

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***EUSCORPIUS MINGRELICUS*(SCORPIONES: EUSCORPIIDAE) AKREP**
HAMZEHRİNİN ANTİ-TÜMÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa AKDENİZ

MART 2018

Biyoloji Anabilim Dalında Mustafa AKDENİZ tarafından hazırlanan *EUSCORPIUS MINGRELICUS* (SCORPIONES: EUSCORPIIDAE) AKREP HAM ZEHRİNİN ANTİ-TÜMÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

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

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

27/03/2018

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

Prof.Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

***EUSCORPIUS MINGRELICUS*(SCORPIONES: EUSCORPIIDAE) AKREP HAMZEHRİNİN ANTİ-TÜMÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

AKDENİZ, Mustafa

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof.Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN

Mart 2018, 45 sayfa

Bu çalışmada, *Euscorpius mingrelicus* (Kessler,1874) akrep türü araziden canlı olarak toplanarak laboratuvara getirilmiş ve zehir elde etmek için beslenmiştir. Elektrostimülasyon tekniği ile elde edilen akrep ham zehri mcf-7 meme kanseri hücre hattı, h1299 büyük hücreli akciğer karsinomu ve 1929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkileri incelenmiştir. mcf-7 ve fibroblast hücrelerinde düşük dilüsyonlarda etkili olduğu, h1299 üzerine etkisinin mcf-7 ve fibroblastta göre %50 daha az olduğu belirlenmiştir. Dilüsyon miktarı artıkça zehir etkisinin azaldığı ve h1299 hücreleri üzerinde apoptoz ve nekroz oranlarının düştüğü, hücre proliferasyonuna etki yapmadığı gözlenmiştir. mcf-7 hücrelerine bakıldığında apoptoz ve nekroz oranların birbirine yakın olduğu, h1299 hücrelerinde apoptoz oranının nekroz oranından iki kat fazla olduğu tespit edilmiştir. *E. mingrelicus* akrep zehri her ne kadar mcf-7 hücreleri üzerine kısmen etkili bulunsa da kesin bir şey söyleyebilmek için daha detaylı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Akrep Zehri, Kanser, Anti Tümör, Apoptoz, Nekroz.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTITUMOR EFFECTS OF CRUDE VENOM OF *EUSCORPIUS MINGRELICUS*(SCORPIONES: EUSCORPIIDAE)

AKDENİZ, Mustafa

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN

March 2018, 45 pages

In this study, *Euscorpius mingrelicus* (Kessler, 1874) 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 mcf-7 breast cancer cell line, h1299 large cell lung carcinoma and 1929 fibroblast cells, and then cytotoxic, apoptotic and necrotic 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 h1299. It was observed that the amount of dilution decreased the venom effect on the cells. There was no significant difference between apoptosis and necrosis rates on mcf-7. The rate of apoptosis is determined twice more than the rate of necrosis in h1299 cells. The crude venom of *E. Mingrelicus* scorpion effected on mcf-7 to say clear something gare needed more detailed studies.

Keywords: Scorpion Venom, Cancer, Anti- Tumor, Apoptosis, Necrosis

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, arazi ve laboratuvar çalışmalarına bizzat katılarak destek veren, her türlü yönlendirme, bilgilendirme ve motivasyonumun artmasında yardımcı olan, genç araştırmacılara en büyük desteği veren ve her alanda örnek aldığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmamızda kullandığımız hücre hatlarını temin ettiğimiz Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdür Yardımcısı sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK hocama ve çalışmaları yaptığımız hücre kültür laboratuvarı ekibine teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışmamın bitimine kadar maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem ve babama, tez çalışmaları sırasında tanıştığım ve evlendiğim en büyük destekçim eşime şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLERDİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Akreplerin Genel Özellikleri	2
1.1.1. Akreplerin Anatomisi ve Taksonomisi	2
1.1.2. Akreplerin Yaşam Biçimleri, Doğal Ortamları	3
1.1.3. Akreplerin Beslenmeleri	4
1.1.4. Türkiye Akrepleri	4
1.1.5. Euscorpius mingrelicus (Kessler, 1874) Akrebinin Genel Özellikleri	6
1.2. Akrep Zehri ve Kanser	8
1.2.1. Kanser Üzerine Akrep Zehri Etkileri	8
1.2.2. Akrep Zehri ve Yapısı	10
1.2.3. Akrep Zehri Aktivitesi ve Etki Modu	12
1.2.4. Akrep Toksininin Kullanıldığı Kanser Türleri	13
1.2.4.1. Akrep Toksin ve Glioma	13
1.2.4.2. Akrep Toksin ve Lösemi	15
1.2.4.3. Akrep Toksini ve Meme Kanseri	15
1.2.4.3. Akrep Toksini ve Prostat Kanseri	16
1.2.4.5. Akrep Toksini Deri, Akciğer, Serviks, Özafagus ve Kolon Kanseri .	17
1.2.4.6. Akrep Toksini ve İnsan Akciğer Adenokarsinoması	17
1.2.4.7. Akrep Zehri ve Melanoma	17
2. MATERYAL VE METOD.....	19
2.1. Materyal.....	19
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	20

2.2. Materyal Kazanımı ve Hazırlanışı.....	22
2.2.1. Akreplerin Araziden Toplanması	23
2.2.2. Akrep Ham Zehrinin Sağılması ve Zehrin Hazırlanması	24
2.2.3. Hücre Hatlarının Hazırlanması	26
2.3. Zehrin Uygulanışı.....	26
2.3.1. WST-1 Sitotoksosite Testi.....	26
2.3.2. İkili Boyama (Double Staining) İle Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi.	27
2.3.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA xCELLigance) ile Hücre Proliferasyonunun Takibi	28
3. BULGULAR	29
3.1. Laboratuarda Akreplerin Gözlem Sonuçları	29
3.2. WST-1 Test Sonuçları	29
3.3. İkili Boyama (Double Staing) Sonuçları	30
3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA Xcelligance) ile Hücre Proliferasyonunun Takip Sonuçları.....	32
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	36
KAYNAKLAR	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Çalışmamızda kullandığımız Euscorpius mingrelicus akrebinin dorsal habitusu.....	7
1.2. Kızılcahamam Çamkoru Ormanı'nda arazi çalışmasına ait görüntü.	8
2.1. Çalışmamızda kullandığımız BIOTEK marka Power Wave x52 model mikro plaka okuyuculu spektrofotometre.....	20
2.2. Çalışmamızda kullandığımız Leica marka DMI6000B model inverted mikroskop.	20
2.3. Çalışmamızda kullandığımız İnvitrogen marka hücre sayım cihazı.	21
2.4. Çalışmamızda kullandığımız Roche/ACEA marka xCELLigence RTCAGerçek zamanlı hücre takip cihazı.	21
2.5. Çalışmamızda kullandığımız Hettich marka Rotina 380 R model ultrasantrifüj.....	22
2.6. Arazide kaldırılan bir taş altındaki akrep popülasyonu. Üzerinde yavrularını taşıyan dişi birey (mavi ok), diğeri ise erkek birey (siyah ok).	24
2.7. (A,B) <i>Euscorpius mingrelicus</i> 'un dorsal habitusu, (C) Zehir vermiş akrep (zehir okla işaret edilmektedir).....	25
2.8. Farklı dozlarda zehir uygulanmış hücre hatları.....	27
3.1. mcf-7 hücreleri 1/30 dilüsyon oranındaki apoptoz(a) ve nekroz(b) inverted mikroskop görüntüsü(20x10x)	31
3.2. h1299-7 hücreleri 1-30 doz apoptoz(a) ve nekroz(b) inverted mikroskop görüntüsü(20x10x).....	31
3.3. mcf-7 Hücre Hattı 24 Saatlik Hücre Proliferasyonu (kırmızı 1/30, mavi 1/60, pembe 1/120, türkuaz 1/240, yeşil kontrol)	33
3.4. h1299 hücre hattı 24 saatlik hücre prolifasyon (kırmızı 1/30, mavi 1/60, pembe 1/120, türkuaz 1/240, yeşil kontrol)	33
3.5. mcf-7 ve h1299 Hücrelerinin Karşılaştırılması 1-30 Doz (kırmızı Mcf-7, yeşil H1299)	34
3.6. mcf-7 ve h1299 Hücrelerinin Karşılaştırılması 1-60 Doz (kırmızı Mcf-7, yeşil H1299)	34

3.7. mcf-7 ve h1299 Hücrelerinin Karşılaştırılması 1-120 Doz (kırmızı mcf-7, yeşil h1299)	35
3.8. mcf-7 ve h1299 Hücrelerinin Karşılaştırılması 1-240 doz (kırmızı mcf-7, yeşil h1299)	35



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Akreplerin Sistematiği	3
1.2. Türkiye Akrepleri.....	6
3.1. WST 1 Testi Absorbans Değerler	30
3.2. Apoptoz-Nekroz oranları	32



KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
BmK AGAP	<i>Buthus Martensi Karsh</i> türüne özgü sodyum kanal nörotoksini
CaTx	Kalsiyum kanal toksini
ClTx	Klor kanal toksini
Cy5.5	Yakınındaki fotonları yayan floresan bir molekül
DBPs	Disülfid köprülü peptitler
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EAG	Voltaj bağımlı potasyum kanalı
FBS	Fetal sığır serum
H1299	Büyük hücreli akciğer karsinomu hücre hattı
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HPRC	Hormon etkisiz prostat kanseri
HSP	Isı sok proteini
I ¹³¹ -TM-601	Klorotoksin in iyot eklenmiş sentetik analogu
İl	İnterlokin
KTx	Potasyum kanal toksini
L929	Fare fibroblast hücre hattı
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre hattı
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
MMP	Mitokondriyal zar potansiyeli
MR	Manyetik rezonans
NaTx	Sodyum kanal toksini
NDBPs	Non-disülfid köprülü peptitler
NK	Natürel killers- T lenfosit
PBS	Fosfat buffer tamponu

PESV	<i>Buthus Martensi Karsh</i> türünden izole edilmiş peptit
SMAC	İkincil mitokondriyal kaspaz aktivatörü
WST-1sol.	2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum



1. GİRİŞ

Günümüzdeki en önemli sağlık problemlerinin başında kanser gelmektedir ve gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerine bakıldığında, kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan ölümcül bir hastalıktır. Kanser, hücrelerin kontrol dışı bir şekilde çoğalması, invazif nitelikte olması ve metastaz yapması ile kendini gösterir ve tedavisi zordur. Kanser tedavisinde radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler çok sık kullanılırken, hedefe yönelik tedaviler, biyolojik tedavi yöntemleri ve hormon tedavileri ise daha az kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler ya tek başına ya da kombinasyonları şeklinde uygulanmaktadır (Lipps,1999). Tedavi potansiyeli olan bu yöntemler tedavi özeliğinin yanında sağlıklı hücrelere olumsuz etkilerinden dolayı kimi zaman tedavi edici potansiyelleri çok yüksek olmayabilmektedir. Kimyasal tedavide kullanılan ilaçlar yapay kimyasallar olup, fazla sayıda yan etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Antikanser ilaçlarının tedavideki etkinliğini kısıtlayan önemli faktörlerden biride, tümör hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı, bazı kanser türlerinde kendiliğinden, bazılarında ise kemoterapiden sonradan geliştirdikleri direnç mekanizmalarıdır (Szakács vd,2006). Kanser tedavisindeki amaç, vücutta tek bir malign hücre kalmaksızın tüm hücrelerin yok edilmesidir. Fakat gelinen son noktada böyle bir tedavi birkaç istisna dışında hala mümkün olmamıştır (Kaya Koçdoğan, 2016). Kemoterapötik ajanların yan etkilerinin fazla olması ve gelişen çoklu ilaç direnci dolayısıyla araştırmacılar doğal kaynaklara yönelmişler ve son zamanlarda *biyotoksinlerin* (canlılardan elde edilen toksinler, zehirler) kanser tedavisinde yeni umut olacağı düşünülmektedir.

Akrep, yılan ve örümcek gibi zehirli hayvanların zehirleri, yüksek oranda protein, polipeptit ve çeşitli biyojenik aminler bakımından zengin heterojen karışımlardır. Bu hayvanların venomları kanser tedavisinde dolaylı ve direkt olarak kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle, akrep zehirleri ihtiva ettiği yüksek protein içeriği nedeniyle kanser araştırmalarında ön plana çıkmıştır. Yapılan çalışmalara bakılacak olursa, yakın gelecekte akrep zehirlerinin kanser teşhis ve tedavilerinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla, bu tez çalışmasında, *Euscorpius mingrelicus* (Kessler, 1874) akrep türünün ham zehri mcf-7 meme kanseri hücre hattı, h1299 büyük hücreli akciğer karsinomu ve 1929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkileri incelenmiştir.

1.1. Akrelerin Genel Özellikleri

Akreler, eklembacaklıların Arachnida sınıfı içerisinde Scorpiones takımını oluşturlar (Legros vd.,1998).Akrelerin varlığı yapılan fosil çalışmalarından 420 milyon yıl öncesine dayandığı bilinmektedir. İlk dönem akrepleri yaklaşık 2m boyda yengeç görünümünde, deniz hayvanı merostomatadan köken almış olup Silurian döneminde karaya çıkmışlardır. (Demirsoy vd.,2001; Bayar, 2004).Bugünkü modern akrep nesli, Karbonifer döneminin sonunda ortaya çıkmış ve pek fazla değişikliğe uğramadan günümüze kadar gelmiştir. Çok eski akreplerin yaşayışları ve beslenmeleri hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Karada ve denizde yaşadıkları hakkında çeşitli tartışmalar yapılmıştır (Demirsoy vd., 2001; Bayar, 2004; Dunlop ve Webster 1999., Farley, 1999; Özkan ve Karaer.,2004).

Akreler Yeni Zelanda ve okyanus adaları hariç dünyanın her bölgesinde yerleşmekte olup, tropikal ve subtropikal iklim kuşaklarında daha yaygın bulunmaktadır (David, 2001; Özkan, 1992).

1.1.1. Akrelerin Anatomisi ve Taksonomisi

Akreler, boyları 13-220 mm arasında değişen arthropodlardır. (Çağlar, 1957).Vücutları sefalotoraks (prosoma) ve abdomen (opisthosoma) olmak üzere iki bölümden oluşur. Abdomen mesosoma ve metasoma olarak ikiye ayrılır, metasoma kuyruk olarak bilinir ve en uç kısmında telsonu taşır. Prosoma, kısa olup, sırt tarafından karapaks olarak adlandırılan tek parça zırh ile örtülüdür. Tüm uzuvlar prosomadan çıkar ve sırasıyla, bir çift keliser, bir çift pedipalp (chela) ve 4 çift yürüme bacağıdır (Çağlar,1957).

Günümüzde, dünyada yaklaşık 1700 ile 2000 arasında akrep türü bilinmektedir. Tüm akrepler zehir bezlerine sahip olup, hepsi zehirlidir. Bilinen akrep türlerinden yaklaşık 50'si insanları etkileyecek kadar toksik zehre sahip olup, zehirli akrepler olarak değerlendirilmektedir. Ancak bunların 20-25'inin insanlar için öldürücü olduğu bilinmektedir. Ülkemizde bulunan akreplerden ise sadece 8 tür insanlar

üzerinde etkili zehre sahiptir ve bunların 2'si çok zehirli ve ölümcül özelliktedir (scorpion anatomy,2015).

Tablo 1.1. Akrelerin Sistematığı

Üst alem	Eukaryota (Ökaryotlar)
Alem	Animalia (Hayvanlar)
Alt alem	Eumetazoa (Gerçek dokulular)
Şube	Arthropoda (Eklem bacaklılar)
Alt şube	Chelicerata (Keliserliler)
Sınıf	Arachnida (Örümceğimsiler)
Takım	ScorpionesC. L. Koch, 1837
Üst familyalar	Pseudochactoidea Buthoidea Chaeriloidea Chactoidea Iuroidea Scorpionoidea

1.1.2. Akrelerin Yaşam Biçimleri, Doğal Ortamları

Akreler, yaşamak için nemli ve ılık yerleri tercih ederler. Ilıman bölgelerden sıcak bölgelere yani ekvatora doğru yaklaştıkça vücut büyüklüklerinde artış olur ve tür çeşitliliği artar(Demirsoy vd.,2001;Dunlop ve Webster 1999;Wright,2006;Yaman, 1996). Akreler doğada yaşam ortamlarına göre iki gruba ayrılırlar. Bunlardan ilki ağaç yarıklarında, ağaç kabuklarının ve taşların altında yaşayan akreler, diğeri ise toprakta, oyuk veya yarıklarda yaşayan yer akreleridir. (Demirsoy vd.,2001; Wright,2006;Yaman, 1996).

1.1.3. Akreplerin Beslenmeleri

Akrepler, en olumsuz şartlarda hayatlarını sürdürme konusunda uzmandır. Aylarca açlığa dayanıklıdır. Hatta bazı akreplerin iki yıla kadar aç kalabildikleri bildirilmiştir. Metabolik faaliyetleri en düşük hayvanlar olduklarından az yiyecek uzun süre yetinebilirler. Besinlerle aldıkları sıvılarla, uzun süre suya ihtiyaç duymadan yaşayabilirler. (Wright,2006;Alexander, 1984; Garry vd.,2002).

Akrepler genelde gece aktiftirler. Yağmur ormanlarında yaşayan bazı türler ormanın karanlık alanlarında da gündüz aktif olabilirler. (Özcel ve Daldal,1997; Hubert vd.,1996).

Akrepler yırtıcı ve yağmacı hayvanlar olup yemek konusunda titiz değillerdir. Yamyamlık akreplerin önemli özeliğidir. Avlarına saldırmak, takip etmek yerine sabrederek pusuda beklemeyi tercih ederler. Genelde böcek, örümcek, kırkayaklarla beslenirler. Büyük akreplerin küçük yılan, kertenkele hatta fare yedikleri bildirilmiştir. (Demirsoy vd., 2001; Özkan ve Yaman,2004;Jackman,2002;.Hubert vd.,1996;PolisveFarley,1979).

Büyük kısıpacı olan akrepler, küçük avlarını güçlü kısıpacılarıyla kemer şeklinde sararak öldürür. Küçük akrepler ise avlarını yakalayıp zehirlerini yani venomlarını kullanarak avı sokup felç ederek öldürür. Birinci yürüme bacaklarının altında ki boşlukta bulunan, keliser denilen uzuv akreplerin avlarını emmek için kullandıkları bilinmektedir. Bu uzvu tamamen avına yerleştirip, sindirim ve tükürük enzimleri salgılayarak dokularının sıvılaşmasını bekler ve oluşan sıvıyı emer. Ne kadar zehir enjekte edeceği avın vücut büyüklüğüyle doğru orantılıdır. (Özkan ve Karaer,2004;Jackman,2002;Altıntaş,2002).

1.1.4. Türkiye Akrepleri

Türkiye’de Karataş (2005) göre 4 familyaya ait toplam 23 akrep türü bulunmaktadır. Bunlardan 14’ünün insanları etkileyecek kadar zehirli olduğu biliniyordu. Son yıllarda yapılan çalışmalarla ülkemizdeki akrep tür sayısı 30’u bulmuştur. Ülkemizde, sık görülen ve insan sağlığı için tehlikeli türleri Buthidae familyasına

dâhildir ve zehirleri nörotoksik yapıdadır (Özkan ve Carhan,2008). Diğer familyalardaki akrepler ise sitotoksik yapıda zehre sahiptir. Nörotoksin yapısındaki zehirler genelde insanlar için daha tehlikelidir. (Yağmur ve Tropea,2013).

Çalışmaya konu olan akrep türü *Euscorpius mingrelicus* (Kessler, 1874), *Euscorpius* (Thorell,1876) cinsine dahildir ve bu cins akrep grupları içinde taksonomisi en çok çalışılmış gruplardan birisidir. Güney Avrupa ve Anadolu'da oldukça yaygın olarak bulunurlar ve bu cinse ait türlerin deniz seviyesinden 2600 metre yüksekliğe kadar farklı habitatlarda bulunmaktadır. Türkiye *Euscorpius* cinsine ait tür sayısı 12'ye yükselmiştir (Yağmur ve Tropea, 2015). Bu türlerin tamamı insanları etkileyecek kadar zehirli değildir. (Tablo 1.2).



Tablo 1.2. Türkiye Akrepleri

Familya	Tür	Zehir Durumu	Türkçe Adı
BUTHIDAE (C.L.Koch,1837)	<i>Androctonus crassicauda</i> (Oliver,1987)	Çok zehirli (ölümcül)	Kara Akrep
	<i>Leiurus abdullahbayrami</i> (Yağmur, Koç, Kunt,2009)	Çok zehirli (ölümcül)	Sarı Akrep
	<i>Leiurus quinquestriatus</i> (Ehrenberg,1828)	Çok zehirli (ölümcül)	
	<i>Mesobuthus caucasicus</i> (Nordman,1840)	Zehirli (tehlikeli)	Kafkas Akrebi
	<i>Mesobuthus eupeus</i> (C.L.Koch,1839)	Zehirli (tehlikeli)	Doğu Sarı Akrebi
	<i>Mesobuthus gibbosus</i> (Brulle,1832)	Zehirli (tehlikeli)	Anadolu Sarı Akrebi
	<i>Compobuthusmatthiesseni</i> (Birula,1832)	Az zehirli (tehlikesiz)	Uzun Kuyruklu Akrep
	<i>Hottentotta saulcyi</i> (Simon,1828)	Az zehirli (tehlikesiz)	Mardin Akrebi
CHATTIDAE (Pocock,1893)	<i>Euscorpiusgermanus</i> (C.L.Koch,1837)	Az zehirli (tehlikesiz)	
	<i>Euscorpiuscarpaticus</i> (Linne,1763)	Az zehirli (tehlikesiz)	
	<i>Euscorpius italicus</i> (Herbert,1800)	Az zehirli (tehlikesiz)	
	<i>Euscorpius mingrelicus</i> (Kessler,1874)	Az zehirli (tehlikesiz)	
SCORPIONIDAE (Latereille,1802)	<i>Scorpiomaurus fuscus</i> (Ehrenberg,1829)	Az zehirli (tehlikesiz)	Kalın Kısaçlı Akrep
IURIDAE (Pocock,1893)	<i>Calhas nordmanni</i> (Birula,1899)	Az zehirli (tehlikesiz)	Artvin Akrebi
	<i>Lurus asiaticus</i> (Birula,1903)	Az zehirli (tehlikesiz)	
	<i>Protoiurus kraepelini</i> (Ubisch 1922)	Az zehirli (tehlikesiz)	

1.1.5. *Euscorpius mingrelicus* (Kessler,1874) Akrebinin Genel Özellikleri

Yaptığımız çalışmada kullandığımız akrep türünün zehrinin, tıbbi olarak insanlar üzerinde öldürücü etkisi yoktur. Boyları 30-40 mm olup koyu kahve renkli vücuda sahiptir. Pedipalplerin ventral yüzeyinde 6 tane trichobotrium bulunur. (The

scorpione files,2002;Scorpions,1999). Bu tür ormanlık ve dağlık alanları tercih ederler. Taş, ağaç kabukları, kütük altlarında nemli yerlerde yaşarlar (Şekil 1.2). Ülkemizde tüm Karadeniz kıyısı, Trakya hariç Marmara bölgesi kuzey Anadolu bölgesinde yayılış gösterir.



Şekil 1.1. Çalışmamızda kullandığımız *Euscorpius mingrelicus* akrebinin dorsal habitusu



Şekil 1.2. Kızılcahamam Çamkoru Ormanı'nda arazi çalışmasına ait görüntü.

1.2. Akrep Zehri ve Kanser

1.2.1. Kanser Üzerine Akrep Zehri Etkileri

Gelişmiş ülkelerde meydana gelen ölümlerin %20'si kanserden olmaktadır. En çok görülen; mide, akciğer, meme, kolon, rektum, serviks ve orofarenks kanserleridir.

Günümüzde uygulanan kanser tedavi protokollerinde kullanılan ilaçlar etkilerini kanser hücrelerinin DNA sentez ve replikasyonunu engelleyerek gösterirler. Kanser tedavilerinde radyoterapi ve cerrahi yöntemler de kemoterapotiklerle beraber kullanılabilir. Bu yöntemlerin kanser hücreleri üzerinde seçici olarak etkili

olduğunu söylemek zordur ve sağlıklı hücreleri de etkilediği bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı kanserle mücadelede yeni yöntemler araştırılmaktadır. (Lipps,1999).

1950'li yıllardan sonra anti tümör etkinlik sağlamakta biyolojik ajanlar üzerinde araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Günümüzde, kansere karşı standart kemoterapi yöntemlerinin yerine biyoterapi yöntemleri denenmektedir. Monoklonal antikolar biyotoksinler ve interferonlar gibi biyolojik ajanlar; güçlü terapötik etkileri ve düşük yan etkilerinden dolayı yakın gelecekte klasik neoplastiklerin yerini alabileceği düşünülmektedir(Lips,1999).

Sağlıklı insanlarda çeşitli mutasyonlardan dolayı tümör hücreleri gelişir. Bu hücrelere karşı ilk müdahaleyi bir T lenfosit olan NK (Naturel Killers) hücreleri yapar. Bu engeli aşan kanserli hücreler vücudun herhangi bir yerinde tümoral kitle oluşturur (Lips,1999). Kanser sinsi bir hastalık olduğundan genelde metastatik evrede tanı konur. Bu aşamada kemoterapi, radyoterapi ve klasik ilaçlar kanser hücrelerini yok ederken sağlıklı hücreleri de yok eder. Bu aşamada kansere karşı profilaktik ajanları geliştirilmesine ihtiyaç doğmuştur. Bu tür ajanlar immün sistemi uyarmadan, NK hücrelerinin bağışıklık yanıtı destekleyici yönde etkiler (Lipps,1999).

Kanser hücreleri yüzeyinde bulunan protein yapıdaki iyon kanalları ile zehir bileşenleri arasındaki etkileşim antitümör etkinin gelişiminde önemli rol oynar. Farklı tümör tiplerinde hERG geni tarafından aşırı miktarda eksprese edilen Potasyum (K^+) kanal blokerleri kanser vakalarında terapötik etkinlik sağlayabilir. Akrep zehri kaynaklı Ergoksin (ErgTX) ve *Buthus eupeus* akrebinden izole edilen(BeKM-1) 'in hERG geni ile ilişkili K^+ kanalları üzerinde bloke etkisiyle çeşitli kanser tiplerinde terapötik yarar sağlayabileceği düşünülmektedir (Lewis ve Garcia,2013.,Pardo-Lopez vd,2002., Milnes vd, 2003, Diochot vd.,2003).

Antitümör etkinlik sağlamada bir diğer mekanizma voltaj bağımlı K^+ kanalları(EAG)'dır. Bu kanallar hücrelerin yaşam siklusu ve onkolojik faaliyetlerinde görev yaparlar. Normal şartlarda bu kanallar sadece beyin dokusunda ve sınırlı sayıda bulunurken malign transformasyon gelişmesi halinde beyin dışı dokulara eksprese olduğu görülür. Bu kanalların sayısının artması hücrelerin

çoğalma sürecinde bir takım değişikliklere kontakt inhibisyon ve büyüme faktörlerine olan bağımlılıklarını yitirmelerine yol açar. Voltaj bağımlı K⁺ kanallarının insan meme, akciğer, prostat, kolon ve karaciğer karsinomu hücre serilerinde aşırı miktarda eksprese olduğu, bu yapıların deniz canlılarının zehir bileşenleri ile inhibe edilmeleri halinde ise sayılan tümör serilerinde DNA sentezi ve hücre proliferasyonu süreçlerinin yavaşladığı gösterilmiştir(Stuhmer,2002).

1.2.2. Akrep Zehri ve Yapısı

Akrepler venomlarında; çok sayıda biyoaktif bileşenleri biriktirerek avlarını yakalama ve kendini savunmada kullanırlar (Gurevitz vd, 2007). Akrep zehirleri 100'den fazla farklı bileşik içeren kompleks karışımlardır. İçerisinde mukoza, oligopeptid, nukleotit, aminoasit, çeşitli iyon ve tuzlar, norötransmitter, su ve düşük molekül ağırlıklı maddeler ile fosfolipaz, hiyarulinodaz, lipaz, alkalın fosfotaz ve proteolitik enzim içerir (Park vd.,2007).

Akrep venomları insanda toksiktir. Merkezi sinir sistemi hasarı, alerjik reaksiyonlar, doku nekrozu ve hatta ölümle sonuçlanabilecek ciddi reaksiyonlar meydana getirmektedir. (Gurevitz vd.,2007). Akrep zehri insanda nörotoksik, hemolitik ve kas üzerine etkileri bilinmektedir (Diniz,1978; Willems vd.,2002).

Ölümle sonuçlanacak ciddi etkilerin yanında; özellikle merkezi sinir sistemi hastalıkları (örneğin epilepsi ve felç) gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. (Xiong vd,1999; Mortari vd,2007). Ayrıca antibakteriyal, antifungal, insektisid, antitümör, ağrıkesici, sitotoksik ve çeşitli hücreler üzerinde apoptotik etkileri bildirilmiştir (Diniz,1978;Willems vd,2002). Akrep venomları, insanda romatizma tedavisinde, pankreas iltihabı, cilt kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, böbrek tümörü, erkek iktidarsızlığı, beyin tümörü, lösemi epilepsi, HIV, tetanus, kardiovasküler hastalıklar, derialtı nodülleri, akut ve kronik konvülsiyon tedavisinde kullanılabilmektedir (Chenvd,2012).

Akrep zehirleri; farklı kanal ve kanal yapısı, bağlanma bölgesi ve tesir temelinde sınıflandırılır. Akrep zehirleri molekül boyutlarına göre uzun ve kısa zincirli

peptitler, çeşitli hayvan gruplarına etkilerine göre böceklerle, memelilere ve kabuklulara özel toksinler etki mekanizmasına göre nörotoksinler ve sitotoksinler, disülfid köprüsü bulundurmalarına göre; disülfid köprüsü içeren peptitler (DBPs) ve disülfid içermeyen peptitler (NDBPs) olarak iki grup altında değerlendirilebilir (Zhijian vd, 2005).

Disülfid Köprülü Peptitler (DBPs), nörotoksin olarak aktivite gösteren, Genelde zara bağlı iyon kanallarıdır. 3-4 disülfid köprüleri içerirler. membran kanallarının türüne dört farklı alt sınıflara ayrılır. DBPs ailesi Na^+ , K^+ , Ca^+ , Cl^- iyon kanallarını içerir. Bu kanallar birçok memeli canlılar içerisinde hücresel fizyolojiyi düzenleme de önemli rol oynarlar. Akrep sokmaları sırasında memelilerde birçok semptomlar bu kanalların işlevi bozularak, önemli değişiklikler yapmaktadır (Ammar ve Qosay,2014).

Sodyum Kanal Toksinleri (NaTx),Aksiyon potansiyelin üretilmesi ve yayılması için voltaj bağımlı sodyum kanalları kritik öneme sahiptir. Toksinler çeşitli reseptör bölgeleri üzerindeki α -alt birimine bağlanıp por oluşturarak bu kanalları hedef alırlar. Memelilerde ve böceklerde akrep toksini farklı sodyum kanal alt tiplerini tercih ederler (Yu ve Catterall,2003).Sodyum kanallarını etkileyen uzun zincirli toksinler öncelikle alfa(α)-toksin ve beta (β)-toksin olmak üzere iki esas alt tipe ayrılır. Akrep α -toksinleri omurgalılarda Na^+ kanallarına bağlanırlar. Alfa-toksinler sodyum kanal reseptör afinitesini aniden inaktive eder ve sinir - kas potansiyellerinin uzamasına neden olur. Omurgalılarda β -toksinler sodyum kanal reseptörü olarak 4.bölgeye bağlanır. Membran potansiyelinin ani şekilde yön değiştirmesine ve daha negatif zar potansiyeline neden olur(Possani vd.,2000;Cestele ve Catterall,2000).

Potasyum Kanal Toksinleri (KTx):Potasyum kanalları biyolojik süreçlerde önemli rollere sahiptir. İnsan patolojilerinde artan sayıda değişiklik gösterirler. Çeşitli potasyum kanalları blokerleri kanser, inflamatuvar, nöropati, otoimmün hastalıklar gibi biz dizi tedavide kullanılır. Potasyum kanallarını hedef alan akrep toksinleri 3 veya 4 disülfid köprüsüyle çapraz bağlanmış kısa zincirli peptitlerdir (Shieh vd,2000).

Tenenholz ve arkadaşları (2000) yaptığı çalışmada, α heliks, iki köprü ile bağlanmış 2 ya da 3 adet β -pilli tabakadan oluşmuş α - β iskele yapısı tanımlamıştır. α - β katlanması sodyum kanal toksinleri gibi çeşitli fonksiyonları paylaşırlar. Çeşitli

alışmalar *Tityus serrulatus* (Lutz &Mello,1992) akrep zehrinden izole edilen a-ktx-12.1 aynı zamanda TsTxIV olarak adlandırılan nörotoksin 4 disülfıt köprüsü içermektedir. Bu kanalların bloklanmasıyla gecikmiş tip yüksek duyarlılık ve T hücre aktivasyonunda azalma, in vitro olarak gösterilmiştir. Üç Brezilya akrep türü *Tityus stigmurus*, *T.bahiensis*, *T.serrulatus* zehirlerinden izole edilen bütantoksin tersinir bir etki yaparak potasyum kanallarını bloklayıp T hücrelerin çoğalmasını ve IL-2 üretimini inhibe etmektedir (Shieh vd,2000;Tenenholz vd,2000; Holaday vd,2000).

Kalsiyum Kanal Toksinleri (CaTx), gen ifadesi, intrasellüler metabolizma, nörotransmitter salınımı ve hücreyel uyarılma gibi fonksiyonların düzenlenmesinde Ca^{++} iyonları önemlidir. Kalsiyum kanalları yaygın olarak endokrin hücreleri, düz kas, iskelet kası, kalp kası ve nöron gibi vücuda dağılmaktadır. Akrep zehri içinde bulunan çok sayıda peptitler iyon kanalları faaliyetlerini ve onların fonksiyonlarını modüle ederek etkiler. Bu peptitler farmakolojik ve fizyolojik özelliklere sahiptir. Çeşitli alışmalar göstermiştir ki protein mühendisliğı iskeleleri, kanser tedavisi, aşılarda ve böcek öldürücü olarak kullanılmaktadır(Catterall,1992).

Non-Disülfıt Köprülü Peptitler (NDBPs),Anti-kanser, Anti-inflamatuar, anti-mikrobyal, hemolitik, bağışıklık düzenleyici faaliyetleri olmaktadır (Ammar ve Qosay,2014).

1.2.3. Akrep Zehri Aktivitesi ve Etki Modu

Akrep zehirleri etkisini hücre zarını parçalayıp ölümcül depolarizasyona yol açan iyonların hareketini etkilemek şeklinde gerçekleştirmektedir. Zehir bileşenleri, hücre zarında gözenekler oluşturur, hücre içeriğinin dışarıya sızmasına neden olarak etki gösterirler. Akrep zehirlerinin peptidleri aynı zamanda, hücre zarının bozulmasına neden olan hidrolazları içerirler. Hidrolazlar membran lipidlerinin dağılımı karıştırarak, membran fonksiyonunu bozarlar (Tossi vd,2000).

1.2.4. Akrep Toksininin Kullanıldığı Kanseri Türleri

Kanser dünya yüzeyinde önemli bir sağlık problemidir. Dünya yüzeyinde kanserden ölüm ve hastalık çok fazla olduğundan dolayı acilen daha iyi tedavilerin bulunması gerekmektedir. Kanser tedavisini radyoterapi, ameliyat, kemoterapi, immünoterapi ve hormonal tedavi içermektedir. Uygulanan tedavi yöntemleri arasında kimyasal tedavi en yaygın kullanılmaktadır. Ancak hastalıklar sıklıkla kemoterapotiklere karşı tümörler tarafından direnç geliştirmektedirler. Buna ilaveten kemoterapotiklerin sıklıkla kullanımı ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Bu durumdan dolayı kansere karşı yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir (Baskar vd,2012).

1.2.4.1. Akrep Toksin ve Glioma

Glioma hızla yayılan tıbbi ve cerrahi tedaviye dirençli beyin kanserinin oldukça invazif şeklidir. Omurga da ve beyinde tahribata yol açar. En yaygın görüldüğü yer beyindir. Glioma adı, sinir sistemi hücrelerinden birisi olan glial hücrelerden kaynaklanmaktadır. Akrep toksinlerinin gliomada kullanımı tümör sınırları belirlemek içindir. Tümörlü dokuya floresan işaretli akrep toksini enjekte edilerek kanserli dokunun sınırlarının belirlenmesinde ve kanser hastalıklarının tedavisinde kullanabilmektedir. BmK AGAP *Buthus martensi Karsh* türüne özgü sodyum kanal nörotoksindir. Bu toksin apoptosu uyarak glial hücrelerde büyümeyi inhibe eder.

Avcı akrep (*Leiurus quinquestriatus*) zehri 36 aminoasitten oluşan bir peptid içerir ve buna ‘klorotoksin’ (klorotoksin) denir. Klor kanallarını bloke eder. Memelilerde çok zehirli olan bu toksin böceklerde zehirli değildir. Glioma hücrelerinin klor iyon kanallarına özel olan klorotoksine (ClTx) duyarlı olduğu gösterilmiştir. ClTx özellikle glioma hücrelerine bağlanan diagnostik ve terapotik potansiyele sahip glioma özgül işaret olarak hizmet edebilir. ClTx’ler hayat kurtaracak glioma kanser hücrelerinin erken tedavisinde kullanılabilir (Vesieh vd,2007;Kesevan vd,2010).

Akrep zehir bileşenlerinden klorotoksin, özel olarak Ca^{++} ile aktive olan Cl^- kanallarına bağlanmak suretiyle glioma gibi nöroektodermal kaynaklı neoplazmlara karşı terapötik etkinlik sağlamaktadır. Glial hücreler nöral kök hücreler olup diğer

nöronlardan farklı olarak bölünebilme ve göç etme potansiyeline sahiptir. Bu hücreler ancak malign transformasyon gelişmesi halinde yüzeylerinde aşırı miktarda Cl^- kanallarına eksprese olur. Klor kanalları farklı kanser tiplerinde hücre yüzeyinde aşırı miktarda eksprese olan membran proteinleri arasında yer alır. Klor kanalları hücrenin sıvı dengesinin idamesinden sorumlu iyon kanalı olup glioma hücrelerinin yayılma potansiyelinden sorumludur. Glioma hücreleri taşıdıkları klor kanalları aracılığıyla hücre içi sıvıyı hücre dışına atarak küçülür beynin daha yoğun bölgelerine metastaz yapabilme özeliği kazandırır. Klorotoksin ise klor kanallarına karşı aşırı afinitesi sebebiyle hücreden sıvı kaybını önler ve dolayısıyla tümörün büyümesi, gelişmesi ve yayılımını önlemiş olur. Klorotoksin klor kanal blokajının yanı sıra gliomalarda miktarı aşırı artış gösteren matriks metalloproteinaz enzimini inhibe eder. Glioma çok hızlı metastaz yapma kabiliyetine sahip olup genelde cerrahiden fayda göremeyecek devrede tanı konulur. Erken tanı konduğu takdirde tek çözüm cerrahidir. Bu bakımdan klorotoksin nöroektodermal kaynaklı kanser türlerine cerrahi öncesi denenebilecek anti-tümör ajan olması muhtemeldir. İyot eklenmiş I^{131} -TM-601 adlı klorotoksin analogu sitolitik aktiviteli olduğu gösterilmiştir. Klinik glioma olgularında denenmektedir(Skarnulis vd,2003).

Faz II çalışmaları glioma hastalarında görüntüleme ve radyoterapi de klorotoksin kullanımı üzerine yürütülmektedir. Normal hücrelerden kanser hücrelerini ayırmak için CITx: Cy5.5 Biyokonjugat adında floresan işaretli malzeme kullanılmıştır. Bu Cy5.5 çevredeki sağlıklı dokulara zarar vermeden kanserli hücrelerin tüm çevresinin tespit edip cerrahi işlemle daha rahat kaldırmak için iyi bir şans verir (Possani vd,1999). CITx: Cy5.5 yakınındaki fotonları yayan floresan bir moleküldür. Kızılötesi spektrumda ve dolayısıyla kızılötesi gözlük yardımı ile ameliyathanede ameliyat işlemi sırasında kanser çevre dokusunun net bir şekilde görüntülenmesini sağlar. Fare modellerinde yapılan çalışmalarda; Cy5.5 Manyetik Rezonans(MR)'tan 500 kat daha duyarlı hale geldiği,2000 den fazla kanser hücrelerinde tümörü tespit edebildiği gösterilmiştir (Possani vd.,1999).

1.2.4.2. Akrep Toksin ve Lösemi

Lösemi bir kemik iliği kanser türüdür. Olgunlaşmamış (blast) beyaz kan hücrelerinin anormal artışıdır. Hindistan akrebinden (*Heterometrus bengalensis*, Koch) yüksek molekül ağırlıklı *bengalin* isimli protein izole edilir. Bengalin sitotoksik, apoptogenik ve anti-proliferatif aktiviteye sahiptir. k562 (kronik myelojen lösemi) ve u937 (histiyosit lenfoma) apoptoz indikasyonu tespit edilmiştir. Bengalin, insan lösemi hücreleri üzerine antikanser etkisi, mitokondriyal ölüm kaskadıyla moleküler mekanizma sağlamaktadır. (Hayden vd,2006; Gupta vd, 2010). Bengalin u937 ve k562 hücrelerinin büyümesini önlediği, hücre döngüsünü G1 fazında durdurduğu, erken apoptotik hücrelerde artış, DNA fragmentasyon büyüme ve telomeraz aktivitesi azalma meydana getirdiği hasarlı çekirdeklerden apoptoz ile anlaşılmıştır. Bengalin tedavisinden sonra Bax/Bcl-2 oranı yükselmiş ayrıca sitozol içerisinde sitokrom C salınımını serbest bırakan mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) azalma olmuştur. Bu sonuçlar, Bengalin'in, insan lösemi hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisi için farazi bir moleküler mekanizma sağlayabileceği varsayılmaktadır (Gupta vd,2010).

1.2.4.3. Akrep Toksini ve Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokusundaki herhangi bir yerinden kaynaklanabilen bir kanserdir. Sık rastlanan tipi; meme kanallarından gelişen “duktal” kanser denen kanserlerdir. Süt üreten bezlerden köken alan “lobüler” kanserler de diğer bir türüdür. Ayrıca diğer meme dokularından kaynaklanan daha nadir medüller, tübüler, müsinöz gibi tipleri de vardır. Meme kanseri ortaya çıkışında genetik faktörler çok önemlidir. Genetik yapının bozulması ve normal yaşlanmanın etkisiyle kanser ortaya çıkabilir. Ancak meme kanserlerinin sadece %7-9'luk bir kısmı ailesel geçişlidir. Özellikle anne tarafında genç yaşta meme kanseri ve erkek meme kanseri görülmesi ailesel bir geçişe işaret edebilir. Süt kanallarının iç astarında yaygın olarak görülür. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaygındır. Kadınlarda akciğer kanserinden sonra ölüm nedeni olarak ikinci sırada yer almaktadır. Endişe verici bir şekilde artış göstermektedir. Meme kanseri tedavide önemli gelişimler olmasına rağmen sağ

kalım oranı %20-25 arasındadır. Meme kanseri hastalarında en sık görülen ölüm tümör içerisinde büyüyen anjiyojenik kan damarlarının içini istila eden kanser hücrelerinin metastatik yayılımıdır. Meme kanseri invaziv ve noninvaziv olarak olabilir. İnvazif meme kanserinde dokulara, süt kanallarına veya lobüllere yayılmıştır. Noninvazifte ise diğer doku ve bölümlere yayılım yoktur. Çin kırmızı akrebinden (*Buthus martensi Karsh*) zehrinden A-hyaluroridaz (BmHYA1) saflaştırılmıştır. İnsan meme kanser hattı (MDA-MB-231) çok sayıda hiyalüronan içerir. Hiyalüronidaz terapötik ve toksik yan etkisi olmaksızın anti-kanser tedavi için yeni bir sınıfı oluşturmaktadır (Feng vd.,2008; Sariego,2010).

1.2.4.3. Akrep Toksini ve Prostat Kanseri

Erkeklerde en önemli ölüm nedenlerinden birisi prostat kanseridir. ABD’de erkekler arasında görülen kanserler içerisinde ikinci sırada görülmektedir. Kanser tanısı konulan her üç erkekten biri prostat kanseridir. Ancak prostat kanseri ülkemizde daha az sıklıkla görülmektedir. Prostat, erkek üreme sisteminin bir bölümü olup, kalın bağırsağın son kısmının önünde ve mesanenin hemen altında yerleşmiş olup, idrar yolunu kalın bir yüzük gibi sarar. Normal şartlarda prostat bezi sadece bir ceviz büyüklüğündedir. Androjenler (erkek hormonları) prostatın büyümesini sağlar. Prostat aşırı büyüdüğü zaman idrar yoluna baskı yaparak idrarın mesaneden penise akımını yavaşlatır ya da durdurur.

Buthus martensi Karsch (BmK) türü akreplerden izole edilmiş olan PESV, 50-60 aminoasit içeren peptit olup anti-proliferatif, sitotoksik ve insan göbek damarı hücreleri için de apoptotik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir. Akrep zehrinden elde edilen polipeptid (PESV) özü androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattına karşı etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Hormon etkisiz prostat kanseri(HRPC) bir sorun olarak devam etmektedir(Zhang vd,2009).

1.2.4.5. Akrep Toksini Deri, Akciğer, Serviks, Özafagus ve Kolon Kanseri

Kolon, yemek borusu, servikal, akciğer ve cilt kanseri erken teşhisi için klorotoksin noninvazif tarama aracıdır. Klorotoksin demiroksit nano partikülleriyle birleşerek polietilen glikol bağlayıcı oluşturur. Oluşan bu yapı ilaç ile hedeflenen ligandları başarılı bir şekilde bağlar. Bu nanopartiküller tümör hücreleri üzerinde tercihen birikir ve tümör hücrelerinde sitotoksiteyi artırır. Bu çok fonksiyonlu nanopartikül sistemi kanser tanı ve tedavisinde potansiyel uygulama alanı bulabileceği düşünülmektedir(Sun vd,2008).

1.2.4.6. Akrep Toksini ve İnsan Akciğer Adenokarsinoması

Akrep zehri jelatinolitik ve sitotoksik aktiviteye sahip proteolitik enzim, alkalin fosfataz, asetilkolin esterase, fosfolipaz A2 gibi enzimleri ihtiva eder. Zehir içinde proteolitik enzimler kangren, hemoliz ve nekroza neden olabilir. Çeşitli kanserlerin tedavisinde bu proteazların teşhisi çok önemlidir. *Mesobuthus gibbosus* akrep zehrinden izole edilen proteazlar insan akciğer adenokarsinomu hücre hatları üzerine uygulandığında kanser hücre hatlarında önemli bir azalma rapor edilmiştir. İnsan akciğer adenokarsinomuna karşı bu peptitler çok güçlü jelatinolitik ve sitotoksik etki gösterir(Pessini vd,2001).

1.2.4.7. Akrep Zehri ve Melanoma

Akrep zehrinden elde edilen TRAIL peptidi (TNF ilişkili apoptoz uyaran ligand) melanoma hücrelerinde apoptosizi uyarmak için kullanılır. Normal hücreler etkilenmezken bu peptitler yalnızca kanser hücrelerini hedef alır. Melanoma kanser hücrelerindeki TRAIL proapoptotik Bcl-2 ve kaspazları başlatır. TRAIL, SMAC (İkincil mitokondriyal kaspaz aktivatörü), AIF (apoptoz indükleyici faktör)ve sitokrom C gibi mitokondriyal faktörlerin salınımına neden olarak, mitokondri dış membran permabilizasyonuna ve depolarizasyonuna neden olur. Bu faktörler

melanoma kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder ve apoptoz ile ölümü uyarır (Norberg vd,2010).



2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

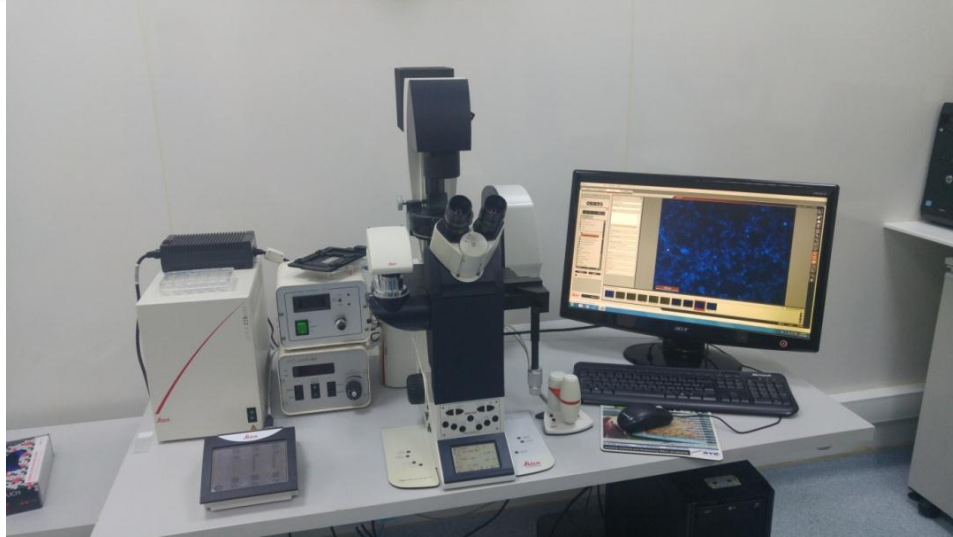
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- %1 penisilin streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- RPMI(L-glutamine, without sodium bicarbonate)
- WST-1 Solüsyonu
- Ribonukleaz-A
- Propodium İodide
- Hoescht 33342
- FBS (Fetal sığır serum%15 oranında eklenir)
- Tripsin-EDTA (Hücreleri flakstan kaldırmak için kullanılır.)
- MEM- α
- PBS (fosfat tuz tamponu): Yıkama solüsyonu 100 ml saf su içerisine 1 tablet

2.1.2. Kullanılan Cihazlar



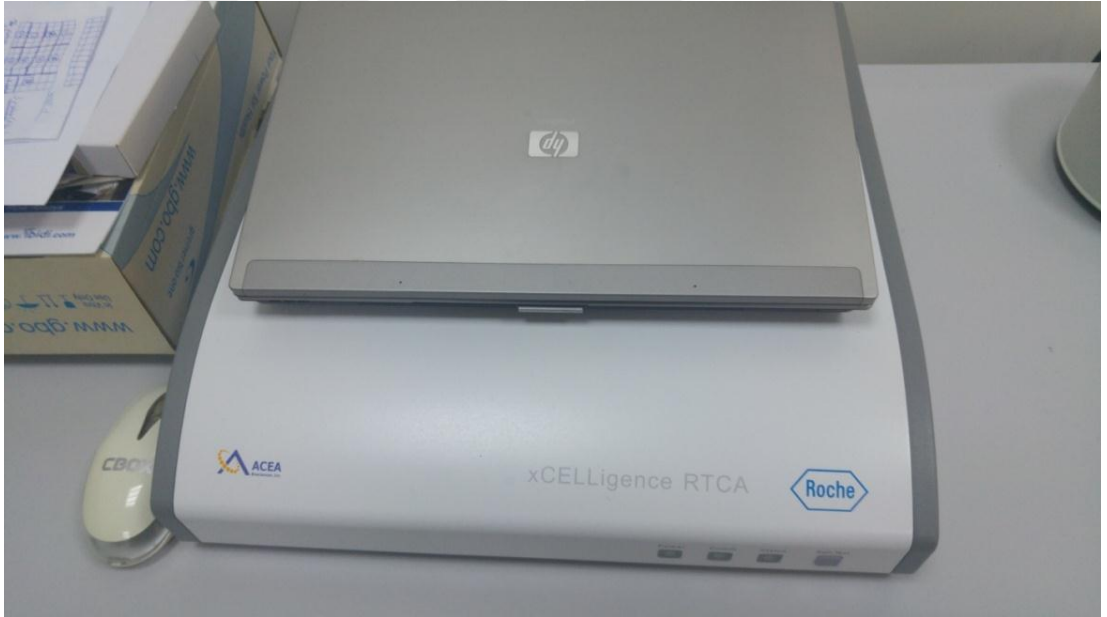
Şekil 2.1. Çalışmamızda kullandığımız BIOTEK marka Power Wave x52 model mikro plaka okuyuculu spektrofotometre.



Şekil 2.2. Çalışmamızda kullandığımız Leica marka DMI6000B model inverted mikroskop.



Şekil 2.3. Çalışmamızda kullandığımız İnvitrogen marka hücre sayım cihazı.



Şekil 2.4. Çalışmamızda kullandığımız Roche/ACEA marka xCELLigence RTCA Gerçek zamanlı hücre takip cihazı.



Şekil 2.5. Çalışmamızda kullandığımız Hettich marka Rotina 380 R model ultrasantrifüj.

Diğer cihazlar:

Cihaz Adı: Testo 662Marka/Model dahili sıcaklık ve nem sensörü.

Cihaz Adı: BINDERMarka/Model İnkübatör.

Cihaz adı: TechnoStar marka derin dondurucu.

2.2. Materyal Kazanımı ve Hazırlanışı

Yukarıda da görüldüğü gibi değişik akrep zehirlerinin çeşitli kanser hücreleri üzerine etkileri araştırılmaktadır. Glioma gibi bazı kanser türlerinin teşhis ve tedavisinde akrep zehirleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada, aslında insanları etkileyecek kadar yoğun zehre sahip olmayan bir akrep türü olan *Euscorpis mingreliscus*'un ham zehrini iki farklı kanser türü ve normal fibroblast hücre hattı üzerinde denenmiştir. Bu sayede, *E. mingreliscus* zehrinin antitümör dolayısıyla sistotoksik etkisi var mı yok mu araştırılırken, görülen hücre ölümleri apoptozla mı yoksa nekrozla mı

gerçekleştirdiği de araştırılmıştır. Literatürler incelendiğinde, bu tür çalışmalara konu olan akrep zehirleri çoğunlukla insanları zehirleyecek kadar etkili olan akreplerdir. Bu çalışmada, insanları etkileyecek kadar zehirli etkisi olmayan bir akrep türünün zehri de aynı şekilde kanser hücreleri üzerine etkili midir? Sorusuna cevap bulmak için de tasarlanmıştır. Bu açıdan da, bu tez çalışması bir ilk olup, bundan sonra bu konuyla ilgili yapılacak çalışmalara temel teşkil edecektir.

2.2.1. Akreplerin Araziden Toplanması

Bu çalışmada kullanılacak *Euscorpius mingrelicus* akrepleri Ankara ili, Çamlıdere ve Çamkoru Ormanı'ndan (33°E, 40°N, Ankara, Turkey), 15 Temmuz-15 Eylül 2015 tarihleri arasında yapılan arazi çalışmalarından taş altından (Şekil 2.6) yakalanmıştır. Laboratuara canlı olarak getirilen akrepler, tür teşhisi yapıldıktan sonra özel olarak hazırlanmış bireysel yaşam ortamlarına konularak hafta da bir kez çekirge, sinek ve küçük böceklerle beslenip, haftalık zehir sağımı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.6. Arazide kaldırılan bir taş altındaki akrep popülasyonu. Üzerinde yavrularını taşıyan dişi birey (mavi ok), diğeri ise erkek birey (siyah ok).

2.2.2. Akrep Ham Zehrinin Sağılması ve Zehrin Hazırlanması

Laboratuarda özel olarak hazırladığımız bireysel yaşam alanlarına bırakılan akrepler zehir miktarları azalmasın diye bir hafta aç bırakıldıktan sonra elektrositümülasyon yöntemi kullanılarak zehir sağımı yapılmıştır. Elektrostimülator ile 15-20 voltluk akım akrep kuyruğuna iki elektrot kullanılarak uygulanmıştır. Telsonun uç kısmında bulunan zehir iğnesinden (sting) enjektör ile ham zehir toplanmıştır (Şekil2.7). Elde edilen ham zehir double distile su içerisinde çözülerek, 15 dakika süreyle +4 °C'de 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında peptid toksinleri içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak 280 nm dalga boyunda tespit edilmiştir.

Elde edilen ham zehrin protein içeriği 3290 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak bulunmuştur. Elde edilen ham zehir deney gününe kadar -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Elde edilen zehir 25cm³'lük flakslarda kültüre edilmiş olan kanser hücre hatlarına sırasıyla 1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, 1/1920,1/3840) şeklinde dilüye edilerek uygulanmıştır.



Şekil 2.7.(A,B) *Euscorpis mingrelicus*'un dorsal habitusu, (C) Zehir vermiş akrep (zehir okla işaret edilmektedir)

2.2.3. Hücre Hatlarının Hazırlanması

İnsan Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu (h1299), İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (mcf-7) ve fare normal fibroblast (1929) hücre hatları Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı (KUBTAL) hücre koleksiyonundan temin edilmiştir. Çalışmalarımız aynı laboratuvarında, oranın standartlarına uygun olarak yapılmıştır.

Belirtilen hücre hatları 15 ml medyumda 25cm³'lük flakslarda ve içerisinde 0,1 mM L-glutamin ve %10 ısı ile aktive edilmiş FCS (Fetal Calf Serum) içeren DMEM medyumunda içerisinde 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde geliştirilmiştir.

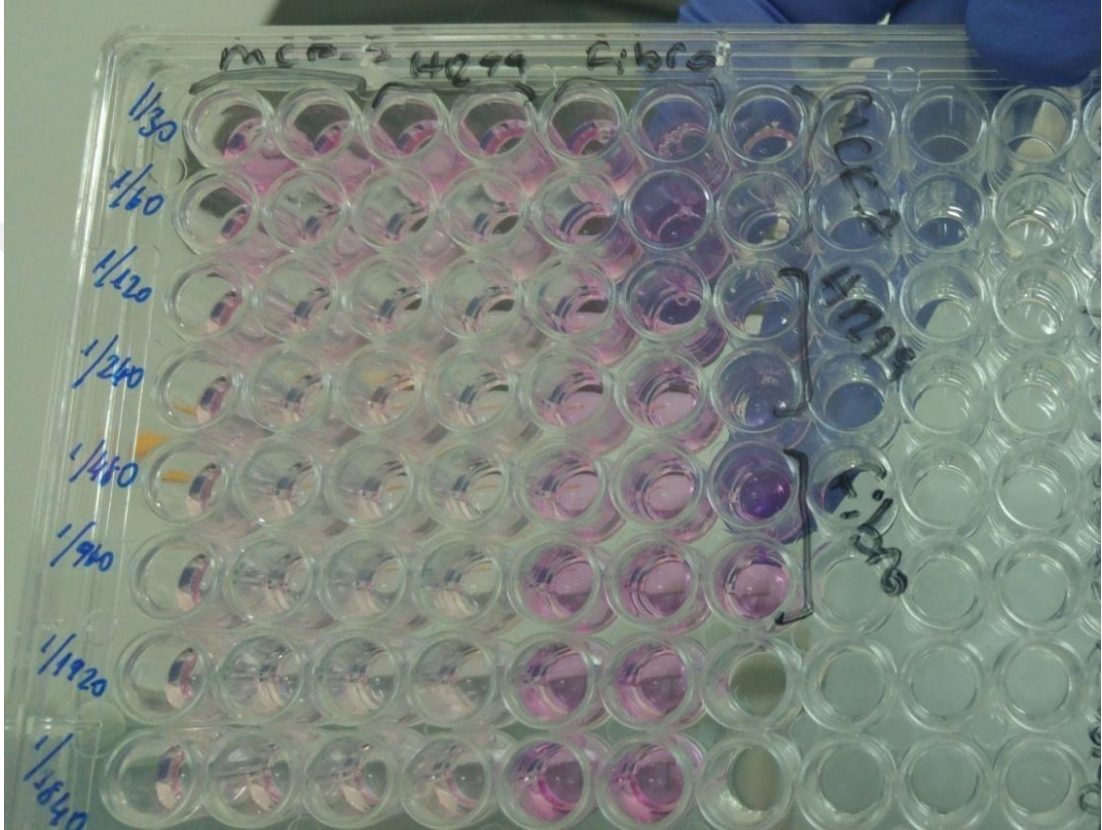
2.3. Zehrin Uygulanışı

2.3.1. WST-1 Sitotoksikite Testi

Kültüre etmiş olduğumuz hücre hatlarımızı hücre sayım cihazın da sayarak mcf-7 için 4,5x10⁵, h1299 için 1,7x10⁵ ve 1929 için 3,4x10⁵ hücre sayılarına ulaştık (Şekil 2.3). WST-1 sitotoksikite testi, doksanaltı kuyucuklu plate kullanarak yapılmıştır. Her bir kuyucuğa 5.000 hücre olacak şekilde kuyucuklara dağıtılmıştır. 2'şer adet kuyucuk kontrol olarak kullanılmış diğer kuyucuklar boş bırakılmıştır. L929fibroblast için %10 Fetalbovine serum, %1 penisilin streptomisin içeren (DMEM), mcf-7 ve h1299 için RPMI(L-glutamine, without sodium bicarbonate) eklenmiştir.

Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından elimizde bulunan 40 µl'lik zehir 1200 µl'ye double distile su ile tamamlanarak dilüye edilmiştir. İlk altı kuyucuğa eşit olarak (100 µl) dilüsyonu yapılmış zehir dağıtılmıştır. Geride kalan kısım 1/2 seklinde dilüye edilerek sonraki altı kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Bu işlem aynı şekilde son kuyucuğa kadar devam edilmiştir. Böylece 1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, 1/1920 µg/µl konsantrasyonlarda zehir dozları test edilmiştir (Şekil 2.8)

Uygulamanın ardından 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki hücrelerin vasatları atıldı yerine 100µl fenol red içermeyen besiyeri eklendi. Her kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon ardından 440nm dalga boyunda mikropate okuyuculu spektrofotometre cihazında absorbans ölçümü yapılmıştır(Şekil 2.1).



Şekil 2.8. Farklı dozlarda zehir uygulanmış hücre hatları

2.3.2. İkili Boyama (Double Staining) İle Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

96 kuyucuklu plate kullanarak yapılmıştır. Onaltışar kuyucuk mcf-7, h1299 ve fibroblast olacak şekilde her bir kuyucuğa 5.000 dağıtılmıştır. İkişer adet kuyucuk kontrol olarak kullanılmış diğer kuyucuklar boş bırakılmıştır. Üzerlerine 1929fibroblast için %10 Fetalbovine serum, %1 penisilin streptomisin içeren (DMEM), mcf-7 ve h1299 için RPMI eklenmiştir. Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li

inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından elimizde bulunan 600 µl'lik zehir. İlk altı kuyucuğa eşit olarak (100 µl) dağıtıldı. Geriye kalan kısım ½ şeklinde dilüye edilerek sonraki altı kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Bu işlem aynı şekilde son kuyucuğa kadar devam edildi. Böylece 1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, 1/1920 µl dilüsyon oranlarında uygulandı. Uygulamanın ardından 24 saatlik inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından hücrelerin vasatları atıldı, her kuyucuğa 70 µl ikili boyama solüsyonu damlatıldı. 15 dk. Karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonun ardından florasan ataçmanlı mikroskopla FITC ve DAPI filtresinde inceleme yapıldı. Tüm görüntüler (20X10)X büyütmede çekildi. Her kuyucuktaki toplam canlı hücre sayısı, apoptoza uğramış hücre sayısı ve nekrotik hücreler manuel olarak sayıldı (Tablo 3.2).

2.3.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA xCELLigence) ile Hücre Proliferasyonunun Takibi

Flasktaki hücrelerin yeterli sayıya ulaştığı mikroskopik incelemeyle belirlendikten sonra içerisindeki besiyeri döküldü. 1 ml tripsin-EDTA eklendi flask 3-4 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler flakon tüpe aktararak 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 ml mem-α medyum eklenerek süspanse edilip hücre sayımı yapıldı. Daha sonra E-plate'in her kuyusuna 100'er µl medyum koyuldu. Etüvde bulunan plate xCELLigence'e yerleştirildikten sonra plate ile cihazın aynı sıcaklığa ulaşması için 5 dakika beklendi. 1 dakika cihazda background okuması yapıldıktan sonra, e-plate çıkarıldı ve Tüm kuyucuklara 100'er µl 3×10^3 hücre olacak şekilde mcf-7 ve h1299 hücre hatları konuldu. Tekrar e-plate etüve yerleştirilip 10 dakika beklendi. 10 dakika sonunda okuma başlatıldı. 24 saat hücrelerin proliferasyonu için beklenildi ve bu saatte 1/30, 1/60, 1/120, 1/240 dozda zehir uygulandı ve 120 saat boyunca proliferasyon takip edildi.

3. BULGULAR

3.1. Laboratuarda Akreplerin Gözlem Sonuçları

Araziden canlı olarak toplayarak laboratuara getirdiğimiz akrepler, özel olarak hazırladığımız bireysel yaşam ortamlarında, bir kısmı çok hareketli ve canlı iken bir kısmının laboratuardaki özel ortama adaptasyon sağlayamadığı, canlılığı ve hareket kabiliyetinde azalma olduğu gözlenmiştir. Elektrosimülatör kullanarak elektrik ile uyardığımız bu akreplerde tepkinin çok az olduğu zehir vermedikleri tespit edilmiş, beslenme yeteneklerinin azaldığı gözlenmiştir.

Canlı ve hareket kabiliyeti yüksek olan akreplerimiz dışarıdan çok fazla uyarıya gerek kalmadan tehlike anında zehirlerini daha kolay boşalttıkları tespit edilmiştir. miktarsal olarak zehirde azalma olduğu, ilk boşalttıkları zehir miktarı ikinci, üçüncü ve dördüncü uyarıya doğru gidildikçe hacimsel olarak azalmakta olduğu, ilk verilen zehrin şeffaf olduğu ikinci, üçüncü ve dördüncü uyarıya doğru zehrin süt rengine döndüğü, akışkan sıvı halden daha yoğun hale dönüştüğü gözlenmiştir. Aynı gün içinde bir akrepten maksimum 4 sefer zehir alındığı tespit edilmiştir. Zehir vermede akrepin vücudunun büyüklüğünün önemi olmadığı, bulunduğu ortama adaptasyonu ve avlanma kabiliyeti ile alakalı olduğu düşünülmektedir.

3.2. WST-1 Test Sonuçları

Çalıştığımız akreplerimiz küçük canlılar olduğu için verdikleri zehir miktarları da çok az olmaktadır. Bu nedenle uygulama esnasında zehrin dilüsyon oranları yüksek tutulmuştur. En yoğun zehir miktarının olduğu 1/30 olarak uyguladığımız dilüsyonda mcf-7 ve fibroblast hücre hatları üzerinde yaklaşık olarak % 50 oranında, canlılığı etkilediği, h1299 üzerinde ise etkisinin % 27'ler civarında olduğu görülmüştür. Dilüsyon katsayısı arttıkça zehir etkisinin de oransal olarak azaldığı belirli dilüsyonlardan sonra hücre canlılığın baştaki sayının üzerine çıktığı tespit edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. WST 1 Testi Absorbans Değerler

mcf-7(doz)	1.çalışma	2.çalışma	Canlılık(%)
1/30	0,369	0,424	52,69
1/60	0,572	0,576	76,27
1/120	0,603	0,648	83,12
1/240	0,728	0,786	100,59
1/480	0,870	0,918	118,80
1/960	1,016	0,961	131,36
1/1920	0,976	0,966	129,03
1/3840	0,895	0,944	122,12
Kontrol	0,7525		
h1299 Doz	1.çalışma	2.çalışma	Canlılık(%)
1/30	1,270	1,404	72,96
1/60	2,211	2,167	119,45
1/120	2,242	2,425	127,33
1/240	2,467	2,420	133,34
1/480	2,404	2,427	131,81
1/960	2,334	2,415	129,54
1/1920	2,272	2,272	123,98
1/3840	2,252	2,298	124,14
Kontrol	1.8325		
Fibroblast Doz	1.çalışma	2.çalışma	Canlılık(%)
1/30	0,501	0,402	49,12
1/60	0,776	0,719	81,33
1/120	0,774	0,803	85,79
1/240	0,866	0,795	90,36
1/480	0,877	0,893	96,30
1/960	0,905	0,893	97,82
1/1920	0,891	0,897	97,27
1/3840	0,930	0,918	100,54
Kontrol	0,919		

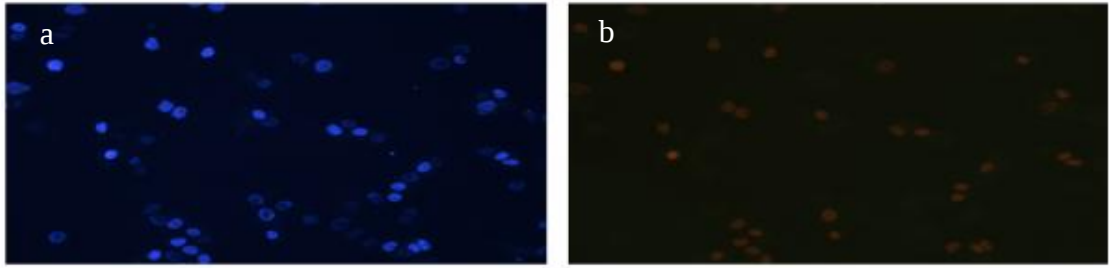
3.3. İkili Boyama (Double Staing) Sonuçları

Yapılan ikili boyama işlemlerinden sonra hücre canlılık oranlarının wst-1 testi ile uyumlu olduğu mcf-7 hücre hattında 1/30 dilüsyonda toplam ölü hücre sayısının %13,88'in apoptoz ile % 12,5'inin ise nekrotik ölüm gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 3.1). Dilüsyon oranı arttıkça apoptoz ve nekroz oranları kademeli olarak azalmaktadır. 1/240dilüsyondan sonra ise nekrotik ölümlerdeki azalış daha keskin

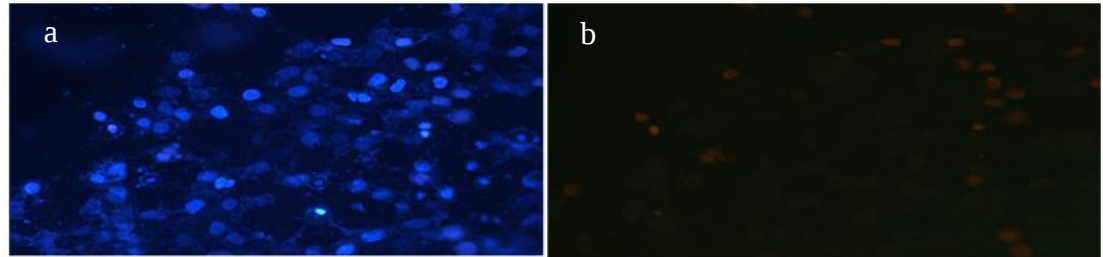
olmaktadır. 1/30 ve 1/60 dilüsyonda apoptoz ve nekroz oranları birbirine yakın iken diğer dozlarda ise apoptoz oranının nekroz oranından da fazla olduğu görülmüştür.

h1299 hücre hattında 1/30 dilüsyonda, apoptoz oranı % 10,52 olarak bulunmuştur. Nekroz oranı ise yaklaşık yarısı kadar %5,26 olarak bulunmuştur(Şekil 3.2). Apoptoz/nekroz oranlarında diğer dilüsyonlarda 1.41-4.0 arasında değişmektedir.

Fibroblast hücre hattı üzerinde 1/30 dilüsyonda apoptoz oranının %30 lar da bulunmuştur. Nekroz oranı apoptoz oranının yarısı kadar olduğu tespit edilmiştir. Bu oran dilusyon oranı arttıkça çok büyük değişiklikler göstermemiştir(Tablo 3.2).



Şekil 3.1. mcf-7 hücreleri 1/30 dilüsyon oranındaki apoptoz(a) ve nekroz(b) inverted mikroskop görüntüsü(20x10x)



Şekil 3.2.h1299-7 hücreleri 1-30 doz apoptoz(a) ve nekroz(b) inverted mikroskop görüntüsü(20x10x)

Tablo 3.2. Apoptoz-Nekroz oranları

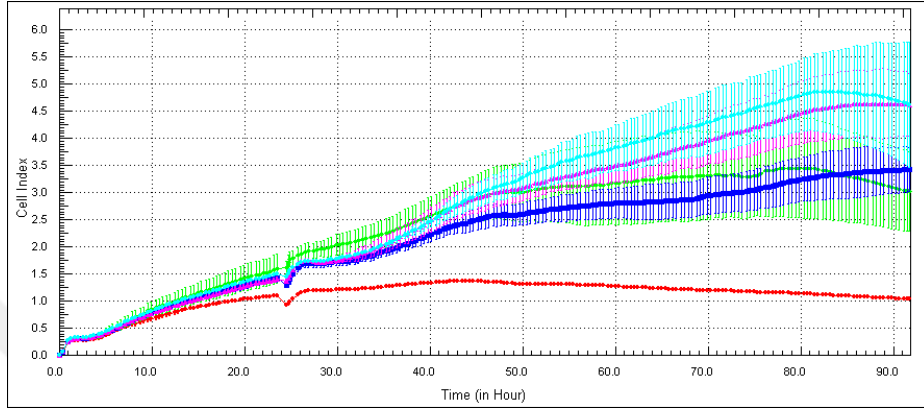
mcf-7	Toplam Hücre Sayısı	Apoptoz Hücre Sayısı	Nekroz Hücre Sayısı	Apoptoz %	Nekroz %
1/30	144	20	18	13,88	12,5
1/60	154	14	16	9,09	10,38
1/120	160	18	12	8,88	7,5
1/240	212	18	10	8,49	4,71
1/480	176	14	8	7,95	4,54
1/960	188	12	8	6,38	4,25
1/1920	208	14	6	6,73	2,32
1/3840	188	10	5	5,31	2,12
h1299	Toplam Hücre Sayısı	Apoptoz Hücre Sayısı	Nekroz Hücre Sayısı	Apoptoz %	Nekroz %
1/30	152	16	8	10,52	5,26
1/60	170	14	10	8,23	5,83
1/120	254	16	4	6,29	1,57
1/240	314	20	6	6,36	1,91
1/480	304	12	5	3,94	1,49
1/960	240	8	3	3,33	1,25
1/1920	402	14	5	3,48	1,24
1/3840	258	6	3	2,32	1,16
fibroblast	Toplam Hücre sayısı	Apoptoz Hücre Sayısı	Nekroz Hücre Sayısı	Apoptoz %	Nekroz %
1/30	72	22	12	30,55	16,6
1/60	88	22	13	25	14,77
1/120	56	12	8	21,42	14,28
1/240	74	14	8	18,91	10,81
1/480	82	12	8	14,63	9,75
1/960	185	22	16	11,89	8,64
1/1920	160	18	12	11,25	7,5
1/3840	182	18	8	9,89	4,39

3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA Xcelligance) ile Hücre Proliferasyonunun Takip Sonuçları

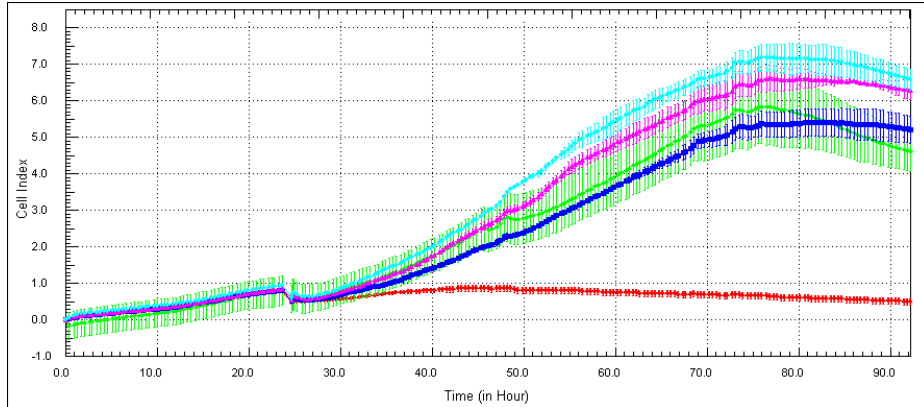
120 saatlik proliferasyon takibi yaptığımız mcf-7 ve h1299 hücrelerinin, ilk 24 saat içerisinde oransal olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Zehirin uygulandığı 24.saatten sonra, proliferasyon durmuş ve hatta canlı hücre miktarında azalma olduğu gözlenmiştir. Bu saatten sonra zehrin etkisinin azalmasıyla hücreler tekrar proliferasyon sürecine girmiştir. Zehir miktarının en çok olduğu 1/30 dilüsyonda proliferasyon çok minimal düzeydedir. Zehrin etkisinin uzun sürdüğü görülmüştür(Şekil.3.3,4).

1/30 dilüsyonda mcf-7 nin proliferasyonu h1299 oranla daha hızlıdır. 24.saatten sonra benzer sonuçlar vermişlerdir. (Şekil 3.5)

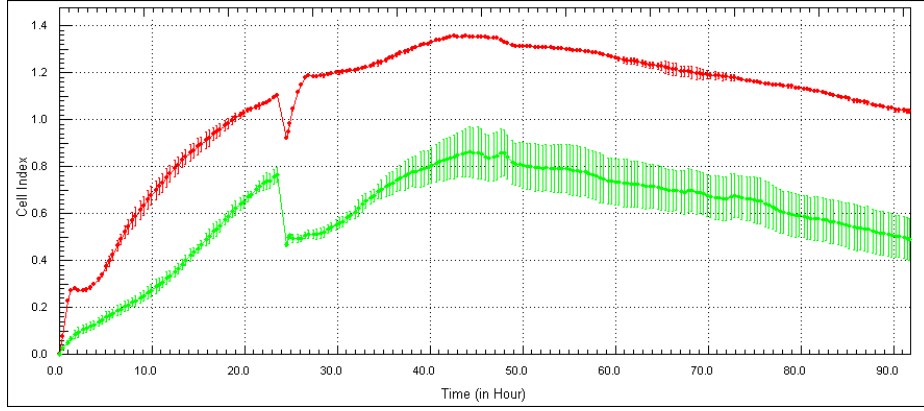
1/60, 1/120, 1/240 dilüsyonlarda h1299 24.saatten sonra mcf-7 ye göre proliferasyon daha hızlıdır (Şekil 3,6-8).



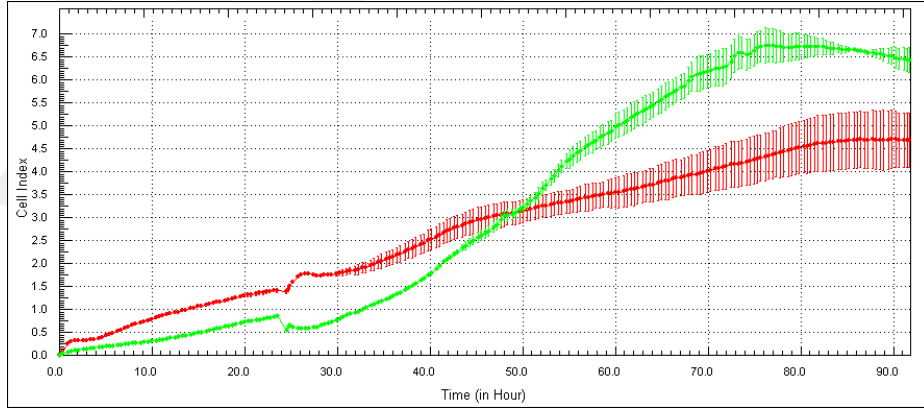
Şekil 3.3. mcf-7 Hücre Hattı 24 Saatlik Hücre Proliferasyonu (kırmızı 1/30, mavi 1/60, pembe 1/120, türkuaz 1/240, yeşil kontrol)



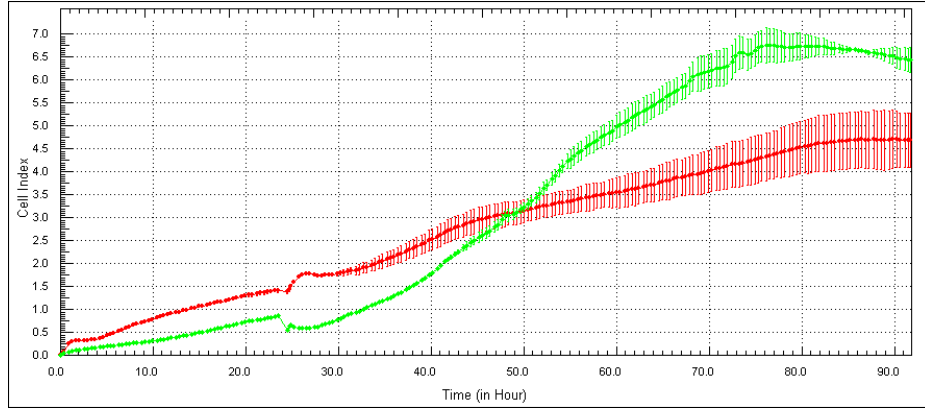
Şekil 3.4. h1299 hücre hattı 24 saatlik hücre prolifasyon (kırmızı 1/30, mavi 1/60, pembe 1/120, türkuaz 1/240, yeşil kontrol)



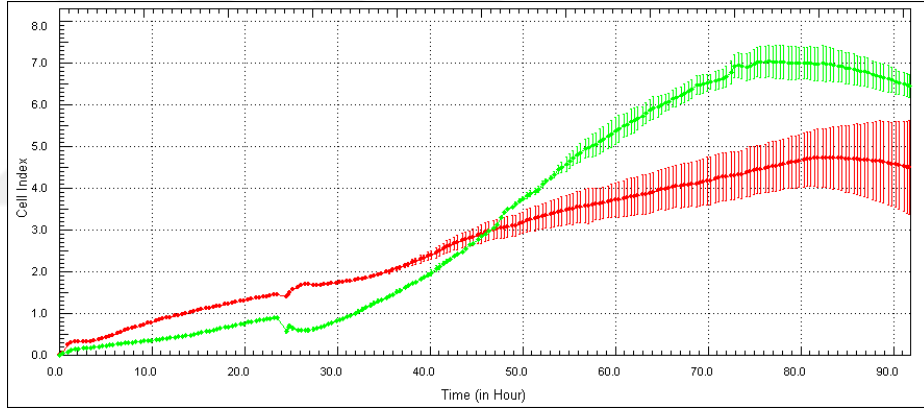
Şekil 3.5. mcf-7 ve h1299 Hücrelerinin Karşılaştırılması 1-30 Doz (kırmızı Mcf-7, yeşil H1299)



Şekil 3.6. mcf-7 ve h1299 Hücrelerinin Karşılaştırılması 1-60 Doz (kırmızı Mcf-7, yeşil H1299)



Şekil 3.7. mcf-7 ve h1299 Hücrelerinin Karşılaştırılması 1-120 Doz (kırmızı mcf-7, yeşil h1299)



Şekil 3.8. mcf-7 ve h1299 Hücrelerinin Karşılaştırılması 1-240 doz (kırmızı mcf-7, yeşil h1299)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde en önemli sağlık problemlerinin başında kanser gelmektedir. Kanser tedavisinde radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler kullanılmakta olup, tedavi potansiyeli olan bu yöntemler tedavi özeliğinin yanında sağlıklı hücrelere de olumsuz etkilerinden dolayı tedavi potansiyeli çok yüksek olmamaktadır. Yüksek yan etkilerinden dolayı son zamanlarda biotoksinler kanser tedavisinde yeni umut kapısı olmaktadır. Akrep, yılan ve örümcek venomları kanser tedavisinde dolaylı ve direkt olarak kullanılmaya başlanmıştır. Venom bileşimindeki peptidler sitolitik, sitotoksik aktiviteleri ya da vücudun bağışıklık sistemini güçlendirmek suretiyle etki göstermektedir. Yakın gelecekte biotoksinlerin antineoplastiklerin yerini alacağı düşünülmektedir (Lipps,1999).

Akrep zehirlerinin içerisinde 100 den farklı peptid bulunmaktadır. Birçok akrep türünün zehir içeriği ve protein yapısı hakkında çok fazla net bilgi bulunmamaktadır. Yapılan bazı çalışmalar ve izole edilen peptitlerin kanser hücreleri üzerine etkili olduğu gözlenmiştir. Avcı akrep *Leiurus quinquestriatus*'dan izole edilen klorotoksin 36 aminoasitten oluşan peptit olup Glioma teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır (Vesieh vd.,2007;Kesevan vd.,2010).

Akrep zehirleri içerdikleri iyon kanalları, voltaj bağımlı ve hERG geni ile ilişkili potasyum kanalları, tümör hücrelerinde DNA sentez ve hücre proliferasyonunu yavaşlattığı belirlenmiştir (Stühmer,2002).

Akrepler zehirli hayvanlar olup bazı türlerin insan üzerinde ölümcül etkileri olmaktadır. İnsan için ölümcül, tehlikeli ve az tehlikeli olarak sınıflandırılabilir. Akrebin insan üzerindeki toksik etkisi arttıkça aynı akrepten izole edilecek peptitlerin de kanser hücreleri üzerinde etkisi aynı oran da mı olmaktadır? Ya da zehir içeriğinde bulunan bazı peptitlerin spesifik olarak çeşitli kanser hücrelerine karşı olan afinitisinden mı kaynaklanmaktadır.

İnsanlar için ölümcül etkiye sahip olan akrepler den izole edilen peptitlerin insan üzerinde ölümcül etkilere sahip olmayan venom arasında bir oran var mıdır? Kanser üzerine etki sadece spesifik tek bir peptid mi etkili oluyor, yoksa çeşitli

kombinasyonlar veya bileşik şekilde venomların etkilerinin oranları da aynı oluyor mu?

Kanser hüclerinin, kanserin bulunduğu organ, yapı ve hücresele aktivitelere farklı olmaktadır. Bu nedenle farklı kanser tiplerinde farklı biyotoksinlerin olabileceği düşünölmektedir. Bu amaçla farklı akrep türlerinden elde edilen akrep zehirleri farklı kanser türlerinde farklı etkilere sahip olabileceği düşünölmektedir. Akreplerin zehir aktivitesi detaylı bir şekilde araştırılmalı farklı akrep türlerinden elde edilen zehirlerin farklı kanser hücre hatları üzerinde çalışmalarla desteklenmektedir.

Akrepler çok küçük canlılar olduklarından elde edilen venom miktarı da çok az olmaktadır. Uzun detaylı ve dikkatli bir çalışma sonunda elde edilen venomları saklamak ve deneysel amaçlı kullanmakta sorunlar olmaktadır. Çok küçük miktardaki zehirden elde ettiğimiz sonuçların geliştirilmeye başka kanser türlerin de başka türlere ait venomlarında etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

Çalışkan ve arkadaşları 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada *Androctonus crassicauda* türünden HPLC analizi ile Ac8,Ac9,Ac10 peptitlerini saflaştırmış bu peptitlerin BC3H1 (fare beyin tümör hücresi) hücreleri için sitotoksik etkili olduğunu belirtmiştir. Bu peptitler insan antitümör etkinliğine sahip olacağını belirtmiştir.

Leiurus quinquestriatus (avcı akrep) türünden izole edilen 36 aminoasitten oluşan peptit izole edilmiştir. Klor kanallarını bloke eden bu peptide klorotoksin (ClTx) denir. İnsan embriyonik böbrek hücreleri ve fare miyoblast hücreleri üzerinde apoptotik ve nekrotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Omran,2003). Klorotoksin spesifik olarak glioma hücrelerine duyarlıdır. İnsan glioma hücrelerinde çoğalmayı engellediği gözlenmiş ve beyin kanseri için tedavi edici özelliği bulunmuştur (Furman,2007).

Heterometrus bengalensis'den izole edilen bengaline isimli venom insan lösemi hücrelerinde apoptozisi uyarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği belirlenmiştir (Gupta vd., 2010).

Buthus Martensi Karcsh türünden izole edilen BmK AGAP sodyum kanal nörotoksinidir. Bu peptit malignant glioma hücrelerinde iyon kanallarını etkileme yolu ile apoptozisi uyardığını göstermiştir (Wang ve Ji,2005).

Buthus Martensi Karcsh türünden izole edilen diğer peptit 50-60 aminoasitten oluşan PESV insan prostat kanseri antiproliferatif ve sitotoksik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Zhang vd.,2009).

Çalışmamızda kullandığımız akrep zehrinin mcf-7 kanser hücre hattı proliferasyonunu azalttığı görülmüştür. Zehir miktarı az olduğu için belirlenenen zehir dilüsyon oranları yüksek tutulmuştur. Zehrin protein içeriği belirlenerek ve zehir konsantrasyonu artırılarak daha detaylı çalışmalar yapılırsa, bu akrep zehrinin insan meme kanserinin teşhis ve tedavisinde kullanacak bioterapi ajanı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- A.Kaya Kodoęan,“Meme Kanserli Hastalarda Glutatyon S-Trensferaz İzozimlerin Çoklu İlaç Direnç Mekanizmasındaki Proteinlerle Olan İlişkilerin İncelenmesi” Kırıkkale Üniversitesi,2016.
- Alexander JO., Artropods anh human skin. Springer-verlag. New York.1984.
- Altıntaş, K., Tıbbi Parazitoloji, MN Medikal Nobel, 2002.
- Ammar, A., Qosay, A., Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. Peptides, 51, 35-45, 2014.
- Anonim, “Scorpion anatomy.” [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki>. [Erişim Tarihi: 01-Jan-2015].
- Baskar, R., Lee, KA., Yeo, R. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. International Journal of Medial Sciences, 9, 193-9.2012.
- Catterall, WA.Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. Physiol Rev, 72(4), 15-48.1992
- Cestèle, S., Catterall, WA.Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie, 82(9), 883-92.2000
- Chen, Y. Cao, L. Zhong, M. Zhang, Y., Han,C. Anti-HIV-1 Activity of a new Scorpion Venom Peptide Derivative Kn2-7. PLoS ONE, 7, 34947. 2012.
- aęlar M. Omurgasız Hayvanlar. İ.Ü. Yayınlarından Sayı:712 Fen Fakóltesi yayınları 20, 103–108.1957.
- David, C., Scorpion stings. eMedicine Journal, December 5 Volume 2, Number 12. 2001.

- Demirsoy A, Durmuş Y, Akbulut A. Türkiye scorpiones (akrep) faunasının sistematik ve biyolojik yönden incelenmesi. Proje No:1998 K1001 40. Çevre Bakanlığı Çevre Koruma Genel Müdürlüğü Hayvanları Koruma Dairesi Başkanlığı. Ankara.2001;118.
- Diniz, CR. Chemical and pharmacological aspects of Tityinae venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Arthropod venoms, 48 (14). Springer, Berlin, 379-394.1978
- Diochot S, Loret E, Bruhn T, Beress L, Lazdunski M. APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human *ether-a-go-go*-related gene potassium channels. Mol Pharmacol. ; 64:59-69.2003.
- Dunlop JA, Webster M, Fossil evidence, terrestrialization and Archnid phylogeny. The journal of Arachnology.27 : 8693; 1999.
- Farley RD, Ventra lmesosomal changes in embertos from three scorpion families: Iuridae, . Buthidae and Vaejovidae. Thejournal of Arachnology.27 : 12312 8;1999.
- Feng, L. Gao, R., Gopalakrishnakone, P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthusmartensi*. Comp BiochemPhysiol C ToxicolPharmacol, 148, 250-257.2008.
- Garry R, Mullen and Stokweell SA. Medical and veterinary Entomology. Scorpions (scorpione) in: Mullen G, Durden G. (eds.),20:411442.2002
- Gupta SD, Gomes A, Debnath A, Saha A, Gomes A. 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(2):293-303. 2010.
- Gurevitz, M.,Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M., Stankiewicz., M., Stühmer, W., Dong, K., ve Gordon, D.Theinsecticidalpotential of scorpion β -toxins. *Toxicon* 49, 473-489.2007.

- Hayden, MS., West, AP., Ghosh, S., NF-kappaB and the immune response. . Oncogene. 25, 6758-6780, 2006.
- Holaday, SK., Martin, BM., Fletcher, PL., Krishna, NR. NMR solution structure of butantoxin. ArchBiochemBiophys, 1(379), 18-27. 2000
- Hubert, H., Evi, W., Thierry G. The relative abundance of *Brotheas amazonicus* (Chattidae, scorpiones) in different habitat types of acentar Amazon rainforest. The journal of Arachnology. 24:3438. 1996.
- Jackman, L. Scorpions, texas Agricultural Extension Service, the Texas A&M university system 2002.
- Karatas, A.. *Mesobuthus caucasicus* (Nordmann, 1840) (Scorpiones: Buthidae) in Turkey. Euscorpius 25, 1-7. 2015
- Kesavan, K., Ratliff, J., Johnson, EW., Dahlberg, W., Asara, JM., Misra, P. Annexin A2 is a molecular target for TM601, a peptide with tumor-targeting and anti-angiogenic effects. The Journal of biological chemistry. 285, 4366-74, 2010.
- Legros, D., Ochola, D., Lwanga, N., Guma, G. Antibiotic Sensitivity of Endemic *Shigella* in Mbarara, Uganda. East African Medical Journal. vol. 75, (3). 160-1, 1998.
- Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. Nature reviews. 2(10):790-802. 2003.
- Lipps, BV. Noel snake venom protein scytolytic to cancer cells in vitro and in vivo systems. Journal of Venomous Animals and Toxins. 5:172-183. 1999.
- Milnes JT, Dempsey CE, Ridley JM, et al. Preferential closed channel blockade of HERG potassium currents by chemically synthesised BeKm-1 scorpion toxin. FEBS Letters. 547:20-26. 2003.
- Mortari, M.R., Cunha, A.O.S., Ferreira, L.B. ve Ferreira dos Santos, W. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. Pharmacology & Therapeutics 114, 171-183. 2007.

- N.Özkan, *Mesobuthus gibbous* türü akrep zehirinin farelerde minimal lethal dozunun (MLD50) saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 1992.
- Norberg E. Orrenius, S., Zhivotovsky, B. Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Comm*, 396, 95-100.2010.
- Özcel MA, Daldal N. Parazitolojide arthropod hastalıkları ve vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 13, İzmir, 461-4.1997
- Özkan, Ö., Yaman, N., Akrep, Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Bülteni. Kasım, 1518, 2004.
- Özkan, Ö., Karaer Z., Akreplerin Vücut Yapısı. Türkiye Parazitoloji dergisi. 28 (1) : 5458 .2004.
- Özkan, Ö., Carhan, A., “The neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom.” *Toxicon*, 52(2), pp. 375–379, 2008.
- Pardo-Lopez L, Zhang M, Liu J, et al.. Mapping the binding site of human ether-a-gogo-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel’s outer vestibule. *J. Biol. Chem.* 277: 16403-16411.2002.
- Park, J. Cho, S.Y., & Choi, S.J.. Purification and characterization of hepatic lipase from *Todarodes pacificus*. *BMB reports*, 254-258.2007.
- Pessini, AC. Takao, TT. Cavaleiro, EC. Vichnewski, W. Sampaio, SV. Giglio, JR., & Arantes, EC. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, 39, 1495.2001.
- Polis GA, Farley RD. Behavior and ecology of mating in the cannibalistic scorpion, *Parurocton usmesaensis* Stahnke (Scorpionida: Vaejovidae). *The Journal of Arachnology*. 7: 3346.1979.

- Possani, LD., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *European Journal of Biochemistry*, 264(2), 287-300. 1999
- Possani, LD., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., & Becerril, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*, 82(9), 861-8. 2000.
- Sariego, J. Breast cancer in the young patient. *The American surgeon*, 76, 1397-1401. 2010.
- Shieh, CC., Coghlan, M., Sullivan, JP., Gopalakrishnan, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*, 52(4), 557-94. 2000.
- Skarnulis L, Nazario B. Wonder drugs using pharmazooticals. WebMD Inc., 2003 <http://www.webmd.com/content/article/78/95687.htm>
- Stühmer W. The EAG potassium channel as a target for marine toxins. 2002: 14. http://www.venomstodrugs.com/Venoms_Abst_ract_book.pdf Cilt: 34, Sayı: 3, (226-232)
- Sun, C. Stephen, Z. Veisheh, O. Harisen, S. Lee, D. Ellenbogen, RG. Olson, J., & Zhang, M. Tumor targeted drug delivery and MRI contrast enhancement by chlorotoxin conjugated iron oxide nanoparticle. *Nanomed*, 3, 495. 2008.
- Szakács G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Genthe C.B., Gottesman M.M., Targeting multidrug resistance in Cancer' *Nat Rev Drug Discov*. 5(3):219-34. 2006
- T.C Bayar, *Mesobuthus gibbosus* (BUTHIDAE) Akrep Venomunun Saflaştırılması Ve Bazı Fizyolojik Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2004.
- Tenenholz, TC., Klenk, KC., Matteson, DR., Blaustein, MP., Weber, DJ., Structural determinants of scorpion toxin affinity: the charybdotoxin (alpha-KTX) family of K(+) -channel blocking peptides. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 140, 135-85. 2000.

- The scorpion Files.Euopen scorpion. <http://www.ub.ntnu.no/scorpion-files>. 18.11.2002.
- Tossi, A. Sandri, L., &Giangaspero, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55, 4-30.2000
- Veiseh, M.,Gabikian, P.,Bahrami, SB.Tumor paint: a choleroxin: L Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Research*, 67, 6882-8.2007
- Willems, J. Noppe, W. Moerman, L. Van der, WJ.,&Verdonck, F. Cationic peptides from scorpion venom can stimulate and inhibit polymorphonuclear granulocytes. *Toxicon*, 40, 1679.2002.
- Wright, R., Scorpions. Division of Agricultural Sciencesand Natural resources. Oklahoma stateuniversity. <http://www.osuextra.com> erişim tarihi;2006.
- Xiong,Y., Lan, Z., Wang, M., Liu, B., Liu, X., Fei, H., Xu, I., Xia, Q., Wang, C., Wang, D. ve Chi, C. (1999). Molecular characterization of new excitatory insect neurotoxin with an analgesic effect on mice from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 37, 1165-1180.
- Yağmur, E.A, “Güneydoğu Anadolu Akrep (Scorpiones) Faunasi: Sistematiği Ve Zoocoğrafyası,” Ege Üniversitesi, 2011.
- Yağmur,E.A.,Tropea,G. A new species of *Euscorpius* Thorell, 1876 (Scorpiones, Euscorpiidae) from Marmara Region of Turkey.[Zookeys](#). ; (348): 29–45.2013.
- Yaman N.Akrepler ve Tıbbi Önemleri A.Ü Sağlık Bilimleri Enst. Entomoloji Protozooloji Bilim Dalı Seminer.1996.
- Yu, FH.,&Catterall, WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4(3), 207.2003.

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. Journal of Clinical Medicine Research. 1(1):24-31.2009.

Zhijian, C., Feng, L., Yingliang, W., Xin, M., Wenxin, L., 2006, Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification, Toxicon, 47, 348–355.

