altüst edecek, kitlenin yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak çok sayıda semptom ve kanser hücrelerinin organizma içinde yayılmasına yol açacaktır [45].

1.6.1 Kanser Nedeni

İyonlaştırıcı radyasyon, üzerinde en yoğun araştırılan karsinojenlerden biridir. Radyasyonla bağlantılı sağlık etkileri konusundaki bilgiler Hiroşima ve Nagasaki'deki atom bombalarından kurtulan insanlar, terapötik amaçlarla, mesleki olarak ya da kazalar sonucu radyasyona maruz kalanlar dahil, yüz binlerce kişi üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarla meydana gelmektedir. Bu istatistikler; dozdaki ve maruz kalma örüntülerindeki değişiklikleri hesaba katarak ve hücrel ve moleküler son noktalar referans alınarak, farklı türlerdeki radyasyonun etkilerini değerlendirmek üzere hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen büyük ölçekli deneylerden elde edilen bulgularla tamamlanmaktadır. Bu tür deneyler radyasyonun yarattığı hasar, hasarın onarımı ve karsinogenesis mekanizmalarının özelliklerini tanımlamak üzere şekillendirilmektedir.

Hiroşima ve Nagasaki'de atom bombalarından hayatta kalanlar en çok gama ışınlarına maruz kalmışlardır. Bu insanlar arasında lösemi, meme kanseri, tiroid kanseri ve diğer birçok malignite riskinde doza bağlı artışlar gözlenmiştir. Aynı maligniteler için X-ışını ve gama ışınları ile tedavi görmüş kanser hastaları arasında da frekans artışı görülmüştür. X-ışınlarına veya gama ışınlarına maruz kalma sonrasında kanser riski seviyesi, radyasyon dozuna ek olarak birkaç faktöre göre değişmektedir. Bu faktörler arasında maruziyetin meydana geldiği yaş, radyasyonun alındığı sürenin uzunluğu ve maruz kalan kişinin cinsiyeti de yer almaktadır. Yüksek dozda radyasyona maruz kalma lösemi riskini beş kattan fazla artırmaktadır. Çocukluk döneminde radyasyon alınması sonrasında tiroid kanserinde çok daha yüksek rölatif risk bildirilmiştir [46,47].

1.7. Kanser Ve Tedavi Yöntemleri

Gelişmiş ülkelerde görülen ölüm vakalarının yaklaşık %20'si kanserden ileri gelmektedir. Dünyada en sık görülen kanserler sıklık sırasına göre mide, akciğer, meme, kolon ve rektum, serviks ve orofarenks kanserleridir. Bu kanserlere yönelik tedavi protokollerinde yer alan klasik ilaçlar, antineoplastik etkilerini kanser hücrelerinde DNA

sentez ve replikasyonunu engelleyerek gösterirler. Ayrıca antitümöral etkinlik sağlamada radyoterapi ve cerrahi gibi yöntemler de kemoterapötiklerle birlikte kullanılabilir. Ancak tek başlarına ya da kombinasyon şeklinde uygulanmaları halinde bile, sayılan yöntemlerin kanserli hücreler üzerinde seçici etkili olduğunu söylemek mümkün değildir. Klasik ilaçların ve yöntemlerin sağlıklı hücreler üzerindeki yıkıcı özellikleri ve bununla ilişkili yan etkiler, araştırmacıların kanserle mücadelede alternatif arayışlara yönelmesine neden olmuştur [45]. Yaklaşık yarım yüzyıldır antitümör etkinliğe sahip biyolojik ajanlar üzerinde çalışılmaktadır. Bu yöndeki çalışmalarda gelinen son nokta, biyotoksinlerin anti kanser amaçlı kullanımlarıdır. Günümüzde artık kansere karşı standart kemoterapi yerine biyoterapi yöntemleri denenmektedir. Monoklonal antikorlar, biyotoksinler ve interferonlar gibi biyolojik ajanlara, düşük yan etki potansiyelleri ve güçlü terapötik etkinliklerinden dolayı yakın gelecekte klasik yöntemlerin yerlerini alacakları gözle bakılmaktadır [45].

1.7.1. Akrep Toksini Ve Kanser

Kanser dünya yüzeyinde ciddi bir sağlık problemidir. Dünya yüzeyinde kanserden ölüm ve hastalık çok fazla olduğundan dolayı bir an önce daha iyi ve kalıcı tedavi yöntemlerinin bulunması geliştirilmesi gerekmektedir. Kanser tedavisini ışın tedavi, ameliyat, kemoterapi, immünoterapi ve hormonal tedavi yöntemleri içermektedir. Uygulanan tedavi yöntemleri arasında kemoterapi en yaygın kullanılan yöntemler arasındadır. Fakat hastalar sıklıkla kemoterapötiklere karşı tümörler tarafından direnç geliştirirler. Buna ilaveten kemoterapötiklerin sistematik kullanımı sıklıkla ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Bu durumda kansere karşı yeni stratejilerin araştırılması ve geliştirilmesine neden olmaktadır [48].

1.7.2. Akrep Toksini ve Glioma

Glioma, hızla yayılan ve medikal tedavisine dirençli beyin kanseridir. Glial hücrelerden meydana geldiği için glioma olarak adlandırılmıştır. Akreplerden elde edilen toksinlerin bazıları kanser hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Buthus martensii* Karsch'dan elde edilen toksin BmK AGAP sodyum kanalına spesifik nörotoksindir. BmK AGAP toksini apoptozisi uyarmak suretiyle glioma hücrelerinin gelişimini inhibe etmektedir. *Leiurus quinquestriatus* akrebinin zehrinden klorotoksin olarak adlandırılan 36 amino asitlik bir polipeptid bulunmuştur, ki bu da klor kanallarının iletkenliği bloke eder. Klorotoksin memeli sistemine toksik değildir fakat böceklere toksiktir. Glioma hücreleri klorotoksine (CTx) duyarlı (hassas) bir glioma spesifik klor iyon kanalı eksprese ettiği gösterilmiştir. Klorotoksin özel olarak glioma hücrelerine bağlanır. Klorotoksin tedavi potansiyeliyle glioma spesifik markerlar olarak işlev görebilir [48].

1.7.3. Akrep Toksini ve Lösemi

Lösemi, blastlar olarak isimlendirilen olgunlaşmamış lökosit hücrelerinin anormal artışıyla iliğinin bir tür kanser tipidir. Hindistan siyah akrebi olarak bilinen *Heterometrus bengalensis* Koch'den bengaline olarak adlandırılan yüksek molekül ağırlıklı bir protein izole edilmiştir. Bengaline K562 (kronik miyelogenous lösemi) ve U937 (histositik lenfoma) insan lösemik hücrelerine karşı apoptotik, sitotoksik ve antiproliferatif aktiviteye sahiptir. Bengaline mitokondriyal ölüm kaskadıyla insan lösemi hücreleri üzerine toksinlerin antikanser etkisi için varsayılan moleküler mekanizma sağlamaktadır [49].

1.7.4. Akrep Toksini ve Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokusundan kaynaklanan bir kanserdir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın hale gelen, süt kanallarının iç tabakasında gelişen en yaygın kanser tiplerinden biridir. Kanser ölümlerinin sebebi olarak kadınlar arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alması meme kanserinden dolayı ölümün artması alarm vermektedir. Meme kanserinin kontrolünde önemli gelişmeler olmasına rağmen hayatta kalma oranı %20-25 den fazla değildir. Meme kanserine yakalanan hastalarda en yaygın ölüm, tümörde anjiyogenik kan damarlarının gelişiminin kanseri ele geçirmekte kanser hücrelerinin metastatik yayılımlarına neden olmaktadır. Göğüs kanseri invazif ve noninvaziv olabilir. İnvazif süt kanallarından ya da lobüllerden diğer meme dokularına yayılmasıdır. Noninvaziv henüz diğer meme dokularına geçmemiştir. Bir hiyalüronidaz (BmHYA1) Çin kırmızı akrebi (*Buthus martensi*)'nin zehrinden saflaştırılmıştır. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı çok fazla hiyluron içerdiği düşünülen saldırgan bir kanser hücre hattıdır. Hiyolüronidaz insan meme kanserini azaltır. Bu da anti-kanser threapötiklerinin ve toksik yan etkisi olmayan yeni bir sınıf olabileceği düşünülmektedir [49,50].

1.7.5. Akrep Toksini ve Beyin Kanseri

Bir intrakraniyal solid neoplazma bir beyin tümörüdür. Merkezi omurilik kanalı veya beyin içinde tümör hücrelerinin anormal büyümesidir. Akrep zehir peptidi klorotoksin beyin ameliyatı için bir görüntüleme ajanı olarak umut verici gösterilmektedir. Klorotoksin bir özenli gösterilmiş sistein düğümü örneğidir. Sistein düğümü bir ekstra disülfid bağı içerir. Klorotoksin spesifik bir floresans boya ile birleştirilerek “bir beyin boyası” olarak kullanılabilir, bu da beyin tümörlerinin ameliyatla uzaklaştırılmasına imkan verir. Klorotoksin teşhis ve tedavi edici ajan olarak beyin tümörlerine özel marker olarak kullanılabilir [51].

1.7.6. Akrep Zehiri ve Prostat Kanseri

Prostat kanseri Őu anda erkeklerde en fazla lme sebep olan kanserdir. Kuzey Amerika erkeklerinde kanserin sebep olduğu ölümlerde ikinci sırada gelmektedir. Akrep zehirlerinde ekstrakte edilen polipeptidin PESV androjen bağımsız prostat kanseri hücre hatlarına karşı etkilidir. Hormon refraktr (etkisiz) prostat kanseri (HRPC) bir sorun olarak devam etmektedir fakat yeni umut verici ajanın bulunması androjen bağımsız prostat kanserine karşı önemlidir. Akrep zehirden ekstrakte edilen bir polipeptid (PESV) *Buthus martensi* Karsch (BmK) dan izole edilmiştir. PEVS 50-60 amino asitli bir polipeptiddir ve farelerde hepatosellüler karsinoma ve S180 sarkom tümör gelişimini baskılayan neovasklerisasyonu inhibe eden insan Umbilikal toplardamar endotelyal hücresine (HUVEC) karşı antiproliferatif, sitotoksik ve apoptosizi uyaran aktivitelere sahiptir [52].

1.7.7. Akrep Toksini ve Cilt, Akciğer, zefagal, Servikal Ve Kolon Kanseri

Kolon, zefagal, servikal, akciğer ve cilt kanserinin erken belirlenmesi için klorotoksin noninvasiv (yayılmayan) tarama aracıdır. Klorotoksin demir oksid nano partikülleriyle birleŐtirilir bir polietilen glikol linker boyunca ilaç ve hedeflenen ligansları ikisini başarılı bir Şekilde bağlar. Hedef nanopartikül ayrıcalıklı birikimi gösterdi ve tümör hücrelerinde sitotoksiteyi arttırdı. Dahası, in vivo modeller bu nanopartikülleri tümör içinde alıkoymaktadır. Bu çok fonksiyonlu nanopartikül sistem kanser teşhis ve tedavisinde potansiyel uygulamalar bulabileceği ileri sürülmektedir [49].

1.7.8. Akrep Zehiri Ve İnsan Akciğer Adenokarsinoma

Akrep zehiri jelatinolitik ve sitotoksik aktiviteye sahip proteolitik enzimler, alkalın fosfataz, asetilkolinesteraz ve fosfolipaz A2 enzimleri gibi farklı enzimleri ihtiva etmektedir. Zehirde proteolitik enzimler kangren, hemoliz ve nekroza sebep olabilmektedir. Çeşitli kanserlerin tedavisinde bu proteazların tanımlanmaları çok önemlidir. *M. gibbosus*'un zehrinden elde edilen proteaz insan akciğer adenokarsinoma (A549) hücre hatları üzerine uygulandığında kanser hücre hatlarında dikkat çeken bir azalma rapor edilmiştir. Böylece insan akciğer adenokarsinomasına karşı bu peptidler oldukça yoğun jelatinolitik ve sitotoksik aktiviteye sahiptir [53].

1.7.9. Akrep Zehiri Ve Melanoma

Akrep zehirden elde edilen TRAIL peptidi (TNF ilişkili apoptosiz uyaran ligand) melanoma hücrelerinde apoptosizi uyarmak için kullanılır. Normal hücreler etkilenmeden kalırken bu peptidler yalnızca kanser hücrelerini hedef alır. Melanoma kanser hücrelerindeki TRAIL proapoptotik Bcl-2 proteinleri ve kaspazları başlatır (aşağı TRAIL reseptörleri regüle ederken). TRAIL SMAC, AIF ve sitokrom c gibi mitokondriyal faktörlerin salınımına neden olarak mitokondriyal dış membranın permabilizasyonuna ve depolarizasyonuna sebep neden olur. Bu faktörler melona kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder ve apoptosiz ile ölümü uyarır [49].

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Arazi Çalışmaları ve Akrep Zehirlerinin Toplanması

2.1.1. Arazi Çalışması ve Tür Teşhisi

Bu tez çalışmasında, *M. gibbosus* akrep türü kullanıldı. Bu akrepler 2016 yılında İç Anadolu Bölgesi'nde yapılan gündüz arazi çalışmaları sonucunda, taşlar kaldırılarak taş altından toplandı. Toplama sırasında doğa zarar verilmedi, kaldırılan taşların geri yerine kapatılmasına dikkat edildi. Araziden toplanan akreplerin, genital ve morfolojik karakterleri kullanılarak Doç.Dr. Tarık Danışman (K.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından tür teşhisi yapıldı. Çalışma sadece ergin bireyler kullanıldı ve cinsiyet ayrımı yapılmadı.

M. gibbosus türleri öncelikli olarak Yozgat'ın Sarınınören ilçesinde yapılan çeşitli gündüz arazi çalışmalarında taş altlarından toplandı. İlk olarak 08/07/2016 tarihinde 7 tane, daha sonra 07/08/2016 tarihinde de tekrar 7 tane, 28/08/2016 tarihinde 10 olmak üzere toplamda 24 akrep laboratuvara getirildi. Daha sonra Yozgat'ın Kırım ilçesinden 13 adet akrep toplandı. 16/09/2016 tarihinde Kırıkkale Yeşilvadi'den 8 adet akrep toplandı. Çalışmamızda toplam 45 akrep kullanıldı. Ancak her sağımda belli sayıda akrepten zehir sağılabilirdi. Canlı olarak laboratuvara getirilen akrepler doğal ortamlarına uygun şekilde bireysel olarak 500 ml'lik kavanozlara alındı. Her bir kavanoz içine bir miktar nemli toprak, akreplerin altına saklanabilmesi için küçük bir taş ve nem oranını kaybetmemesi için birkaç adet taze yaprak konuldu (Şekil 2.1). Çalışmalarımızda akrepler un kurdu ve böcek vererek beslendi. Akrepler avlanarak beslendikleri için, zehir miktarlarının azalmamasını için haftada bir kez 2 adet besin verildi.



Şekil 2.1 Çalışmamızda kullandığımız akrelerden biri beslenirken

Çalışmamızda, akreleri beslemek için canlı yem kullanıldı. Hem akrelerin tercih ettiği bir av olması hem de teminin kolay olması nedeniyle en uygun canlı yem un kurdu idi. Akreler yaşadığı müddetçe un kurdu kültürü de devam ettirildi. Geniş bir kap içine un kurtları için bir yatak hazırlandı ve haftada iki kez dilimlenmiş patates ile bakımları sağlandı (Şekil 2.2)



Şekil 2.2 Canlı besin için kullanılan un kurdu kültürümüzün görüntüsü

2.1.2. Elektriksel Uyarı (Elektrostimülasyon) Tekniği İle Akrep Ham Zehrinin Sağılması

Laboratuvarda özel olarak hazırladığımız bireysel yaşam alanlarına bırakılan akrepler zehir miktarları azalmasın diye bir hafta aç bırakıldıktan sonra elektrositümülasyon yöntemi kullanılarak zehir sağımı gerçekleştirildi. Elektrostimülatör ile 15-20 voltluk akım akrep kuyruğuna iki elektrot kullanılarak uyguladık. İletkenliği artırmak için elektrotlar % 0,9'luk tuz çözeltisi ile ıslatıldı. Telsonun uç kısmında bulunan zehir iğnesinden (sting) dışarı verilen damla halindeki ham zehir mikroenjektör ile toplandı (Şekil 2.3).



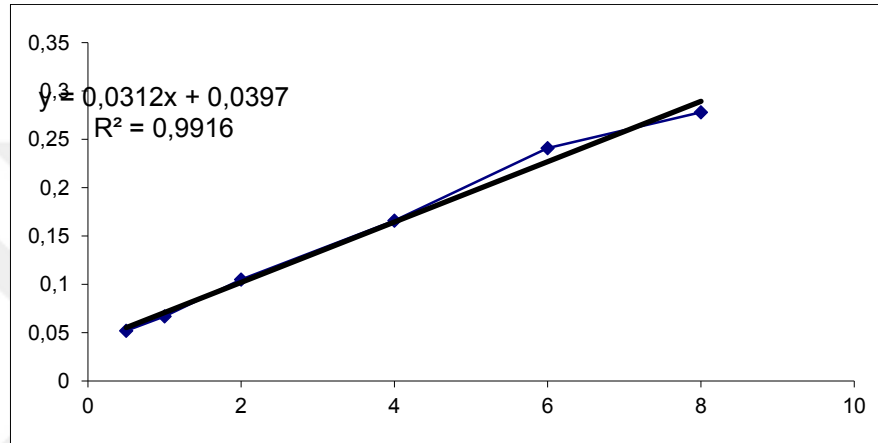
Şekil 2.3 Elektrostimülasyon tekniği ile akrep zehri sağlamak için kullanılan düzeneğin görüntüsü

Akreplere, elektrik uyarısı kuyruktan verildiği için, akrep kuyruğunda hasara sebep olmasın diye kuyruk oksijenli su ile yıkanarak bakımını yapıldı. Bu yöntemle tüm akreplerden zehir alma işlemine -zehir belirli bir miktara erişinceye kadar- devam edilmiş olup, daha sonra kullanılmak üzere $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklandı.

2.1.3. Akrep Ham Zehrinin Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Elde edilen ham zehir double distile su içerisinde çözülerek, 15 dakika süreyle $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında peptid toksinlerini içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak protein konsantrasyonu belirlendi. Süpernatantdaki protein miktarı, "Bradford (1976) Coomassie Blue" yöntemi kullanılarak tespit edildi. Standart referans protein olarak Bovine Serum Albümin'in 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 mg/ml bilinen konsantrasyonları kullanıldı. Her bir tüpe standart referans ve ham zehir örneğinden 2,4

ml, üzerine 0,6 ml Bradford ayırıcı konularak ve Spactamax Plus marka spektrofotometre cihazıyla 280 nm'de absorbansları ölçüldü. Konsantrasyonu bilinen bovine serum albümin absorbans değerleri kullanılarak bilgisayarda Excell'de bir kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 2.4). Daha sonra absorbasını ölçtüğümüz zehrin protein konsantrasyonu kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.



Şekil 2.4 Kalibrasyon eğrisi (x eksenini protein konsantrasyonu , y eksenini ise absorbans değerlerini göstermektedir)

2.1.4. Testler İçin Akrep Ham Zehrinin Hazırlanması

Elde edilen ham zehrin protein içeriği 0,338 mg/ml olarak hesaplandı. Elde edilen ham zehir deney gününe kadar -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Elde edilen akrep ham zehri az olduğu için uygulama esnasında uygun besiyerleri ile seyreltilerek kullanılmıştır. Hücre denemelerinde her bir test için sırasıyla 1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960 şeklinde dilüsyon oranlarına sahip ham zehir kullanıldı.

2.2 Akrep Zehrinin Hücre Kültüründe Uygulanması

2.2.1.MTT testi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Sitotoksitenin belirlenmesi için MTT testi kullanıldı. MTT testi ISO 10993-5 standartlarına uygun şekilde yapıldı. Bu test hücre proliferasyonunun ölçülmesi için 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) tetrazolyum tuzu'nun kullanıldığı hassas bir metottur. MTT, metabolik aktivite ile ilgili mitokondrial enzimler tarafından suda çözünmeyen formazan boyaya indirgenmektedir. MTT'nin indirgenmesi primer olarak hücre içerisindeki glikolitik aktivite ile ilgili olmakla birlikte NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) ve NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) varlığına bağlıdır. MTT solüsyonu canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla ile oluşturduğu reaksiyonda, solüsyonlarda bulunan tetrazolium halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturur. Canlı hücrelerde gözlenen renk değişimi ELISA okuyucuda yapılan okuma sonundaki absorbans değerlerini verdi.

L929 fibroblast, A549 ve MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu plakelere her bir kuyucuğa 5×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. *M. gibbosus* ham zehir örnekleri (1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960) dilüsyonlarda uygulanıp, 24 saat inkübe edildi. Örnekler 2 tekrarlı olarak çalışıldı. Kontrol grubu olarak sadece besiyeri kullanıldı. 24 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak her kuyucuğa 50 µl MTT çözeltisi ilave edildi. 37 °C'de 2 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara 100 µl MTT solventi (izopropanol) eklenerek çalkalanarak ELISA plate okuyucuda 570 nm'de okutuldu. Kontrol grupları baz alınarak % canlılık hesaplandı.

2.2.2. İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Ribonükleaz A (Sigma R-500) kullanıldı. Ribonükleaz A RNA'yı boyamaz. Bu sayede sitoplazmik RNA'yı yok eder. Hoechst (33342) boyama ile

apoptotik hücreleri boyandı. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlendi. Propidium iodide ise DNA'yı ve RNA'yı boyar. Kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir. İkili boyama solüsyonunun hazırlanışı:

Ribonükleaz A'dan 1ml PBS'de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlandı.

Hoechst ise 1 ml PBS'de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlandı.

PropidiumIodide 1ml PBS'de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlandı.

Çalışma solüsyonunun hazırlanışı:

10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 mikrolitre

Hoechst stoktan 500 mikrolitre

Propidium iodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlandı.

MCF-7, L929 fibroblast ve A549 hücreleri 96 kuyucuklu plâtelere her bir kuyucuğa 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda *M. gibbosus* ham zehir örnekleri (1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960) oranlarda uygulanıp, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki besi ortamı boşaltıldı ve her kuyucuga 50 µl ikili çalışma solüsyonu (double staining çalışma solüsyonu) eklendi, 96 kuyucuklu plate hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480-520nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı.

2.2.3. Gerçek Zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre proliferasyonunun belirlenmesi

MCF-7, L929 fibroblast ve A549 hücreleri 5000/kuyucuk olacak şekilde altın kaplı 96 kuyucuklu plate ekimi yapıldı. Hücrelerin bir gün süre ile RTCA-SP sisteme bağlı inkübatör proliferasyonu takip edildi. 24 saat sonra farklı oranlarda *M. gibbosus*

ham zehir örnekleri ((1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960) oranlarda uygulanıp hücrelerin üzerine ilave edilerek, 96 saat süre ile kültürü yapıp ve 5 dakika ara ile sistemden gerçek zamanlı olarak empedans ölçümü alındı. Sonunda zamana bağlı hücre proliferasyonunu gösteren grafikler elde edildi.



3. BULGULAR

3.1. Arazi Gözlemleri

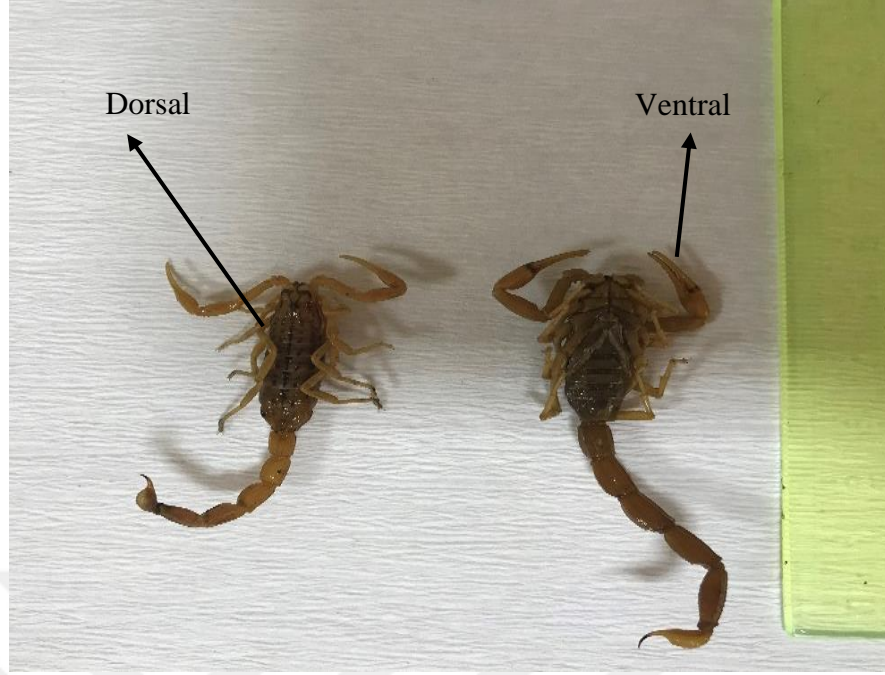
Bu tez çalışmasında *M. gibbosus* akrep türü kullanılmıştır. Bu akrepler 2016 yılında İç Anadolu bölgesinde yapılan çeşitli arazi çalışmaları sonucunda (Şekil 3.1) temin edilmiştir. Akrepler arazide gündüz taşlar kaldırılarak taş altından toplanmıştır (Şekil 2.2). Topladığımız akreplerin dorsal ve ventral genel görüntüleri Şekil 3.3'deki gibidir.



Şekil 3.1 Arazi alanlarından birinin genel görüntüsü



Şekil 3.2 *M.gibbosus* akrebinin arazide taş altında bulunduğu pozisyon (oklar)



Şekil 3.3 *M.gibbosus*'un dorsal ve ventral genel görüntüsü (O. Büyükkartal)

3.2. Ham Zehrin Hücrelere Uygulanması

Her ne kadar tez çalışmasına başlamadan önce tez önerisinde hücre proliferasyonu sadece gerçek zamanlı hücre analizi ile gösterilmeyi hedefledikse de çalışma esnasında sitotoksiste, apoptoz-nekroz indeksinin belirlenmesine yönelik testler çalışmaya dahil edilerek elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

3.2.1. MTT testi sonuçları

Herbir uygulama için, ELISA plate okuyucuda çıkan absorbans değerlerine göre konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri tablolarda verildiği gibidir. *M. gibbosus* ham zehir örneklerinin uygulandığı MCF-7 meme kanseri hücrelerinin absorbans değerlerine

bakıldığında; 1/30 ve 1/60 konsantrasyonlarının toksik olduğu, % canlılık değerlerinin sırasıyla $20,0 \pm 1$ ve $49,4 \pm 0,7$ olduğu hesaplandı. *M. gibbosus* örneklerinin uygulandığı MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri Tablo 3.1’de verilmiştir. Tablo 3.1’den de kolaylıkla anlaşılacağı gibi zehrin dilüsyon oranı arttıkça % canlılık oranı da arttı. Kısacası, zehir konsantrasyonu arttıkça, zehrin sitotoksitesisi de aynı oranda artış gösterdi.

Tablo 3-1 MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri

Konsantrasyon (<i>M. gibbosus</i> zehri)	MCF-7 hücrelerinin % canlılık
1/30	20,0±1
1/60	49,4±0,7
1/120	87,9±0,8
1/240	91,3±1
1/480	94,5±1,4
1/960	98,9±2
Kontrol	100±0,1

M. gibbosus ham zehir örneklerinin L929 fibroblast hücrelerinin absorbans değerleri incelendiğinde, yüksek konsantrasyonlarda (1/30 ve 1/60) toksik olduğu, düşük konsantrasyonlarda (1/240, 1/480 ve 1/960) ise % canlılık değerlerinin artış gösterdiği, en düşük konsantrasyonda sırasıyla $101,1 \pm 2$ ve $99,5 \pm 1$ hücre canlılığı belirlendi. *M. gibbosus* örneklerinin uygulandığı L929 hücrelerine ait % canlılık değerleri Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3-2 L929 hücrelerine ait % canlılık değerleri

Konsantrasyon (<i>M. gibbosus</i> zehri)	L929 hücrelerinin % canlılık
1/30	9,0±0,5
1/60	19,5±0,2
1/120	53,3±1,5
1/240	96,8±0,7
1/480	97,4±0,8
1/960	101,1±2
Kontrol	100±0,1

M. gibbosus ham zehir örneklerinin uygulandığı A549 küçük hücreli akciğer kanser hücrelerinin absorban değerlerine bakıldığında; en yüksek konsantrasyonda hücre canlılığının %33,0±0,7 olarak hesaplandı. 1/120 itibaren uygulanan konsantrasyonlarda anlamlı bir toksisite olmadığı belirlendi. *M. gibbosus* ham zehir örneklerinin uygulandığı A549 hücrelerine ait % canlılık değerleri Tablo 3. 3’de verilmiştir.

Tablo 3-3 A549 hücrelerine ait % canlılık değerleri

Konsantrasyon	% canlılık
1/30	33,0±0,7
1/60	25,5±1,5
1/120	78,2±0,5
1/240	79,4±1
1/480	80,0±0,5
1/960	83,0±0,6
Kontrol	100±0,1

Üç ayrı hücreye uygulanan *M. gibbosus* ham zehirinin sitotoksite testi sonuçları karşılaştırıldığında, zehrin MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin zehir dozuna bağlı olarak arttığı, aynı şekilde yine L929 hücrelerine sitotoksik olduğunu gösterdi. Ancak, A549 hücrelerinde anlamlı sonuç bulunamadı.

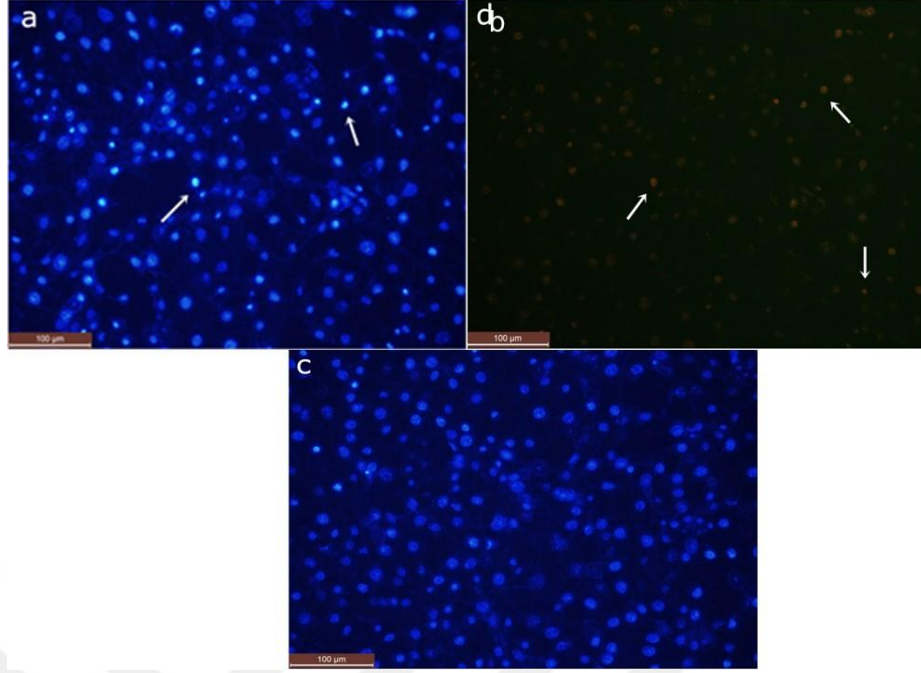
3.2.2. Apoptotik nekrotik indeks sonuçları

Apoptotik ve nekrotik indeksin belirlenmesi için ikili boyama yapıldı. Kontrol grubu olarak sadece besi ortamı içeren hücreler kullanıldı. İkili boyama solüsyonunda bulunan hoechst 33342, apoptotik hücreleri boyayarak, DAPI filtresinde parlak mavi renkte incelendi. Nekrotik hücreler ise, hücre membranı zarar gördüğü için propodium iodidle boyanarak FITC filtresinde kırmızı renkte görüntülendi.

MCF-7 meme kanser hücrelerine uygulanan *M. gibbosus* ham zehrin farklı doz örneklerine ait apoptotik nekrotik indeks sonuçlarına bakıldığında; 1/960 oranda dilüye edilen zehir uygulanan hücrelerde apoptotik indeks $4\pm 1,4$, nekrotik indeks ise $2\pm 0,7$ olarak hesaplandı. Uygulanan zehir konsantrasyonu arttıkça apoptotik ve nekrotik indeksinde arttığı belirlendi. Apoptoz nekroz görüntüleri Şekil 3.4'da gösterildi.

Tablo 3-4 MCF-7 hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks değerleri

Konsantrasyon	<i>M. gibbosus</i> ham zehri	
	%apoptoz	%nekroz
1/30	12±1	35±1
1/60	12±0,5	23±0,5
1/120	8±0,7	11±0,5
1/240	7±1,5	8±0,6
1/480	5±1	4±0,5
1/960	4±1,4	2±0,7
Kontrol	2±0,5	0±0

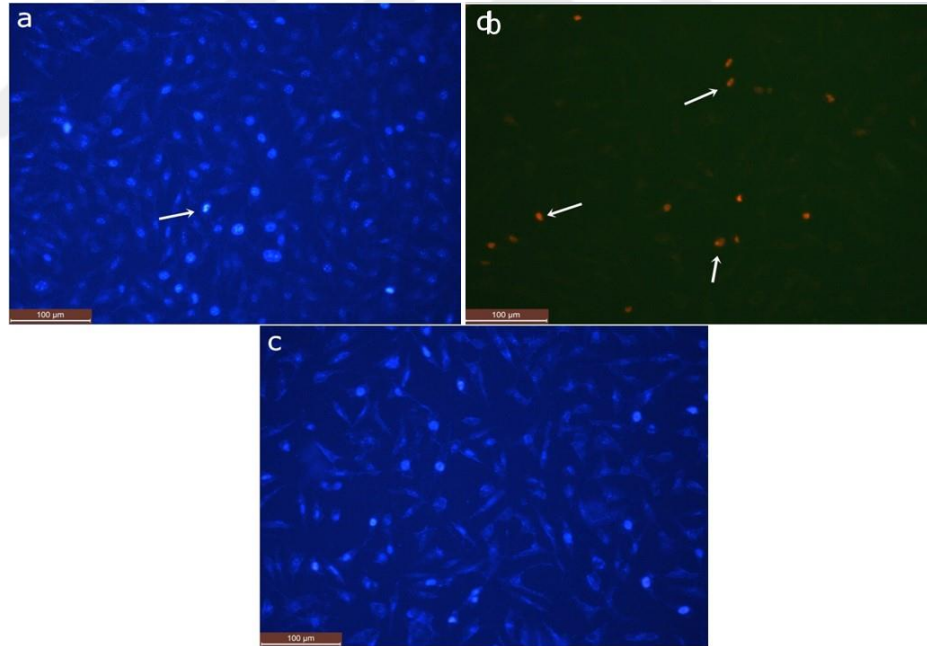


Şekil 3.4 ikili boyama ile MCF-7 hücrelerinde apoptoz ve nekrozun gösterilmesi. a)1/30 oranında *M. gibbosus* ham zehri uygulanan MCF-7 hücreleri. Hoechst 33342 DAPI filtresinde görüntülendi. Apoptotik hücreler okla gösterildi. b) 1/30 oranında *M. gibbosus* ham zehri MCF-7 hücreleri. Propodium iodide FITC filtresinde görüntülendi. Nekrotik hücreler okla gösterildi. c) Kontrol grubu hücreleri.

L929 fibroblast hücrelerine uygulanan *M. gibbosus* örneklerine ait apoptotik nekrotik indeks sonuçlarına bakıldığında örneğin uygulandığı yüksek konsantrasyonlarda (1/30 ve 1/60) apoptotik indeksin yüksek olduğu aynı şekilde toksik olması nedeniyle nekrozunda yüksek oranlarda (%45±1 ve %37±0,5) olduğu görüldü. L929 fibroblast hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks oranları Tablo 3.5.'de verildi. Apoptoz nekroz görüntüleri Şekil 3.4'de gösterildi.

Tablo 3-5L929 Fibroblast hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks oranları

Konsantrasyon	<i>M. gibbosus</i> ham zehri	
	%apoptoz	%nekroz
1/30	23±0,5	45±1
1/60	18±0,7	37±0,5
1/120	15±1	24±0,5
1/240	11±2	15±1
1/480	9±1	13±0,5
1/960	6±0,7	5±1
Kontrol	1±0,5	0±0

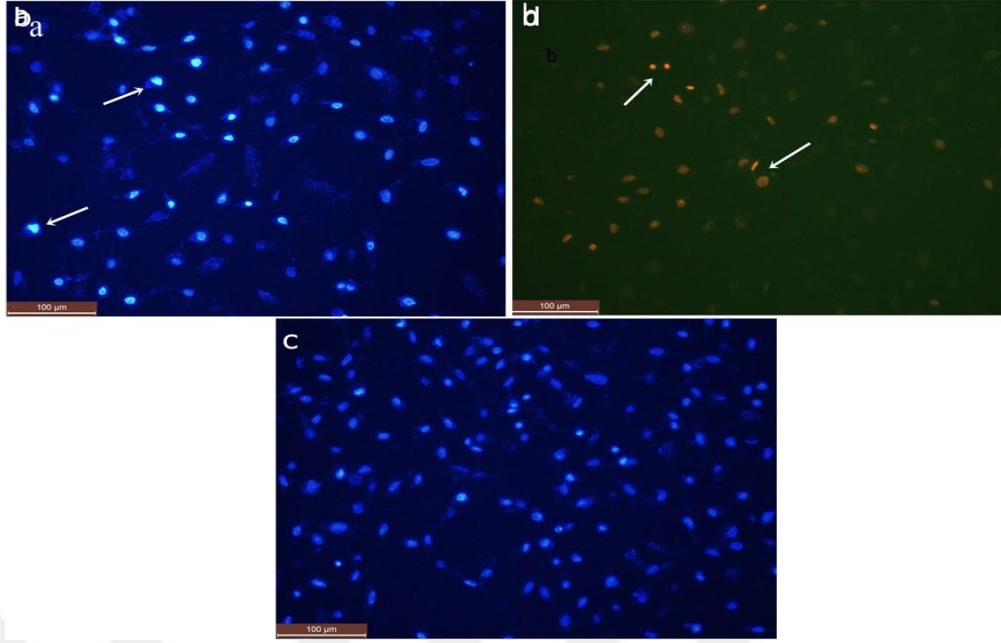


Şekil 3.5İkili boyama ile L929 fibroblast hücrelerinde apoptoz ve nekrozun gösterilmesi. a) 1/960 oranında *M. gibbosus* ham zehri uygulanan L929 hücreleri. Hoechst 33342 DAPI filtresinde görüntülendi. Apoptotik hücreler okla gösterildi. b) 1/240 oranında *M. gibbosus* ham zehri L929 hücreleri. Propodium iodide FITC filtresinde görüntülendi. Nekrotik hücreler okla gösterildi. c) Kontrol grubu hücreleri.

A549 küçük hücreli akciğer kanser hücrelerine uygulanan *M. gibbosus* ham zehri örneklerine ait apoptotik nekrotik indeks sonuçlarına bakıldığında; A549 hücrelerinde en yüksek konsantrasyonda (1/30) apoptotik indeks $15 \pm 0,4$ ' dir. Konsantrasyon oranları düştükçe % apoptoz ve nekroz oranlarının düştüğünü görülmüştür. A549 hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks oranları Tablo 3.5'de verildi. Apoptoz nekroz görüntüleri Şekil 3.5'de gösterildi.

Tablo 3-6 A549 hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks değerleri

Konsantrasyon	<i>M. gibbosus</i> ham zehri	
	%apoptoz	%nekroz
1/30	$15 \pm 0,4$	25 ± 1
1/60	12 ± 1	$23 \pm 0,5$
1/120	$8 \pm 0,6$	$17 \pm 0,5$
1/240	7 ± 2	$14 \pm 0,6$
1/480	6 ± 1	13 ± 1
1/960	$5 \pm 0,8$	10 ± 1
Kontrol	$3 \pm 0,7$	0 ± 0

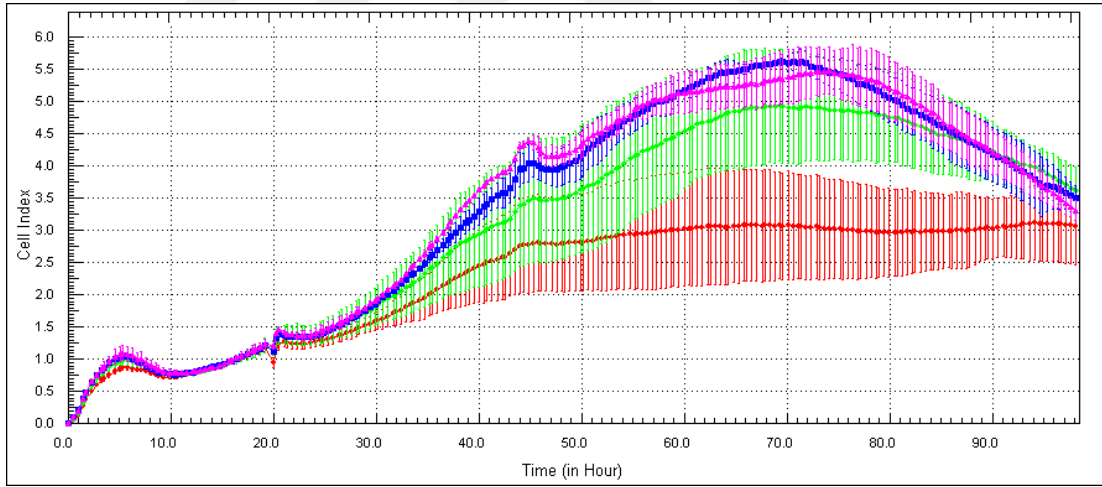


Şekil 3.5 İkili boyama ile A549 hücrelerinde apoptoz ve nekrozun gösterilmesi. Apoptotik hücreler okla gösterildi. a) 1/120 oranında *M. gibbosus* ham zehri uygulanan A549 hücreleri. Apoptotik hücreler okla gösterildi. Hoechst 33342 DAPI filtresinde görüntüldü. b) 1/30 oranında *M. gibbosus* ham zehri A549 hücreleri. Propodium iodide FITC filtresinde görüntüldü. Nekrotik hücreler okla gösterildi. c) Kontrol grubu hücreleri.

3.2.3. Gerçek Zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre proliferasyonunun belirlenmesi

xCELLigence gerçek zamanlı analiz sistemi ile MCF-7, L929 ve A549 hücrelerine *M. gibbosus*'un ham zehrinden hazırlanan farklı dozlardaki zehir örnekleri uygulandıktan sonra 96 saat hücrelerin proliferasyon grafikleri takip edildi.

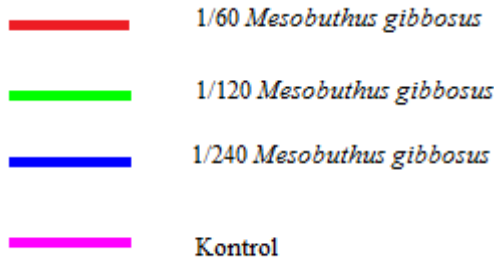
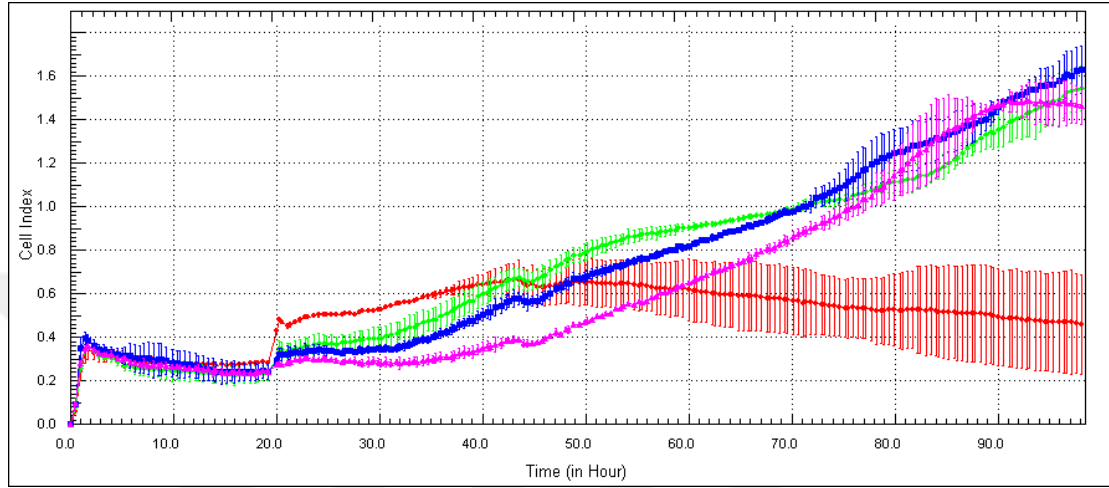
Öncelikle, MCF-7 hücrelerine 20. saatte uygulama yaptık, *M. gibbosus* ham zehri örneklerinin 1/120 ve 1/240 konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerde çoğalma 72. saate kadar devam etti. Kontrol grubu yani zehir uygulanmayan hücrelerindeki proliferasyon da 76. saatten itibaren durdu. *M. gibbosus* ham zehri örneklerinin 1/60 konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerde de proliferasyon 60.saatten itibaren durdu (Şekil 3.6). Zehrin en yoğun olduğu 1/60 konsantrasyonda proliferasyonun inhibisyonunun daha kısa zamanda olduğu, zehir konsantrasyonu azaldıkça zehrin proliferasyonu inhibe etme süresinin uzadığı anlaşıldı.



- 1/60 *Mesobuthus gibbosus*
- 1/120 *Mesobuthus gibbosus*
- 1/240 *Mesobuthus gibbosus*
- Kontrol

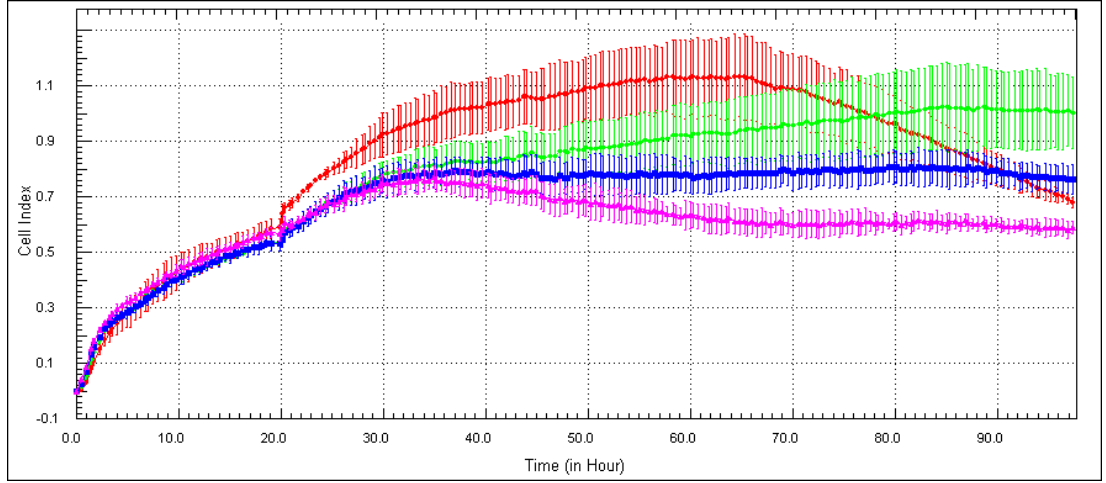
Şekil 3.4 MCF-7 hücrelerine ait proliferasyon grafiği

Daha önce de belirttiğimiz gibi L929 normal fare fibroblast hücrelerine 20. saatte zehir uygulaması yapıldı. 1/60 oranında *M. gibbosus* zehri uygulanan hücreler 40. saate kadar çoğalıp, 40 saatten sonra proliferasyon azaldığı gözlemlendi. Kontrol ve 1/120, 1/240 konsantrasyonda zehir uygulamalarında benzer şekilde proliferasyon devam etti. L929 hücresine ait proliferasyon grafiği Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.5 L929 fibroblast hücrelerine ait proliferasyon grafiği.

A549 küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerine de 20. saatte aynı şekilde zehir uygulaması yapıldı, 1/60 oranında *M. gibbosus* ham zehri uygulanan hücrelerin 64. saate kadar çoğalmaya devam ettiği ardından proliferasyonun düştüğü görüldü (Şekil 3.8). Ancak diğer dozlarda ve kontrolde proliferasyonun benzer şekilde devam ettiği görüldü.



- 1/60 *Mesobuthus gibbosus*
- 1/120 *Mesobuthus gibbosus*
- 1/240 *Mesobuthus gibbosus*
- Kontrol

Şekil 3.6 A549 hücrelerine ait proliferasyon grafiği

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda biyotoksinlerin kanser tedavisinde kullanılabileceği fikri yeni umut bir umut olmuş ve akrep, yılan ve örümcek zehirleri üzerine çeşitli araştırmalar başlatılmıştır. Kanser tedavisinde, zehir bileşimindeki peptidler sitolitik, sitotoksik aktiviteleri ya da vücudun bağışıklık sistemini güçlendirmek suretiyle kullanılmaktadır [49]. Bu çalışmada, Anadolu'da yaygın bulunan bir akrep türü olan *M. gibbosus*'un ham zehrinin meme kanser hücre hattı üzerine antiproliferatif etkisi incelendi.

Akreplerin ham zehirlerinin içerisinde 100'den farklı peptid bulunmaktadır. Birçok akrep türünün zehir içeriği ve protein yapısı hakkında çok fazla net bilgi bulunmamaktadır. Ancak çalışmamıza konu olan *M. gibbosus*'un zehrinde bulunan bileşenlerin moleküler, biyokimyasal ve elektrofizyolojik karakterizasyonu çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmıştır [54-58]. Hatta *M. gibbosus*'un gen ekspresyonunun ve toksinlerin genomik organizasyonunun katalogu oluşturulmuş ve elde edilen verilerle toksin transkriptom çalışmaları başlatılmıştır [59].

Yapılan bazı çalışmalarda, çeşitli akreplerin zehrinden izole edilen peptitlerin kanser hücreleri üzerine etkili olduğu gözlenmiştir. Avcı akrep *Leiurus quinquestriatus*'dan izole edilen klorotoksin 36 aminoasitten oluşan peptit olup glioma teşhisinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Glioma hücreleri klorotoksine (CTx) duyarlı ve gliomaya özel olan bir klor iyon kanalını eksprese ettiği gösterilmiştir [60,61]. Başka bir akrep türü olan *Buthus martensii* Karsch'dan elde edilen toksin BmK AGAP sodyum kanalına özgü bir nörotoksindir. BmK AGAP toksini apoptozisi uyarmak suretiyle glioma hücrelerinin gelişimini inhibe etmektedir [51]. İnsan embriyonik böbrek hücreleri ve fare miyoblast hücreleri üzerinde apoptotik ve nekrotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [62]. Klorotoksin spesifik olarak glioma hücrelerine duyarlıdır. İnsan glioma hücrelerinde çoğalmayı engellediği gözlenmiş ve beyin kanseri için tedavi edici özelliği bulunmuştur [63]. *M. gibbosus* Buthidae familyasına dahil bir akrep olup, *Mesobuthus* cinsine ait akreplerin zehirlerinde de klorotoksin gen ailesine dahil toksinlerin bulunduğu belirtilmiştir [59].

Bazı akrep türlerinin zehri, apoptozu indüklediği ve kanser hücrelerinde proliferasyonu durduğu bilinmektedir. Zargan ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada, *Odontobuthus doriae* türü akrep zehrinin, mitokondri depolarizasyonu ile apoptozu indüklediği ve insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) S-fazı popülasyonunu azalttığını gösterdi. Başka bir çalışmada, *O. doriae* zehrinin insan nöroblastoma hücrelerinde DNA sentezini inhibe ettiği ve zehrin apoptozu indüklediği belirtildi [64].

Bu çalışmada, *M. gibbosus*'un ham zehrinin, farklı konsantrasyon ve sürelerde hücre proliferasyonu üzerine etkisini MCF-7 meme kanseri hücre hattında, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle (xCELLigence,) ortaya koymayı amaçladık. Bu amaçla elektrostimülasyon tekniği kullanılarak elde edilen ham zehir içinde total protein konsantrasyonu hesaplandıktan sonra, zehrin azalan dilüsyonları hazırlanarak hücre kültürü laboratuvarında muamele edilen MCF-7 hücrelerinin doz ve zaman bağımlı olarak hücre proliferasyonunun inhibisyonu gözlemlendi. Bunun yanında bu hücelere sitotoksik etkilerinin olduğu da gösterilmiştir. Kontrol olarak çalışmamıza dahil ettiğimiz normal fare fibroblast ve küçük hücreli akciğer kanser hücreleri aynı şekilde ham akrep zehri ile muamele edildi. Çünkü bir toksinin tedavi amaçlı kullanılabilmesi için sağlık hücelere zarar vermemesi ya da bu zararın en az seviyede olması istenir. Ancak normal fare fibroblast hücrelerinin MCF-7 hücrelerine yakın bir oranda zehirden etkilendiği gözlemlendi. Küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu ise MCF-7'ye göre daha az inhibe olmuş yani zehir bu hücre hattının proliferasyonunu pek etkilememiştir. Bu sonuçta bize farklı kanser türlerinin akrep zehirlerine duyarlılıklarının farklı olabileceğini gösterdi.

Sonuç olarak, *M. gibbosus*'un ham zehri meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği gözlemlendi. Bu değerlendirmeyle birlikte, zehir bileşiminde bulunan hücre proliferasyonunu inhibe eden toksin ve/veya etken moleküllerin izolasyonu ve etki mekanizmalarıyla ilgili daha ileri çalışmalar bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] T.C Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Türkiye Onkoloji Hizmetleri Yeniden Yapılanma Programı 2010-2023. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 2010.
- [2] Tuncer, M. Globalleşen Kanser Ve Türkiye, 2008, www.nukte.org.(2016:)
- [3] Türkiye’de kanser istatistikleri. http://www.turkkanser.org.tr/pdf/turkiye%20_istatistikleri-2.pdf. (2016©)
- [4] <https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/kanser.pdf>(2016:)
- [5] Lipps, B.V., Novel snake venom proteins cytolytic to cancer cells *in vitro* and *in vivo* systems. J. Venom. Anim. Toxins, 5:172-183,1999.
- [6] Demirsoy, A., Durmuş Y., Akbulut A., Türkiye scorpiones (akrep) faunasının sistematik ve biyolojik yönden incelenmesi. Proje No : 1998 K 1001 40. Çevre Bakanlığı Çevre Koruma Genel Müdürlüğü Hayvanları Koruma Dairesi Başkanlığı. Ankara, 2001.
- [7] Bayar, T.C., *Mesobuthus gibbosus* (BUTHIDAE) akrep venomunun saflaştırılması ve bazı fizyolojik etkilerinin belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Ens. Biyoloji ABD. Doktora Tezi. Ankara, 2004.
- [8] Özkan, Ö., Karaer, Z., Akreplerin Vücut Yapısı. Türk Parazitoloji Dergisi, 28 (1): 54-58, 2004.
- [9] Özkan, Ö., Kat, İ., Olcay, E., Karaer, Z., Şanlıurfa İlinde *Androctonus crassicauda* (Oliver 1807) Skorpionizm Olgularının Epidemiyolojik ve Klinik Değerlendirilmesi (Poster). Hayvan ısırılmaları-sokmaları ve Karbon Monoksit zehirlenmeleri. Klinik Toksikoloji Kongresi. Bursa, 18-25 Eylül, 2005.
- [10] David, C., Scorpion stings. eMedicine Journal, 2(12), 2001.
- [11] Özkan, N., *Mesobuthus gibbous* türü akrep zehirinin farelerde minimal lethal dozunun (MLD50) saptanması. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 1992.
- [12] Çağlar, M., Omurgasız Hayvanlar. İ.Ü. Yayınlarından Sayı:712 Fen Fakültesi yayımları No:20, 1957.
- [13] Özcel, M.A., Daldal, N., Parazitolojide arthropod hastalıkları ve vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No:13: 461-464, İzmir, 1997.
- [14] http://www.journalagent.com/turkhijyen/pdfs/THDBD_60_2_55_62.pdf(2017:)

- [15] Özkan, Ö. ve Karaer, K.Z., Akreplerin Biyolojisi. Turk Hij. Den. Biyol. Derg., 64:51-60, 2008.
- [16] Wolfgang, B., Classification, Biology and Venom Extraction of Scorpions. In: Bücherl W., Buckley E. Eds., Venomous Animals and their Venoms. Vol. III, Venomous Invertebrates. New York: 3(55): 317–349, 1971.
- [17] Bullington, W.S., Natural history and captive care of flat rock scorpion *Hadogenes troglodytes* (Peters), *Vivarium*, 7(5): 18–21, 1996.
- [18] Bücherl, W., Classification, biology and venom extraction of scorpion In: Bücherl W., Buckley E. Eds., Venomous Animals and Their Venoms. Vol. III, Venomous Invertebrates. New York: Academic Express. 3, 317-347, 1971.
- [19] Yaman, N., Akrepler ve tıbbi önemleri, A.Ü Sağlık Bilimleri Enst. Parazitoloji Anabilim Dalı Entomoloji ve Protozooloji Bilim Dalı Seminer, 1996.
- [20] Lourenço, W. R., Reproduction in scorpions, with special reference to parthenogenesis. *European Arachnology*, 71-85, 2000.
- [21] Özkan, Ö., Karaer, Z., Akreplerin biyolojisi. Türk Hij. Tecr. Biyol. Derg., 64(1): 51-60, 2007.
- [22] Polis, G.A., Farley, R.D. Behavior and ecology of mating in the cannibalistic scorpion, *Paruroctonus mesaensis* sthanke (Scorpionida: Vaejoidea). *J. Arachnol.*, 7: 3346-50, 1979.
- [23] Demirsoy, A., Durmuş, Y., Akbulut, A., Türkiye scorpionnes (akrep)faunasının sistematik ve biyolojik yönden incelenmesi. Proje No : 1998 K 1001 40. Çevre Bakanlığı Çevre Koruma Genel Müdürlüğü HayvanlarıKoruma Dairesi Başkanlığı. Ankara, 118, 2001.
- [24] Hjelle, J.T., Observations on the birth and post-birth behavior of *Syntropis macrura*. Kraepelin. (Scorpionida: Vaejoidea). *J. Arachnol.*, 1: 11721-25, 1974.
- [25] Lourenço, W.R., Cuellar, O., A new all-female scorpion and the first probable case of arrhenotoky in scorpion. *J. Arachnol.*, 27: 149153-60, 1999.
- [26] Benton, T.G., The life history of *Euscorpis flavicaudis* (Scorpionnes, chactidae). *J. Arachnol.*, 19: 105110-13, 1991.

- [27] G., Aytaç, *Mesobuthus gibbous* türü akrep zehirinin şıçanlara etkili minimal lethal dozunun (MLD50) saptanması. E.Ü Sağlık Bilimleri Enst. Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 1992.
- [28] N., Özkan, *Mesobuthus gibbous* türü akrep zehirinin farelerde minimal lethal dozunun(MLD50) saptanması E.Ü Sağlık Bilimleri Enst. Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 1992.
- [29] Özkan, Ö., Karaer, Z., Body structures of scorpions. Turkish Journal of Parasitology, 28:54-58, 2004.
- [30] Stachel, S.J., Stockwell,S.A., and Van Vranken D.L., The fluorescence of scorpions and cataractogenesis. Chem. and Biol., 6(8):531-539, 1999.
- [31] Brownell, P., Gary Polis Edited by, Scorpion Biology And Research, Oxford University Press, 2001.
- [32] Özkan, Ö., Yaman N., Akrep Zehri. Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Bülteni, Ankara, 19-22, 2004.
- [33] Özkan, O., Kat, I., Scorpionism in Sanliurfa region of Turkey, *Mesobuthus eupeus*, J. Venom. Anim. Toxins Inc., 11(4): 479-491, 2005.
- [34] EMEA. The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use. CPMP/BWP/3354/99. London, 2002, 14
- [35] Krifi, M.N., Marrakchi, N., El Ayebe, M., Dellagi, K., Effect of some variables on the in vivo determination of scorpion and vipervenom toxicities. Biologicals. 26: 277-288, 1998.
- [36] Ozkan, O., Adiguzel, S., Yakistiran, S., Filazi, A., Study of the relationship between *Androctonus crassicauda* (Oliver, 1807; Scorpiones, Buthidae) venom toxicity and telson size, weight and storing condition. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis., 12(2): 297-309, 2006.
- [37] WHO, Requirements for immune sera of animal origin (Requirements for Biological Substances, 2009.
- [38] Padilla, A., Govezensky, T., Possani, L.D., Larralde, C., Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion : differences in mortality and symptoms with and

without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon*,41(8):959-965, 2003.

[39] Ozkan, O., Adıgüzel, S., Ates, C., Bozyigit, I., Filazi, A., Optimization of Antiscorpion Venom Production. *J.Venom. Anim.Toxins Incl.Trop.Dis.*, 12(2): 297-309, 2006.

[40] World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. WHO offset publication No58. Geneva, 1981

[41] Antivenom Production Process. Lister Institute of Preventive Medicine. Federal Security Agency U.S. Public Health Service National Institute of Health (Text-book), 161, 1948.

[42] Özkan Ö, Karaer Z. Türkiye akrepleri. *Turk. Hij. Den. Biyol. Derg.* 60: 55-62, 2003.

[43] Wikipedia Anadolu sarı akrebi (2016:)

[44] Lipps, B.V., Novel snake venom proteins cytolytic to cancer cells *in vitro and in vivo* systems. *J. Venom. Anim. Toxins*, 5:172-183,1999.

[45] Baskar, R., Lee, K.A., and Yeo, R., Cancer and radiation therapy:current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3): 193-199, 2012.

[46] Health effects of radon and other internally deposited Alpha-emitters (BEIR IV Report). US National Academy of Sciences. Washington, DC 1998.

[47] Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid B.J., Maley, C.C., Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer*, 6: 924-935, 2006.

[48] Feng, L. Gao, R., and Gopalakrishnakone, P., Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 148(3):250-257, 2008.

[49] Ghulam Nabi, Naveed Ahmad, Sana Ullah, Ghufraan, Sikandar Khan, Therapeutic Applications of Scorpion Venom in Cancer: Mini Review. *Journal of Biology and Life Science*, 2015, Vol. 6, No. 1, 57-66.

[50] Sariego, J., Breast cancer in the young patient. *The American surgeon*, 76: 1397-1401, 2010.

[51] Wang, W.X., Ji, Y.H., Scorpion venom induces glioma cell apoptosis *in vitro* and inhibits glioma tumor growth *in vivo*. *J. Neuro-Oncol* 73: 1-7, 2005.

- [52] Zhang, YY. Wu, LC. Wang, ZP. Wang, ZX. Jia, Q. Jiang, GS., & Zhang, W D., Anti-proliferation Effect of Polypeptide Extracted from Scorpion Venom on Human Prostate Cancer Cells in vitro. Clin. Med. Res., 1: 24-31, 2009.
- [53] İncesu, Z., Çalışkan, F., Zeytinoglu, H., Cytotoxic and Gelatinolytic activities of *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832) Venom. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 36, No. Especial, 2005.
- [54] Ucar, G., Tas, C., Tümer, A., Monoamine oxidase inhibitory activities of the scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Buthidae) venom peptides, Toxicon, 45(1): 43-52, 2005.
- [55] García, E.D, Peigneur, S., Debaveye, S., Gheldof, E., Caliskan, F., Novel potassium channel blocker venom peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae), Toxicon, 61: 72-82, 2013.
- [56] Özkan, Ö., Çiftçi, G., Karaer, Z., Electrophoretical Comparison of Proteins of *Mesobuthus eupeus* and *Mesobuthus gibbosus* Scorpion Venoms. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 17 (Suppl A): 153-158, 2011.
- [57] Ozkan O; Ciftci G, Individual variation in the protein profile of the venom of *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832, Scorpiones: Buthidae) from Turkey, Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., 16(3): 505-508, 2010.
- [58] Uçar G., Taş, C., Cholinesterase Inhibitory Activities of the Scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Buthidae) Venom Peptides. FABAD J. Pharm. Sci., 28: 61-70, 2003.
- [59] Elia Diego-García, Figen Caliskan and Jan Tytgat, The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. BMC Genomics, 15: 295, 2014.
- [60] Kesavan, K., Ratliff, J., Johnson, E.W., Dahlberg, W., Asara, J.M., and Misra, P., Annexin A2 is a molecular target for TM601, a peptide with tumor-targeting and anti-angiogenic effects. Biol. Chem.,: 285, 4366-4374, 2010.
- [61] Veiseh, M., Gabikian, P. and Bahrami, SB., Tumor paint: a chlorotoxin: L Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. Cancer Research, 67, 6882-6888, 2007.

- [62] Omran, M.A.A., Cytotoxic and apoptotic effects of scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom on 293T and C2C12 eukaryotic cell lines. J Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., 9, 255, 2003.
- [63] Fu, Y.J., Yin, L.T., Liang, A.H., Zhang, C.F., Wang, W., Chai, B.F., Yang, J.Y., Fan, X.J., Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxins from the Chinese scorpion for human gliomas. Neurosci. Lett. 412, 62–67, 2007.
- [64] Zargan, J., Umar, S., Sajad, M., Naime, M., Ali, S., Khan, H.A., Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7). Toxicology in Vitro, 25(8): 1748-1756, 2011.

