

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ANDROCTONUS CRASSICAUDA AKREP
ZEHRİNİN ANTİKANSER ÖZELLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Murat TİKEN

**DANIŞMAN
Doç. Dr. İsmail KOYUNCU**

**Bu tez Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 19340 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ŞANLIURFA
2022**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ANDROCTONUS CRASSICAUDA AKREP
ZEHRİNİN ANTİKANSER ÖZELLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Murat TİKEN

**DANIŞMAN
Doç. Dr. İsmail KOYUNCU**

**Bu tez Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 19340 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ŞANLIURFA
2022**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günden itibaren bilimsel çalışmalarına yardım ederek, tez çalışmamı yapmamda yardımını esirgemedi yanımda olan ve zamanını harcamaktan kaçınmayan, bana her konuda destek veren danışmanım Doç. Dr. İsmail KOYUNCU 'ya,

Kardeşten öte olan, her türlü bilgi ve becerisini bana anlatan, çalışmalarımı yapmamda yardımcı olan Uzm. Moleküler Biyolog Özgür Yüksekdağ'a,

Laboratuvar ekibimiz; Öğr. Gör. Kadir Eği, Öğr. Gör. Mehmet Ramat ve Öğr. Gör. Dr. Ebru Temiz'e ve diğer tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana destek olan meslektaşım Dyt. Mahmut Akın Tekdemir'e,

Her anımda arkamda büyük desteklerini hissettiğim, iyi bir eğitim almam için her türlü fedakarlığı gösteren, beni asla yalnız bırakmayan aileme, eşime, oğlum İbrahim Talha'ya ve eğitim hayatım boyunca çok yorulan kendime,

Sonsuz teşekkürler.

Murat TİKEN

2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Kanser.....	6
2.2. Kanser İnsidans ve Epidemiyolojisi	7
2.3. Meme Kanseri	10
2.3.1. Tanım.....	10
2.3.2. Meme Kanseri Epidemiyoloji ve İnsidansı.....	11
2.3.3. Meme Kanserlerinde Tedavi.....	12
2.3.4. Meme Kanserlerinde Tümör derecesi.....	13
2.4. Kanser Tedavilerinde Kemoterapi ve Kullanılan Ajanlar	13
2.5. Bitkiler ve Hayvanlardan Üretilen Doğal Ürünlere Bakış	16
2.5.1. Hayvanlardan Elde Edilen Zehirlere Genel Bir Bakış.....	19
2.6. Akrepler ve Akreplerden Alınan Zehirlere Genel Bir Bakış.....	22
2.6.1. Toksin, Zehir.....	22
2.6.2. Akrep Morfolojisi	24
2.7. Akrep Zehirleri	26
2.8. Akrep Zehir Toksinlerinin Sınıflandırılması	27
2.8.1. Akrep Zehirlerinden T Kaynaklı Sodyum Kanalı Toksinleri (NaScTxS).....	28
2.8.2. Akrep Zehirlerinden Potasyum Kanalı Toksinleri (KTxS)	29
2.8.3. Kalsiyum ve Klor Kanal Toksinleri.....	30
2.8.4. Disülfid Köprüleri Olmayan Akrep Zehri Peptitleri.....	31
2.8.5. Yüksek Moleküler Ağırlıklı Enzimler	31
2.9. Türkiye’de Yaşayan Akrepler	35
2.10. Türkiye’de Akrep Zehri Araştırmalarının Mevcut Durumu	35
2.11. Akrep Zehirlerinde Tanımlanmış Peptit Toksinleri ve Farmakolojik Etkileri İlaç Adayı Olabilirler mi?	36
2.12. Akrep Zehirlerinin ve Toksinlerin Antikanser Potansiyeli	39
2.13. Zehir Çalışmalarında Metabolomiks Uygulamaları	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Akrep Zehrinin Elde Edilmesine Yönelik Çalışmalar.....	49
3.1.1. Akrep Toplanması ve Bakımı	49

3.1.2. Akrep Zehrinin Eldesi ve Hazırlanması.....	50
3.2. Akrep Zehrinin Antikanser Özelliğinin Tespitine Yönelik Çalışmalar.....	51
3.2.1. Akrep Zehrinin Kanser ve Normal Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkinliğinin İncelenmesi.....	52
3.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	53
3.4. Akrep Zehrinin Yüksek Sitotoksik Etki Gösterdiği Kanser Türü Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkinliğin İncelenmesi	54
3.5. Akrep Zehrinin Apoptotik Etkinliğinin Morfolojik Olarak Flouresan Mikroskop ile İncelenmesi.....	55
3.6. Kanser Hücresinde Apoptozise Yol Açan Etkenlerin İncelenmesi	55
3.6.1. Hücre İçi Serbest Radikal Değişimi Analizi (ROS)	55
3.6.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) Ölçümü.....	56
3.7. Akrep Zehrinin Metabolit Profilinin İncelenmesi	57
4. BULGULAR	58
4.1. Akrep Zehrinin Kanser ve Normal Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkinliğinin İncelenmesi.....	59
4.2. Akrep Zehrinin Yüksek Sitotoksik Etki Gösterdiği Kanser Türü Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkinliğin İncelenmesi	60
4.3. Akrep Zehrinin Apoptotik Etkinliğinin Morfolojik Olarak Flouresan Mikroskop ile İncelenmesi.....	62
4.4. Kanser Hücresinde Apoptozise Yol Açan Etkenlerin İncelenmesi	65
4.4.1. Hücre İçi Serbest Radikal Değişimi Analizi (ROS)	65
4.4.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) ölçümü.....	67
4.5. Akrep Zehrinin Metabolit Profilinin İncelenmesi	69
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	77
7. KAYNAKLAR.....	78
EKLER.....	105

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Normal hücrelerden metastaza doğru tümör gelişim basamakları	8
Şekil 2.2. Cinsiyete ve türe göre yeni kanser vakaları	9
Şekil 2.3. 2020'de tahmini yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranları (Dünya), tüm kanserler, her iki cinsiyet, her yaştan	10
Şekil 2.4. 2020'de Dünya'da yaşa göre standardize edilmiş tüm kanserlerde insidans oranları ve ölüm oranları	10
Şekil 2.5. Meme kanseri alt tiplerinin histolojik sınıflandırması	12
Şekil 2.6. 2020 yılında yaşa göre standardize edilmiş meme kanseri insidansı	13
Şekil 2.7. UV ile aydınlatılmış <i>P. Kraepelini</i> akrebi ve 4-metil-7-hidroksi-kumarin molekülü (küçük resim)	24
Şekil 2.8. Akrep telson ve keliserin elektron mikroskop altında morfolojik görüntüsü	25
Şekil 2.9. <i>Androctonus crassicauda</i> akrebinin genel morfolojisi	26
Şekil 3.1. Laboratuvar ortamına adapte olup ortamında yaşayan <i>Androctonus crassicauda</i> akrebi	50
Şekil 3.2. Elektriksel uyarım yöntemi ile zehir sağımı	51
Şekil 3.3. Ham zehrin santifürijlenmesi ve liyofilizatörde kurutulması	52
Şekil 4.1. Liyofilizatör cihazında toz haline getirilen zehrin SDS-PAGE yöntemi ile görüntüsü	59
Şekil 4.2. Akrep zehrinin MDA-MB-231 hücre apoptozisi üzerindeki etkisinin Annexin- V ile incelenmesi	62
Şekil 4.3. Akrep zehrinin MDA-MB-231 hücre apoptozisi üzerindeki etkisinin Annexin- V ile incelenmesi (canlı, apoptoz ve nekroz olan hücrelerin dağılımı)	63
Şekil 4.4. Akrep zehri uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüsü	64
Şekil 4.5. Akrep zehri uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin flouresan görüntüsü	65
Şekil 4.6. Akrep zehrinin MDA-MB-231 hücreleri hücre içi ROS üzerindeki etkileri	67
Şekil 4.7. Akrep zehrinin MDA-MB-231 hücreleri hücre içi ROS üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi	68
Şekil 4.8. MDA-MB-231 hücrelerinin tüm gruplardaki mitokondri membran potansiyeli ölçümünün grafiksel sonuçları	69
Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücrelerinin tüm gruplardaki mitokondri membran potansiyeli ölçümü sonuçları	70
Şekil 4.10. Akrep zehrinin serbest aminoasit profilinin LC-MS/MS ile incelenmesi ile elde edilen sonuçlar	72
Şekil 4.11. Akrep zehrinin serbest aminoasit profilinin LC-MS/MS ile incelenmesi sonucu elde edilen sonuçların grafiksel gösterimi	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Pennington, Czerwinski ve ark. (2017) tarafından tartışılan zehir türevi ilaçlar.....	40
Tablo 4.1. Akrep zehrinin normal ve kanserli hücreler üzerindeki IC ₅₀ değerleri	60
Tablo 4.2. Akrep zehrinin normal e kanserli hücreler üzerindeki IC ₅₀ değerlerinin grafik gösterimi	61



KISALTMALAR DİZİNİ

HCT-116	Human Colon Carcinoma
MDA-MB-231	Human Breast Carcinoma
DU-145	Human Prostate Carcinoma
U2OS	Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells
BEAS-2B	Human Non-Tumorigenic Lung Epithelial Cell Line
HEK-293	Human Embryonic Kidney 293
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
CRL-4010	Human Mammary Epithelium Cell
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
DCFDA	Dikloroflorosein Diasetat
JC-1	1,1',3,3'-Tetra Etil Benamidazol Karbosiyanin İyodür
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ER	Öströjen Reseptörü
CTX	Klorotoksin
NDBP	Disülfid Bağı İçermeyen Peptitler
ICK	İnhibitör Sistein Düğümü
NaSCTxs	Sodyum Kanal Toksini
KTxs	Potasyum Kanal Toksini
NTx	Noksiustoksin
TsTx1	Tityustoksin
IpTxa	Imperatoksin
CS $\alpha\beta$	α -Sarmal β - Levha Yapısal Motifi
ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
MMP-2	Metalloproteinaz-2
DEEM	Dietil Etoksimetilen Manolat
HSP	Isı Şoku Protein
LAAOs	L-Aminoasit Oksidaz
ChTx	Charybdotoxin
IbTx	İberiotoxin
AgTx	Agitoxin
PLA ₂	Fosfolipaz-2
BmKbpp	Bradykinin Güçlendirici Peptit
PBITx1	<i>Parabuthus Schlechteri</i> Akrep Toksin-1
RyR	Ryanodin Reseptör
BMK-CBP	Serin Proteaz Benzeri Protein
AMP	Antimikrobiyal Peptit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit

RPMI
DMEM
FBS

Roswell Park Memorial Institute Hücre Besiyeri
Dulbecco's Modified Eagle Medium Hücre Besiyeri
Fetal Sığır Serumı



ÖZET

ANDROCTONUS CRASSICAUDA AKREP ZEHRİNİN ANTİKANSER ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ

Murat TİKEN

Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans Tezi

Günümüzde çağımızın öldürücü hastalığı olan kansere karşı yapılan klasik tıbbi ilaç tedavilerinde kalıcı ve iyileştirici sonuçlar alınamamaktadır. Ayrıca gücünü doğal ürünlerden alan alternatif tedavilerin uygulanması sonucunda kanser türlerinde tedavi başarı oranının artması, bilim dünyasını kanserin yaşama olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için doğal kaynaklara yöneltmiştir. Günümüzde akrep zehrinin farmakolojik olarak aktif bileşikler açısından zengin bir kaynak olduğu antikanser özellik başta olmak üzere antimikrobiyal ve antienflamatuar özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı; Şanlıurfa'da yaşayan *Androctonus crassicauda* akrep türünden elde edilen zehrin antikanser etkisi ve metabolit profilinin incelenmesidir. Elektrik impulsu ile akreplerden toplanan zehirler liyofilize edildikten sonra, 10 kDa fraksiyonu elde edildi. Zehrin; kolon (HCT-116), meme (MDA-MB-231), prostat (DU-145), akciğer (A-549), rahim (HELA), kemik (U2OS) kanseri ve normal hücreler (CRL-4010, BEAS-2B, HEK-293, HUVEC) üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemiyle tespit edildi. En güçlü sitotoksik etki gösterdiği meme kanserindeki; apoptotik etkisi Annexin -V, hücre içi reaktif oksijen seviyesi (ROS) ve mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) flow sitometri ile incelendi. Akrep zehrinin metabolit profili; serbest aminoasit, karnitin ve organik asit profili LC-MS/MS ile analiz edildi.

Çalışma sonucunda akrep zehrinin en güçlü sitotoksik etkiyi MDA-MB-231 ($IC_{50}=47.4 \mu g/ml$) hücresinde gösterirken, normal meme hücresinde (CRL-4010; $IC_{50}=120.3 \mu g/ml$) düşük sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. Meme kanseri üzerindeki sitotoksik etkiyi, mitokondriyal membran potansiyelini bozarak, hücre içi ROS'u artırdığı ve sonuçta hücrede apoptozisi tetiklediği tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler Şanlıurfa'da yaşayan *Androctonus crassicauda* akrep zehrinin meme kanseri üzerinde antikanser potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin daha detaylı araştırılması ve hedef molekülünün tespiti için çalışılan zehir fraksiyonu'nun peptit haritasının çıkarılarak etkili olan molekülün tespit edilmesine yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Androctonus Crassicauda, Akrep Zehri, Meme Kanseri, Apoptozis, Metabolomiks

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTICANCER PROPERTIES OF ANDROCTONUS CRASSICAUDA SCORPION VENOM

Murat TIKEN

Medical Biochemistry, Master's Thesis

Classical medical drug treatments against cancer, which is the deadly disease of our age, cannot achieve permanent and curative results. In addition, the increase in the success rate of treatment in cancer types as a result of the application of alternative treatments that take their power from natural products has led the scientific world to natural resources to eliminate the negative effects of cancer on life. It has been determined that scorpion venom is a rich source of pharmacologically active compounds, showing antimicrobial and anti-inflammatory properties, especially anticancer properties.

The aim of this study is to investigate the anticancer effect and metabolite profile of the venom obtained from the scorpion species *Androctonus crassicauda* living in Şanlıurfa.

After the venoms collected from the scorpions by electric impulse were lyophilized, a fraction of 10 kDa was obtained. Scorpion Venom; colon (HCT-116), breast (MDA-MB-231), prostate (DU-145), lung (A-549), uterus (HELA), bone (U2OS) cancer and normal cells (CRL-4010, BEAS-2B, HEK-293, HUVEC) was determined by the MTT assay. In breast cancer, where it has the strongest cytotoxic effect; The apoptotic effect of Annexin-V, intracellular reactive oxygen level (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) were examined by flow cytometry. Metabolite profile of scorpion venom; free acid, carnitine and organic acid profile were analyzed by LC-MS/MS.

As a result of the study, it was determined that scorpion venom had the strongest cytotoxic effect in MDA-MB-231 ($IC_{50}=47.4 \mu\text{g/ml}$) cells, while it had a low cytotoxic effect in normal breast cells (CRL-4010; $IC_{50}=120.3 \mu\text{g/ml}$). It has been determined that the cytotoxic effect on breast cancer, by disrupting the mitochondrial membrane potential, increases intracellular ROS and ultimately triggers apoptosis in the cell.

The data obtained showed that *Androctonus crassicauda* scorpion venom living in Şanlıurfa has anticancer potential on breast cancer. In order to investigate this effect in more detail and to determine the target molecule, studies should be carried out to determine the effective molecule by extracting the peptide map of the studied venom fraction.

Keywords: Androctonus Crassicauda, Scorpion Venom, Breast Cancer, Apoptosis, Metabolomic

1. GİRİŞ

Kanser, bir organizmadaki hücrelerin doğal süreçlerini düzenleyen mekanizmalarında meydana gelen mutasyonlar sonucu anormal bir şekilde bölünüp, çoğalarak yayılmasıdır. Meydana geldiği organı etkilediği gibi aynı zamanda uzaktaki organlarla metastaz yaparak işleyiş sürecini etkilemektedir. İnsanların birbirinden farklı dizilimli DNA'lara sahip olması nedeniyle kanser oluşumu herkeste farklı etkilere sebep olabilmektedir. Kanser, dünyadaki tüm ölümlerin en olası nedenlerinden biri olduğundan etkin ve iyi seçilmiş bir tedavi ajanı ile, hastaların hayatta kalma şansını önemli ölçüde yükseltmektedir. Dünyadaki kanserlerin oluşum insidansı yükseldiğinden; yeni, daha hızlı, yüksek özgünlükte ve tedavi oluşturacak hassas yaklaşımlar geliştirmek çok önemlidir.

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 2020'de 19,3 milyon yeni vaka ve 10,0 milyon ölüm şeklinde bildirilen oranlar, 2018 yılındaki 18,1 milyon vaka ve 9,6 milyon ölüm oranlarıyla kıyaslanınca dünyadaki kanser yükünün arttığı tahmin edilmektedir. 2020 istatistiklerine göre meme kanseri, en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır. Tahminen 2,3 milyon yeni vaka (%11,7), bunu akciğer (%11,4), kolorektal (%10,0), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri izlemiştir. Akciğer kanseri, tahmini 1,8 milyon ölümle (%18) kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmaya devam ederken, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanserleri izlemiştir. Kanser yükünün bu hızlı artışı, dünya çapında halk sağlığı ve sağlık sistemleri için bir kriz teşkil etmektedir. Gelecekte-kaynakları bol olan ülkeler de dahil olmak üzere-birçok ülke için, tanı konacak çok sayıdaki kanser hastasının tümünün tedavisi ve bakımı (palyatif, destekleyici ve ölüm aşamasındaki) için yeterli ödenekleri temin etmek önemli bir sorun olacaktır. (1). ABD'de 2015 yılında kanserle ilgili sağlık hizmetlerine yaklaşık 183 milyar dolar harcandı ve bu miktarın 2030 yılına kadar %34'lük bir artışla 246 milyar dolara çıkması öngörülmektedir(2).

Günümüzde büyük bir problem teşkil eden kanser hastalığının tedavisinde; tümörün organizmadaki durumuna göre çok farklı tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Bu tedavi yöntemleri arasında, radyoterapi, kemoterapi,

immünoterapi ve cerrahi müdahale gibi yöntemler yer almaktadır ve en sık kullanılan klasik yöntem kemoterapidir.

Kemoterapide çeşitli bitkilerden elde edilen doksorobisin, vinblastin gibi ilaçların yanı sıra kimyasal olarak sentezlenen sisplatin, 5-florurasil gibi ilaçlarda kullanılmaktadır. Kemoterapinin en önemli yan etkilerinden bazıları kanser türüne spesifik olmaması, kanser hücreleri ile birlikte sağlıklı dokuya da ciddi zararlar vermekte olması ve buna bağlı hastalarda doza bağlı nefropati, kardiyomiyopati, nötropeni gibi olumsuz yan etkiler çıkmasıdır.

Yan etkilerine rağmen kemoterapik ajanların etkili olması ve maliyetlerinin düşük olmasından dolayı hala kullanılmaktadırlar. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye spesifik bir hastalık olup etkilerinin farklı olması ile uygulanan tedavilerin kişiden kişiye değişkenlik gösterdiğinden tedavi yönteminde kesinlik belirtmek oldukça zordur.

Bu yöntemlerin yetersiz olmasından, yan etkilerinin fazla olmasından dolayı bu ajanlara muadil olabilecek yeni kemoterapik adayların bulunabilmesi için son zamanlarda çeşitli tedavi stratejileri denenmekte ve çalışılmaktadır.

Bu çalışmalardan bazıları doğal ürünlerden, bitkilerden, böceklerden, hayvanlardan yeni ajanlar bulmayı hedeflemektedir. Bunlar arasında son yıllarda özellikle hayvan zehirlerinde önemli terapötik sonuçlar olduğu tespit edilmiştir.

Akrep zehri de bu doğal kaynaklardan biridir. Akrep zehri, heyecan verici tıbbi beklentileri olup, bir ilaç adayı olma potansiyeli olan pahalı ve ölümcül bir zehirdir. Birkaç akrep zehri peptidi birçok hastalıkta umut verici olmuştur. Yapısal ve fonksiyonel spesifikliği nedeniyle, akrep peptidleri, özellikle kardiyovasküler ve diğer immün hastalıklar için spesifik ilaçların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Akrep zehirlerinin, apoptozu indükleyerek kanserin ilerlemesine karşı etkili olan birçok biyoaktif bileşiği olduğu bilinmektedir. Fakat akrep zehir içeriğinin akrebin türüne ve yaşadığı ortama göre değişiklik göstermesi nedeniyle aynı türe ait akrep zehrinin dahi farklı farmakolojik etkileri olmaktadır. *Androctonus crassicauda*'nın Şanlıurfa'da yetişen türünün herhangi bir antikanser özelliği incelenmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada ilk kez Şanlıurfa yaşayan *Androctonus crassicauda* türü akrebin zehri, elektroimpuls yoluyla sağıldı; hidrofor ve hidrofilik

kısımları birbirinden ayrıştırıldı ve suda çözünen kısımları sağlıklı hücrelerde ve kanser hücreleri üzerinde denendi. Bu çalışmada kısıtlı literatürde önerilen antiprolifatif etki mekanizması MTT ve serbest aminoasit seviyesinde ilk kez aydınlatılmış ve gelecek kanser terapilerinin etkililiğine dair öneriler sunulmuştur.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

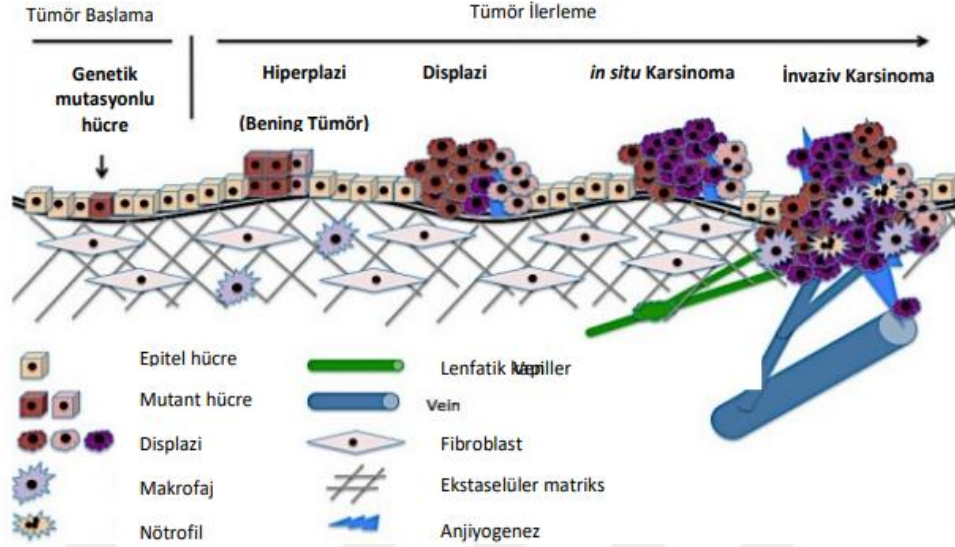
Kanser, hücrelerin anormal ve kontrolsüz çoğalması olarak tanımlanabilir. Kanser hücreleri sıklıkla çevre dokulara yayılır veya kan veya lenfatik sistem yoluyla uzak organlara metastaz yapar (3, 4). Kanser hücreleri birçok doku ve organda ortaya çıkabilir (5). Erken teşhis ve tedavideki ilerlemelere rağmen, kanser hala araştırma için en yüksek önceliğe sahip büyük bir sağlık sorunudur (6, 7).

Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, kanser oluşumunun ilk adımı genetik mutasyon olan “Başlangıç” aşamasıdır. Genetik mutasyon sürecine neden olan veya bu süreci destekleyen “Başlatıcılar” arasında hormonlar, kimyasallar, radyasyon, enfeksiyon ve hipoksi yer alır (8, 9).

Genetik mutasyonlar, RAS (10) ve MYC (11) gibi pro-onkogenik genlerde veya BRCA1, BRCA2 ve TP53 (12, 13) gibi tümör baskılayıcı genlerde gerçekleşebilir. Genel olarak kanser gelişimi, çoklu genetik anormalliklerin birikimini gerektirir (14, 15). Mutasyona uğramış hücreler uykuda kalabilir veya çoğalabilir. Kanser oluşumunun ikinci aşaması, hiperplazi (hücre sayısında artış), displazi (hücrelerde fenotipik değişiklikler), in situ karsinom (erken evre kanser) ve son olarak invaziv karsinom gibi birkaç adımı içerir (16).

Bugüne kadar, kanser hücrelerinin anormal büyümelerini sürdürdüğü ve büyüme baskılayıcı mekanizmalardan kaçtığı altı kanser özelliği tanımlanmıştır (17). Bunlar arasında çoğalan sinyallemenin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezi indüklemeye ve aktive edilmiş istila ve metastaz bulunur (17).

Kanser gelişimi, mutasyona uğramış tek bir hücrenin anormal şekilde çoğalmaya başlamasıyla başlar. Popülasyon içinde daha hızlı çoğalan değişmiş hücrelerin seçilmesini takip eden ek mutasyonlar, ilerlemeye ve ardından çevredeki bağ dokularına invazyona yol açar. Değişen hücreler kan ve lenf damarları yoluyla uzak organlara yayılabilir (Şekil 2.1).



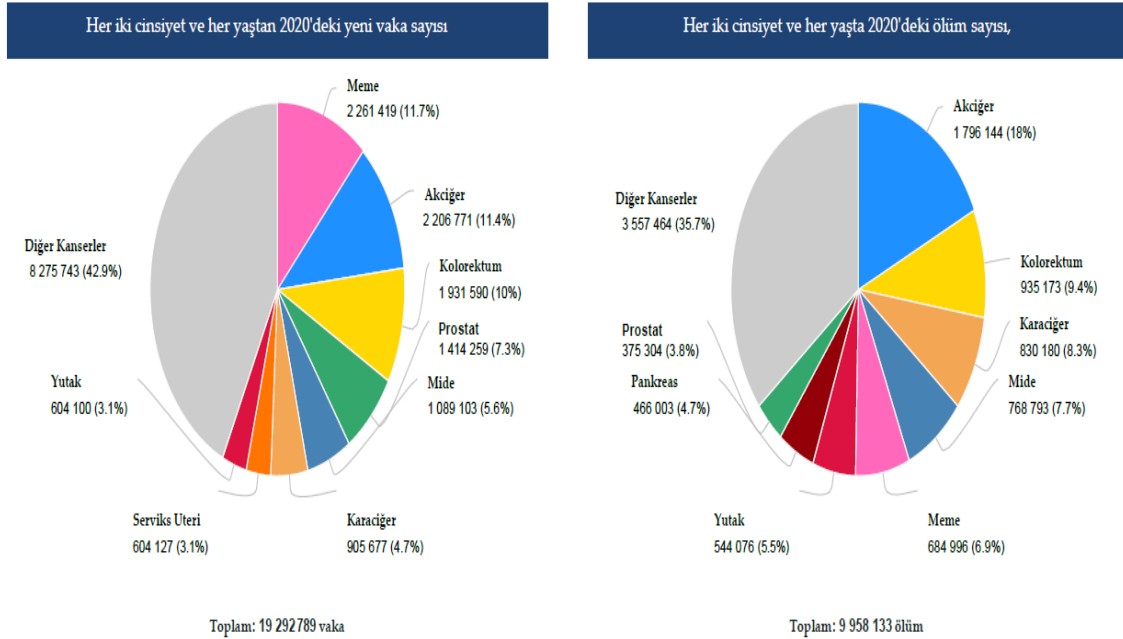
Şekil 2.1. Normal hücrelerden metastaza doğru tümör gelişim basamakları (18).

2.2. Kanser İnsidans ve Epidemiyolojisi

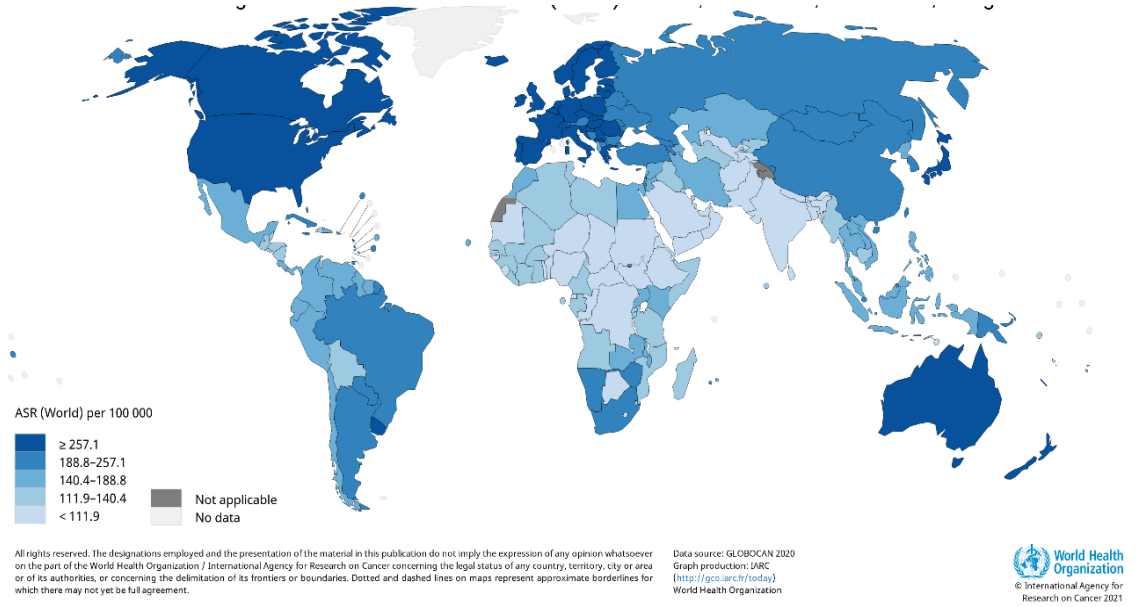
2018 yılında küresel kanser yükünün 18,1 milyon yeni vakaya ve 9,6 milyon ölüme yükseldiği tahmin edilmektedir. Dünyada her 5 erkekten ve 6 kadından biri yaşamları boyunca kansere yakalanıyor ve her 8 erkekten ve 11 kadından biri bu hastalıktan ölüyor. Dünya çapında, 5 yıllık prevalans olarak adlandırılan kanser teşhisinin ardından 5 yıl içinde hayatta kalan toplam insan sayısının 43,8 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Artan kanser yükü, nüfus artışı ve yaşlanmanın yanı sıra sosyal ve ekonomik kalkınmayla bağlantılı belirli kanser nedenlerinin değişen prevalansı gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu dönem özellikle yoksulluk ve enfeksiyonlarla ilgili kanserlerden, daha çok sanayileşmiş ülkelerdeki yaşam tarzlarıyla ilişkili kanserlere bir kaymanın gözlemlendiği bir dönem olup bu durum daha çok hızla büyüyen ekonomilerde gözlenmektedir. Etkili önleme çabaları, akciğer kanseri (örn. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'daki erkeklerde) ve serviks kanseri (örn. Sahra Altı Afrika dışındaki çoğu bölgede) gibi bazı kanserlerin görülme oranlarında gözlenen azalmayı açıklayabilir. Ancak yeni veriler, çoğu ülkenin teşhis konulan, tedavi ve bakım gerektiren mutlak vaka sayısında hâlâ bir artışla karşı karşıya olduğunu gösteriyor.

Küresel modeller, erkekler ve kadınlar için toplamda, 2018'de dünya çapındaki yeni vakaların yaklaşık yarısının ve kanser ölümlerinin yarısından fazlasının, kısmen bölgenin küresel nüfusun yaklaşık %60'ına sahip olması nedeniyle Asya'da meydana geldiği tahmin edilmektedir (19).

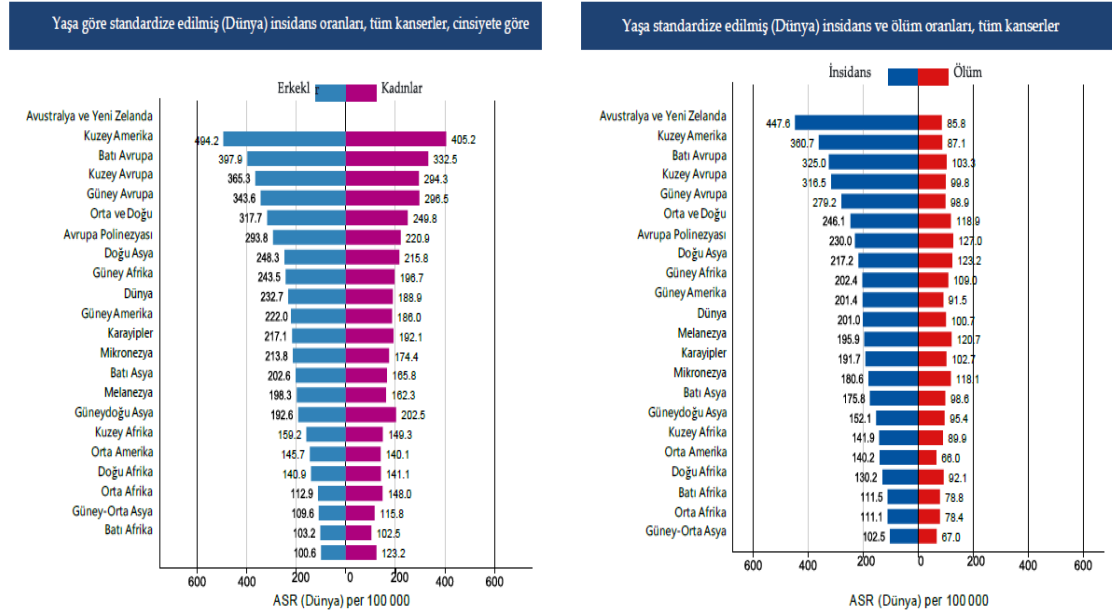
Dünya Sağlık Örgütü- Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) 2020 Dünya Kanser İstatistikleri dünya çapında tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 18,1 milyon) ve yaklaşık 10,0 milyon kanser ölümünün (melanom dışı cilt kanseri hariç 9,9 milyon) meydana geldiğini göstermektedir. 2020'de 19,3 milyon yeni vaka ve 10,0 milyon ölüm şeklinde bildirilen oranlar, 2018 yılındaki 18,1 milyon vaka ve 9,6 milyon ölüm oranlarıyla kıyaslanınca dünyadaki kanser yükünün arttığı tahmin edilmektedir. 2020 istatistiklerine göre Kadın meme kanseri, en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır. Tahminen 2,3 milyon yeni vaka görülmüş olup (%11,7), bunu akciğer (%11,4), kolorektal (%10,0), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri izlemiştir. Akciğer kanseri, tahmini 1,8 milyon ölümle (%18) kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmaya devam ederken, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanserleri izlemiştir (20) (Şekil 2,3,4).



Şekil 2.2. Cinsiyete ve türe göre yeni kanser vakaları(20).



Şekil 2.3. 2020'de tahmini yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranları (Dünya), tüm kanserler, heriki cinsiyet, her yaştan (20).



Şekil 2.4. 2020 de Dünya'da yaşa göre standardize edilmiş tüm kanserlerde insidans oranları ve ölüm oranları (20).

2.3. Meme Kanseri

2.3.1. Tanım

Meme kanseri, glandüler süt kanallarının epitel hücrelerinden veya meme lobüllerinden kaynaklanan malign bir tümördür (21). Rahim ağzı kanseri, düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşayan kadınlarda görülen yaygın kanserlerden biridir. Amerika Birleşik Devletleri'nde teşhis edilen en yaygın üçüncü jinekolojik kanser ve ölüm kaynağıdır (22).

Meme kanseri, tümörün bazal membranın dışında büyümeye başlayıp başlamamasına bağlı olarak invaziv olmayan (karsinoma in situ) veya invaziv olarak sınıflandırılır.

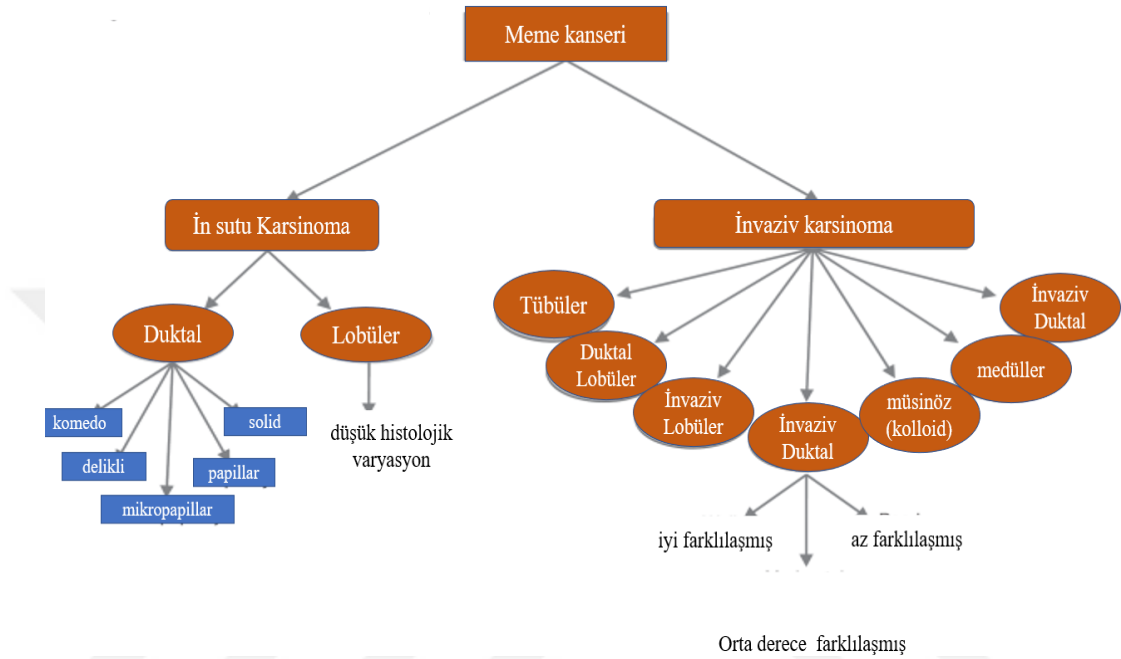
İnvaziv karsinomlar, değişmiş hücrelerin çevredeki bağ dokularına yayıldığı ve vücudun uzak organlarına metastaz yaptığı kanserlerdir. Meme karsinomlarının yaklaşık üçte ikisi, duktal karsinom adı verilen kanalların epitel hücrelerinden ve yaklaşık üçte biri lobüler karsinom adı verilen lobüllerden kaynaklanır (23). Daha az yaygın olan diğer histolojik gruplar, şekil 5'de gösterildiği gibi inflamatuvar, medüller, apokrin, müsinöz ve tübüler karsinomlar olarak tanımlanır (23).

Meme karsinomlarının çoğu, duktal epitel hücrelerinden kaynaklanır ve çevredeki bağ dokuları (invaziv duktal karsinom) tutma ve vücudun uzak organlarına metastaz yapma eğilimindedir. Meme kanseri, 2021'de tahmini 49.290 kadın meme duktal karsinomu in situ ve 281.550 invaziv hastalık vakası ile ABD'li kadınlarda en sık görülen deri dışı kanserdir (24). Böylece meme kanseri teşhisi konan altı kadından birinden daha azı hastalıktan ölmektedir. Karşılaştırıldığında, 2021'de yaklaşık 62.470 Amerikalı kadının akciğer kanserinden öleceği tahmin ediliyor (24). Erkekler ise meme kanseri vakalarının ve meme kanseri ölümlerinin %1'ini oluşturuyor.

Meme kanserli tüm kadınların %5 ila %10'unda BRCA1 ve BRCA2 genlerinde germ hattı mutasyonu olabilir (25). BRCA1 ve BRCA2'nin spesifik mutasyonları, Yahudi kökenli kadınlarda daha yaygındır (26). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarına sahip kadınlarda tahmini yaşam boyu meme kanseri gelişme riski %40 ila %85'tir. Meme kanseri öyküsü olan taşıyıcılar, yılda %5'e varan yüksek bir

kontralateral hastalık riskine sahiptir (27). Erkek BRCA2 mutasyon taşıyıcıları da meme kanseri riskini artırmaktadır (28).

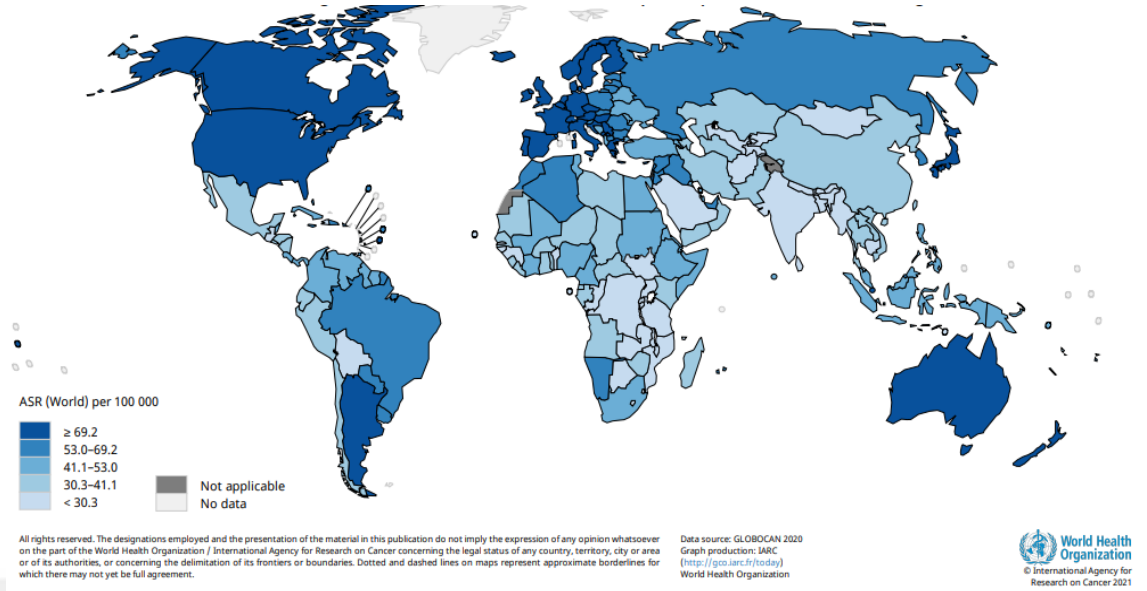
BRCA1 veya BRCA2 genindeki mutasyonlar ayrıca yumurtalık kanseri veya diğer birincil kanser riskinde artışa neden olur (28, 29).



Şekil 2.5. Meme kanseri alt tiplerinin histolojik sınıflandırması (23).

2.3.2 Meme Kanseri Epidemiyoloji ve İnsidansı

Meme kanseri, her yıl tahminen bir buçuk milyon yeni vaka ve yılda yaklaşık yarım milyon ölümle dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanser hastalığıdır (30). Meme kanseri insidansı dünya çapında istikrarlı bir şekilde artmaktadır ve bu oranın Orta Afrika ve Doğu Asya'da 100.000'de 27'den Kuzey Amerika'da 100.000'de 92'ye kadar değiştiği, diğer farklı bölgelerde neredeyse dört kat değiştiği görülmektedir (30). Bunun nedeni, popülasyonlar arasındaki yaş dağılımı, diyet, yaşam tarzı, etnik köken, genetik geçmiş ve diğer meme kanseri risk faktörlerindeki farklılıklar olabilir.



Şekil 2.6. 2020 yılında yaşa göre standardize edilmiş meme kanseri insidansı (20).

2.3.3. Meme Kanserlerinde Tedavi

Çok yakın zamana kadar, meme kanseri hastalarının çoğuna sunulabilen tek tedavi seçeneği cerrahi, radyasyon ve standart kemoterapi idi. Hem radyasyon hem de kemoterapinin seçicilik eksikliği ve yüksek toksisite sergilediği göz önüne alındığında, daha spesifik, muhtemelen hedefe yönelik eylemlere sahip yeni ilaçlara acil ihtiyaç vardır (31).

Son yıllarda, meme tümörögenезinin temelindeki genomik değişiklikleri tanımlamayı amaçlayan genomik çalışmalar sayesinde, spesifik mutasyonları hedefleyen yeni terapötik ajanlar ve anahtar sinyal yolları, kanser ilacı gelişimini derinden dönüştürerek hedefe yönelik tedavi çağına açılmıştır (32). Daha güçlü tedaviler veya sinerjik kombinasyonlar geliştirerek bu klinik komplikasyonun üstesinden gelmek için stratejiler gereklidir (31).

Primer meme kanseri olan hastalara ilk seçenek olarak cerrahi uygulanmaktadır (33). En sık meme koruyucu cerrahi tercih edilmekte ve bunu lokal radyasyon tedavisi takip etmektedir (34). Bu tedavi meme kanseri olan geniş bir hasta grubu için küratiftir (35). Tümörleri erken evrelerde tespit eden mamografik tarama programları sayesinde tüm dünyada mastektomi (tüm memenin alınması)

ihtiyacı önemli ölçüde azalmıştır. Ameliyattan sonra saptanamayan potansiyel mikro metastazları ortadan kaldırmak için hastalar sıklıkla kemoterapi, endokrin ve/veya hedefe yönelik tedaviler dahil adjuvan tedavi alırlar. Bununla birlikte, bazı meme kanseri alt gruplarında tümörün durumuna bağlı olarak, bazı hastalar, primer tümörün ameliyattan önce küçüldüğü neo-adjuvan tedavi alabilir (33). Bu tedavinin ek bir avantajı, verilen tedaviye tümör yanıtını incelemek için fırsatlar sağlamasıdır.

2.3.4. Meme Kanserlerinde Tümör derecesi

Tümör derecesi, tümör dokularını mikroskopik olarak incelenip tümör hücrelerinin anormalliğine göre sınıflandırılır. Ve bu sınıflama tümörün ne kadar hızlı büyüyüp yayılacağına prognostik bir göstergesi olarak kullanılır (36).

Tümör derecesi, glandüler/tübüler oluşum, nükleer pleomorfizm (çekirdek ve nükleollerin boyut ve şeklindeki değişkenlik) ve mitoz (hücre bölünmesi) sayısı dikkate alındığında bir tümörün potansiyel agresifliği öngörülebilir (37). Bu yolla tümör G1, G2 ve G3 olmak üzere üç farklı dereceye sınıflandırılır. G1 düşük dereceyi ve iyi diferansiyeyi, G2 orta derecede diferansiyeyi ve G3 yüksek dereceyi ve kötü diferansiyeyi gösterir (37).

2.4. Kanser Tedavilerinde Kemoterapi ve Kullanılan Ajanlar

Kanserin tedavisinde cerrahi, kemoterapi (anti-kanser ilaçları kullanımı) veya radyoterapi (kanser hücrelerini hedeflemek ve öldürmek için lazer ışın kullanımı), tek başına veya kombinasyon halinde kullanımları tedavide gerekebilir.

Kemoterapi, kelimenin tam anlamıyla, malign hücreyi veya mikroorganizma gibi bir hastalığın enfeksiyöz ajanlarını, konakçı hücreleri fazla etkilemeden inhibe etmek için kimyasalların kullanılması anlamına gelir (38). Bu nedenle, tedavi genel olarak iki kategoriye ayrılabilir- kanser kemoterapisi ve antimikrobiyal kemoterapi.

Bu kategorilere ait ilaçlar, genellikle hedef organizmayı öldürmeye veya inhibe etmeye yönelik olduklarından ve konak hücre üzerinde hiç veya çok az etkiye sahip olduklarından diğerlerinden farklıdır (39).

Kemoterapi, kanser tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır. Kanser hücreleri, normal hücrelerde bulunan düzenleyici fonksiyonların çoğunu

kaybettikleri için, normal hücrelerden farklı olarak bölünmeye devam ederler. Bu özellik kanser hücrelerini kemoterapötik ilaçlara duyarlı hale getirir.

Kemoterapötik ilaçlar, kanser hücrelerini hücre ölümü programına indüklemek için apoptoz yollarını hedefler. Kemoterapinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, kanser hücrelerinde ROS'un artmasına neden olan kemoterapi ilaçlarının bu hücrelerde DNA hasarına, genetik materyalleri bloke etmesine ve ROS'un artmasına yol açmasıdır. ROS, kaspaz 3'ü aktive etmek için mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımını indükler ve böylece apoptoz süreci uyarılmış olur. (22).

Daha önce, kemoterapötik ajanların sentetik bileşiklerle sınırlı olduğu düşünülürken, günümüzde çok daha fazla doğal ürün potansiyel kemoterapötik ajanlar veya antibiyotikler olarak pazarlanmaktadır. Mevcut durum hem sentetik hem de doğal veya mikrobiyolojik olarak üretilen ilaçların bir arada bulunmasını gerektirmektedir.

Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerin (kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleler) yaşam kalitesini olumsuz etkileyen yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle, daha spesifik daha etkili ve daha az yan etkili tedavi stratejileri geliştirmek için daha titiz çalışmalara ihtiyaç vardır (40).

Geleneksel kemoterapide, tüm antikanser ilaçları hem kanser hem de normal hücreler için doğası gereği sitotoksiktir (41), yani kemoterapi normal koşullar altında hızla bölünen hücreleri de yok etmektedir: sindirim sistemi, kemik iliğindeki hücreler ve saç folikülleri vb.

Kemoterapi tedavisi sırasında gözlemlenen en yaygın yan etkiler şunlardır: mukozit (sindirim sistemi zarının iltihabı), alopesi (saç dökülmesi) ve mielosupresyon (kan hücrelerinin üretiminde azalma, dolayısıyla immünosupresyon) (42).

Kemoterapötik tedavilerin bir sonucu olarak çeşitli toksisiteler ortaya çıkabilir. Örneğin, yaygın bir kemoterapötik ajan olan 5-florourasil'in miyelotoksisiteye (43), kardiyotoksisiteye (44) neden olduğu bilinmektedir. Yaygın olarak kullanılan bir diğer kemodrug olan doksorubisin, kardiyak toksisiteye (45-47), renal toksisiteye (48) ve miyelotoksisiteye (49) neden olmaktadır. Benzer şekilde, iyi bilinen bir kemoterapötik ajan olan bleomisin, pulmoner toksisitesi ile bilinir (50-

52). Ek olarak, bleomisin kutanöz toksisite gösterir (53). Birçok malign durumu tedavi etmek için kullanılan bir ilaç olan siklofosfamidin hemorajik sistit, immünosupresyon, alopesi ve yüksek dozlarda kardiyotoksisite ve mesane toksisitesine sahip olduğu gösterilmiştir (54). Cisplatin yaygın olarak kullanılan bir diğer antikanser ilaçtır. Yararlı antitümör etkisine rağmen, yüksek dozlarda nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi istenmeyen yan etkiler oluşturabilir (55). Ayrıca naringenin-oksimin (NOX) ile tedavinin, antioksidan sistemi geri yükleyerek Cisplatin kaynaklı hepatotoksisite, nefrotoksisite ve genotoksisiteyi önlediği bildirilmiştir (56, 57).

Monoklonal antikorların çoğu, ayırım gözetmeksizin sitotoksik değildir ve kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen ve çoğalmaları için gerekli olan proteinleri hedefleyerek hareket eder (58). Bu tür tedaviler (klasik kemoterapiden farklı olarak) genellikle hedefe yönelik tedavi olarak adlandırılır ve kanser tedavi rejiminde her zaman geleneksel kemoterapötik ajanlarla birlikte uygulanır. Günümüzde meme kanseri tedavisinde kullanılan FDA onaylı birçok ilaç bulunmaktadır.

Ön ilaç tamoksifen (marka adı: Nolvadex), östrojen reseptörü (ER) tarafından östrojen alımını bloke eden kısmi bir agonisttir (59, 60). Çalışmalar, ER+ meme kanseri nüks riskinin tamoksifen ile yarı yarıya azaltılabileceğini göstermiştir(61). Bununla birlikte, çoğu anti-kanser tedavisine benzer şekilde, tamoksifenin bilinen yan etkileri vardır ve endometriyal kanser, kan pıhtıları ve felç gibi bir dizi artan sağlık riskleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur (62, 63).

Kanser kemo-müdahalesi, invaziv kanserin ilerlemesini önüne geçmek veya azaltmak için doğada var olan doğal kaynaklardan biyolojik ajan, sentetik veya kimyasal bileşiklerin kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Bu noktada esas tedavi şekli, ilaçların belirli bir sistematikte verilmesini ve böylece kanser hücrelerine ulaşabilmelerini ve onları yok edebilmelerini içeren kemoterapi olmalıdır. Ancak bu ilaçların çoğu; hastalarda ciddi yan etkilere neden olmakta ve suboptimal seviyelerde kullanılmaları gerekmektedir. Bu nedenle, bazı bitki özleri, bitkilerden elde edilen doğal biyoaktif bileşenler veya bunların türevleri gibi alternatif önleyici maddeler üzerinde çalışmalar yapılmıştır (64). Daha etkili antikanser ajanlarının geliştirilmesi devam eden farklı araştırma dalları ve tedavi yöntemlerini içermektedir. Doğal ürünler, kanser tedavisi için kullanılan ilaçların neredeyse yarısından fazlasını

karşılayan önemli kaynaklardır. Günümüz ilaçlarının etkilerine göre daha güçlü, daha seçici ve daha az toksik bileşikler keşfetmek amacıyla, antikanser ajanların araştırılması sürekli olarak farklı kaynaklardan gelen yeni doğal ürünler araştırılmaktadır (65).

2.5. Bitkiler ve Hayvanlardan Üretilen Doğal Ürünlere Bakış

Tarih boyunca doğal ürünler insan hastalıklarının tedavisinde baskın bir rol oynamıştır. Buna ek olarak, büyük ölçüde karasal bitkilere dayanan geleneksel ilaçlar, dünya çapında terapötik uygulamalara hâlâ hakimdir ve doğal ürünler, özellikle antibiyotik ve kanser terapileri alanlarında, günümüz farmasötik ajanlarının büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Kanser tedavisi için erken teşhis ve radyasyon tedavisi veya cerrahi rezeksiyon yoluyla tümörün kesin eradikasyonu en büyük umuttur.

Burada açıklandığı gibi, kanser tedavisi için gerçekleştirilen anlamlı ilerlemelerin çoğu, doğal ürün ilaçların keşfi ile doğrudan ilişkilidir. Kuşkusuz, kanserlerin önlenmesi, tedaviye tercih edilir. Kanser kemoprevansiyonu, yani karsinogenez sürecini inhibe etmek, geciktirmek veya tersine çevirmek için sentetik veya doğal ajanların kullanımı, bu zorlu halk sağlığı yükünü hafifletmek için başka bir önemli yaklaşımdır (66). Doğa, sentetik ilaçlara kıyasla daha az yan etkiye sahip terapötik bileşiklerin kaynağıdır (67).

Mevcut antikanser ilaçlarının %60'ından fazlası pek çok farklı şekilde doğal kaynaklardan elde edilmiştir (68). Doğa, biyolojik olarak aktif ve çeşitli kemotiplerin bol bir kaynağı olmaya devam ediyor ve gerçek izole edilmiş doğal ürünlerin nispeten azı kendi başlarına klinik olarak etkili ilaçlara dönüştürülürken, bu benzersiz moleküller genellikle daha etkili analogların hazırlanması için model görevi görüyor (69-74). Bu başarılı bileşiklerin ana kaynakları, kara ve deniz ortamlarından gelen mikroorganizmalar ve bitkilerdir.

Mikroorganizmalar, anti-tümör aktivitesi olan bazı doğal ürünlerin ana kaynağı olarak hizmet etmekte ve bu ürünlerin bir kısmı ilk olarak antibiyotik olarak keşfedilmiştir. Diğer bir önemli katkı ise bitkilerden alkaloidler, taksoidler ve podofilotoksinler olarak gelmektedir (74). Kemoterapötik ilaçlara direncin hızla

gelişmesi nedeniyle, yeni ilaçların araştırılması kanser tedavisi için hala öncelikli bir hedeftir. Ek olarak, genellikle bazı kanser kemoterapi ilaçlarıyla ilişkili yüksek toksisite ve bunların istenmeyen yan etkileri, tedavi edilemeyen tümörlere karşı daha az yan etki ve/veya daha yüksek terapötik etkinliğe sahip yeni anti-tümör ilaçlara olan talebi artırmaktadır (74).

Kimyasal çeşitlilikleri biyolojik ve coğrafi çeşitliliğe dayandığından, araştırmacılar tarafından tüm dünya biyolojik araştırmalar için araştırılmaktadır. Araştırmacılar, farmasötik açıdan başarılı doğal ürünlerin çoğunun kaynaklandığı karasal yaşama kolayca erişebildiler. Bununla birlikte, okyanus, potansiyel farmasötik öneme sahip doğal ürünlerle dolup taşan geniş bir yaşam formu repertuarına ev sahipliği yapıyor. Deniz biyo-araştırması nispeten yeni bir olgudur; Bu nedenle, deniz yaşamı nispeten keşfedilmemiş bir fırsat alanıdır (74).

Hem topraktan hem de denizden 'kültürlenemeyen' mikroorganizmaları yetiştirmek için yeni yöntemler geliştiriliyor. Biyolojik olarak elde edilen aktif doğal ürünlerin çoğu, karmaşık yapılara sahip ikincil metabolitlerdir. Bazı durumlarda doğal ürünün kendisi kullanılabilir olsa da bazen kimyasal veya biyolojik olarak elde edilen yapay türevler tıpta daha yaygın kullanılmaktadır. Biyosentetik yollar, istenen ürünü elde etmek için genellikle genetik olarak manipüle edilebilmektedir. Kombinatorial biyosentezin ortaya çıkmasıyla birlikte, kombinatorial kimyanın tamamlayıcısı olan bu biyolojik teknikle artık binlerce yeni türev yapılabilmektedir (75). İlaç endüstrisinin başarısı, doğal ürün keşfi, yüksek verimli tarama, genomik, proteomik, metabolomik ve kombinatorial biyosentez gibi tamamlayıcı teknolojilerin kombinasyonuna bağlıdır.

Tarihsel olarak bitkiler, doğal ürün ilaç keşfinin birincil kaynakları olmuştur ve antikanser alanında VBL ve vincristine (VCR), etoposid, paklitaksel (Taxol®), docetaxel, topotecan ve irinotecan gibi bitki kaynaklı ajanlar arasında yer almakta ve günümüzde mevcut olan en etkili kanser kemoterapötiklerindendirler (76). Bununla birlikte, birçoğu sulu ortamda zayıf çözünürlük ve önemli toksik yan etkilerden sorun yaşatmaktadır.

Bu nedenle, bu faktörlerin etkisini azaltmaya yönelik önemli araştırmalar devam etmektedir ve bu ajanların sayısız analogları ve ön ilaçları sentezlenmiştir ve sulu çözünürlüğü artırmak ve spesifik tümörleri hedeflemek için yöntemler

geliştirilmiştir (77). Son yıllarda konvansiyonel kanser terapilerine destek olarak bitkisel kökenli maddeler kullanılmaktadır. Gücünü bitkilerden alan bu alternatif tedavilerin uygulanması sonucunda kanser türlerinde tedavi başarı oranının artması, bilim dünyasını kanserin yaşama olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için doğal kaynaklara yöneltmiştir. Bu doğal kaynakların büyük çoğunluğunu ise biyolojik yönden aktif bileşikler içeren bitkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle kanser hücrelerinin üremesini durduran uygun bitkisel kaynakların değerlendirilebilmesine yönelik etkin stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (78).

Örneğin yapılan bir çalışmada ısırgan su ekstraktının HL-60 hücrelerinde apoptozisi başlattığı ve hücre proliferasyonunun baskılandığı ve hücrelerin G0/G1 fazında tutulduğu, hücrelerde MMP'nin bozulduğu ve apoptotik hücre yüzdesinin arttığı belirlendi. Bu apoptotik belirteçler, kanser tedavisi için umut verici bitki adayı olabileceği tahmin edilmektedir (67).

Başka bir örnekte halk ilacı olarak kullanılan *Artemisia absinthium* L. türünden elde edilen metanolik ekstraktın anti-kanser ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi ve fenolik içeriğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. DLD-1 ve ECC-1 kanser hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite gösterirken, HEK-293 hücreleri üzerinde sitotoksik etkinin düşük olduğu belirlendi. Bunun kanser hücreleri üzerindeki hücre içi serbest radikal miktarını artırarak DNA hasarına yol açtığı ve bunun sonucunda kanser hücrelerinin apoptozisine yol açtığı belirlendi (79, 80).

Tarih boyunca birçok hastalıkta kullanılan bir halk ilacı olan *Pistacia* türlerinin (*P. Lentiscus*, *P. Terbintus*, *P. Vera* vb.) yaprak, meyve, sakız ve reçinelerinden elde edilen lipofilik ekstraktlar ve uçucu yağların içerdiği terpenler ve fenolik bileşenler nedeniyle antioksidan gibi etkiler belirlenmiştir. Birçok çalışmada Urfa fıstığının anti-inflamatuvar aktivite, glisemik kontrol ve endotel fonksiyonu gibi vücut sağlığının idamesini sağlayan mekanizmaların devam etmesine yardımcı olduğu, ayrıca; aterogeneizde LDL kolesterolünün okside olmasını engellediği, kanser ve kardiyovasküler hastalık gibi kronik hastalıklara karşı koruyucu rol oynayabildiği tespit edilmiştir (81).

Çeşitli kısımları kullanılarak ekstrakte edilen *Pistacia vera* 'nın antikanser potansiyelinin olduğu düşük dozlarda kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki ettiği birçok çalışma ile raporlanmıştır. *Pistacia* türlerinin fenolik ve flavonoid

bileşenlerinden dolayı, antimitojenik, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, antikanser ve antioksidan potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Fıstık yeşili kabuğunun n-heksan fraksiyonunun DNA'ya zarar verdiğini, hücre döngüsünü G1 alt fazında durdurduğunu ve kolon kanserinde oksidatif yollarla apoptozu indüklediği araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (78, 82).

2.5.1. Hayvanlardan Elde Edilen Zehirlere Genel Bir Bakış

Bitkiler, hayvanlar ve mikroplar arasında savunmalarının bir parçası olarak ve avlarını yakalamak için çeşitli toksinler üretmek üzere evrimleşmiştir (83). Bu toksinlerin çoğu, doğası gereği peptit olarak tanımlanır. Bu tür peptitlerin çoğu oldukça seçici ve nispeten daha güvenli güçlü terapötikler olarak oluşturulmaktadır (84). Peptit olmayan toksinler tipik olarak oral olarak aktifken, peptit toksinler genellikle onları kas içi, deri altı veya damar içi yollarla iletmeye amaçlanan özel organlarla ilişkili hayvan zehirlerinde bulunur (83).

Yıllar geçtikçe, bakteri, mantar, bitki ve hayvanlardan elde edilen artan sayıda peptit, genellikle insan emsallerinden daha iyi terapötik özelliklere sahip olarak karakterize edilmiştir. Bunlar, özellikle terapötik gelişim için önemli olan daha yüksek seçicilik, güç ve in vivo stabiliteyi içerir. Hayvanlar alemindeki birçok reseptör, insan emsallerine çok benzer olduğundan, bu geniş doğal kaynaklar, terapötik gelişim için çıkarılabilen yeni biyoaktif peptitler sağlar (85).

En zengin kimyasal çeşitliliği sağlayan örümcekler, akrepler ve koni salyangozlarıyla birlikte keşfedilmeyi bekleyen milyonlarca nörolojik olarak aktif zehir peptidi var. Bu zehir kütüphaneleri, kısmen, ham zehir fraksiyonlarının bilinen hedeflere karşı tarandığı, ardından bir vuruşun sırasını aydınlatmak için daha fazla saflaştırma ve sıralamanın takip ettiği, biyoaktivite güdümlü fraksiyonlamaya dayalı geleneksel keşif yaklaşımının yavaş temposu nedeniyle, büyük ölçüde kullanılmadan kalır (85). Bununla birlikte, çeşitli teknolojik gelişmeler şimdi, zehir bezinden veya zehir kanalı transkriptomlarından derlenmiş dizi verilerini sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi yoluyla ham zehirden elde edilen proteomik verilerle hızlı ve hızlı bir şekilde birleştiren 'entegre zehirler' olarak adlandırılan güçlü bir yaklaşımın

temelini oluşturmaktadır (86, 87). Bu yöntemle bakteri, maya ve böcek hücrelerinde (88) rekombinant yöntemlerle üretilen binlerce yeni dizi elde etmek mümkündür.

Çok sayıda yüksek verimli tarama platformu (FLIPR, Cell Lux, FDSS 6000, AlphaScreen ve Tango gibi), bu peptitleri terapi için geniş bir onaylanmış hedefler paneline karşı taramak için kullanılabilir; iyon kanalları, zehir peptitleri için bir hedef sınıfıdır. İyon kanalı ilaç keşfinde sıklıkla çok yüksek seçiciliğe sahip modülatörlerin belirlenmesine ihtiyaç duyulduğu için özellikle umut verici olmuştur (86, 89). Kısa bir süre sonra, peptitlerin önemli biyolojik araçlar olarak önemi, dikkat çekici güçleri, seçicilikleri ve düşük toksisiteleri ile birlikte ortaya çıktı. Ancak aynı zamanda, düşük oral biyoyararlanım, düşük plazma stabilitesi ve kısa dolaşım süresi gibi sınırlamaları da fark edildi. Şu anda, küresel pazarda yaklaşık 80 peptit ilacı var ve yeni peptit terapötiklerine yönelik araştırmalar, klinik geliştirmede 150'den fazla peptit ve klinik öncesi çalışmalardan geçen 400-600 peptit ile sabit bir hızla devam etmektedir (90, 91). Peptit alanındaki yatırım ve araştırma çabalarındaki artış, peptit sentez teknolojisinin olgunluğu, biyolojiklerin başarısı ve ilaç endüstrisinin yeni ilaç onay oranlarını sürdürme baskısı göz önüne alındığında, peptit terapötik pazarının ivmesini sürdürecektir ve önümüzdeki yıllarda genişleyecektir (85).

Örümceklerin, yaban arılarının, akrelerin ve yılanların zehiri, hedef av için ölümcül olduğu kanıtlanabilen biyoaktif proteinler, peptitler ve küçük moleküllerin bir karışımından oluşur (84). Bunlar arasında zehir peptitleri en agresif moleküllerden biridir ve tanımlanmış birçok potansiyele sahiptir. Zehir peptitleri, doğası gereği, birkaç iyon kanalının ve reseptörlerinin farmakolojik karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan iyon kanallarının ligandları olarak işlev görür (92). Bunlar, in vivo enjekte edilirken sabit kalan, doğası gereği kompakt bir katlanmaya sahip disülfid köprüleri ile tasarlanmıştır (93). Ek olarak, yüksek stabiliteye sahip küçük boyut; Kıvrımların çeşitliliği, zehir peptitlerinin işlevsel bir türevi için bir avantaj olarak kullanılır (94). İzolasyondan sonra peptitler, tek bileşikler olarak uygun konsantrasyonlarda kullanılabilir ve bu nedenle zehirden türetilen peptitler, faydalı ilaçlar haline gelir (95). Tedaviye doğru başarılı bir şekilde ilerleyen bu zehir türevli biyoaktif peptitlerin toplam sayısı, mevcut terapötik alanda hala sınırlı olduğundan, oldukça umut verici olma eğilimindedir (95).

Zehirlerden gelen toksinler; sitotoksinler, kardiyotoksinler, hemotoksinler, miyotoksinler, nefrotoksinler ve nörotoksinler olabilir (96). Duffy ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, bal arısı zehiri ve melittin'in, meme kanseri hücrelerinde çalışılan plazma zarında reseptör fosforilasyonlarına müdahale ederek EGFR ve HER2 aktivasyonunu baskıladığı bulundu. Diğer mutasyon çalışmaları, melittin'in C-terminal dizisi üzerindeki pozitif yükün, plazma membran etkileşimi ve antikanser özelliği ile etkileşime aracılık ettiğini bulmuştur (97).

Akrep zehri Klorotoksin; Klorotoksin (CTX) benzeri peptitler ailesine aittir, insektisidal aktivite ile bilinir, gliomalar gibi beyin hücresi tümörleri ile spesifik olarak etkileşime girme potansiyeline sahiptir (98). Tümör glioma hücreleri tarafından ifade edilen klorür kanallarını bloke ettiği gösterilmiştir (99). Başlangıçta gliomaların teşhisi ve tedavisi için geliştirilmiş, son zamanlarda melanom, küçük hücreli akciğer karsinomu, nöroblastom, medulloblastom, Ewing sarkomu ve feokromositoma gibi katı tümörlerden kanser hücrelerini spesifik olarak etiketlediği gösterilmiştir (100).

Zehirli salyangoz konotoksinleri, oldukça spesifik yapıları ve hedef av ve insanların merkezi sinir sistemlerindeki iyon kanallarına, reseptörlere ve taşıyıcılara karşı yüksek afiniteleri nedeniyle değerli bir farmakolojik araştırma ve potansiyel ilaç öncüsüdür (101).

Apis mellifera'dan elde edilen arı zehiri apitoksinlerinin meme, karaciğer, kan, akciğer, deri ve prostat kanseri hücreleri gibi farklı kanser hücrelerine karşı antitümör aktivitelerine sahip olduğu gösterilmiştir (102). Apitoksin ve bileşeni melittin, antibakteriyel özellikleri ile oral patojenlere karşı potansiyel uygulamaya sahip olduğu gösterilmiştir (103).

Kobrotoksinler, motor uç plakasındaki asetilkolin reseptörlerine bağlanan postsinaptik nörotoksinlerdir (104). Kobrotoksinin, uygulanması anti-inflamatuar sitokin IL-10 ekspresyonunu yükselttiği için kronik böbrek hastalıkları için potansiyel bir ilaç adayı olduğu da gösterilmiştir (105). Ayrıca, kobrotoksinin SARS-COV2 enfeksiyonunun neden olduğu sitokin fırtınasını engelleyebildiğinden, COVID-19 hastalarını tedavi etme veya SARS-COV-2 enfeksiyonunu inhibe etme potansiyeline sahip olduğu da belirtilmiştir; CD4/CD8 oranını eski haline getirmek için CD8 T hücrelerinin çoğalmasını CD4 T hücrelerinininkinden daha fazla inhibe

eder; Akciğer iltihabını inhibe eder, akciğer gaz değişim fonksiyonunu iyileştirir ve akciğerde fibrotik lezyonların gelişimini hafifletir; Kas ağrısı ve baş ağrısı olan hastalara rahatlama sağlayan analjezik etki; SARS-COV-2'ye karşı antiviral aktivite gösterir (106).

2.6. Akrepler ve Akreplerden Alınan Zehirlere Genel Bir Bakış

2.6.1. Toksin, Zehir

Toksinler, maruz kalan organizmanın metabolik yolları üzerinde çeşitli biyolojik etkilere sahip olan canlı organizmalarda üretilen biyomoleküller veya kısaca biyolojik sistemlerden kaynaklanan zehirli maddelerdir. Toksinler, yaşamın tüm alanlarına ait çok sayıda organizmada evrimleşmiştir. İlkel bakterilerden daha yüksek ökaryotik organizmalara kadar çok çeşitli türler toksin üretir. Toksinler ya bir savunma mekanizması ya da bir av stratejisi olarak kullanılabilir (107). Daha önce de belirtildiği gibi, tüm toksinler biyolojik kaynaklardan kaynaklanmaktadır. Toksinler, farklı parametrelere ve özelliklere göre gruplara ayrılabilir.

Kabul edilen birçok sınıflandırma, toksinleri yapı açısından peptit olmayan toksinler ve peptit toksinler olarak ele alır. Mikrobiyal türler, bitkiler ve mantarlar peptit olmayan toksinlerin ana rezervidir. Genellikle peptit toksinlerinden oluşan karmaşık hayvan zehirleri karışımının en büyük kısmı oral olarak aktiftirler ve yutulduğunda zehir görevi görürler. Bu karmaşık karışım, bir ısırık, sokma veya herhangi bir özel aparat aracılığıyla deri altı, intradermal veya intravenöz yollarla av veya tehde enjekte edilir. Öte yandan, özel bir zehir bezi ve toksinlerini enjekte etmek için bir aparat ile evrimleşen organizmalar zehirli olarak sınıflandırılır.

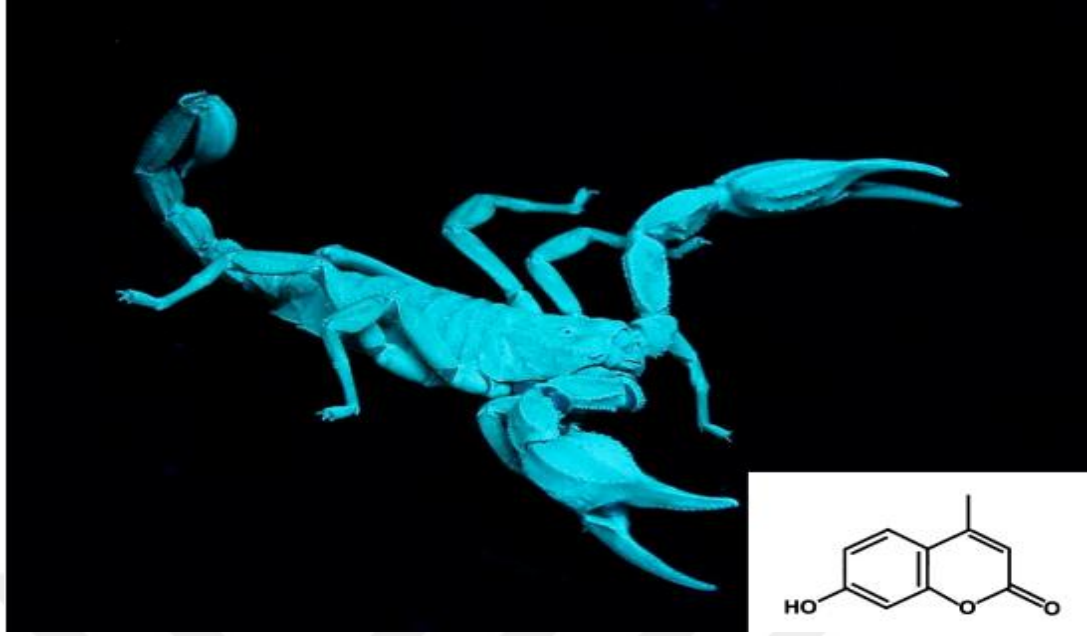
Tüm zehirli organizmalar Animalialar altında sınıflandırılır, bu nedenle genellikle zehirli hayvanlar olarak adlandırılır. Zehirli türlerden kaynaklanan toksinler, sergiledikleri belirsiz biyoaktif özellikleri taramak için önemli doğal kaynaklardır (107).

2.6.2. Akreplerin Biyolojisi ve Dağılımı

Akrepler, Antarktika hariç kıtalar üzerinde farklı habitatlara adapte olmuş, dünya çapında on dört aileden ve tanımlanmış 1700'den fazla türden oluşur (108). Bu hayvan düzenine çöl, bozkır, orman, dağ ve hatta izole mağara ekosistemlerinde rastlanabilir. Tüm akrepler gececi ve etoburdur.

Akreplerin gövdesi iki parçaya ayrılır: prosoma ve opisthosoma, burada opisthosoma ayrıca mesosoma ve metasoma'ya ayrılır. Bu kısımlar sırasıyla sefalotoraks, karın ve kuyruğu içerir. Akreplerin sekiz bacağı ve şeliped adı verilen bir çift kısıkaçları vardır. Bir eklembacaklı olarak akreplerin açık dolaşım sistemi vardır ve solunum, soluk borusu yerine kitap akciğerleri yoluyla sağlanır. Döllenen yumurtalar, onları doğurmak için dişi akrepler tarafından taşınır. Dişi akreplerin sırtlarında yeni doğan akrepleri taşıdığı bilinmektedir. Bu taşıma işlemi, gençler bir çift tüy dökümü geçirene kadar devam edebilir (109, 110). Anneden yavruya bu özen, eklem bacaklılarda nadirdir.

Soğukkanlı bir hayvan olan akrepler, soğuk mevsimde genellikle hareketsizdir. İlginç bir şekilde, akreplerin kütikülünde bulunan organik bir bileşik, yakın UV spektrumunda uyarma üzerine dış iskeletin yeşilimsi aydınlanmasına neden olur. Bu bileşik, daha önce sadece bitki kaynaklarından bilinen bir kumarin türevidir, hymekromon (veya 4-metil-7-hidroksi-kumarin)'dir (109, 110). Bu özellik tüm akrep türlerinde mevcuttur, ancak ilk dönem yavruları ve yeni tüy dökmüş akrepler floresan göstermezler. Denizden karaya geçişleri sırasında güneşten korunma için bir gelişme olarak varsayılmıştır. Bu onlara UV'ye maruz kalma nedeniyle DNA hasarını önlemek için bir avantaj sağlayabilir. Akreplerin UV altında aydınlatılması bizim yararımıza, gece arazi çalışmaları sırasında örneklerin toplanmasını kolaylaştırır (109, 110).



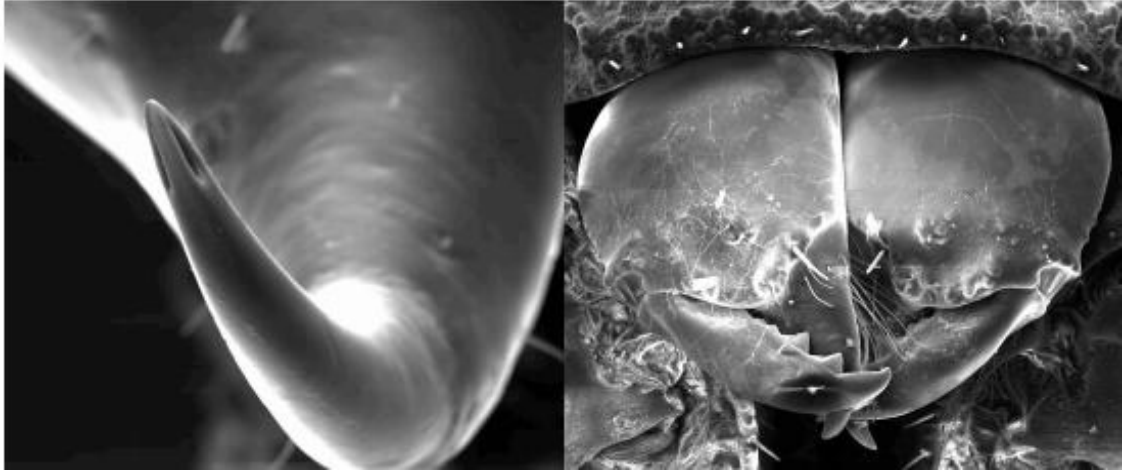
Şekil 2.7. UV ile aydınlatılmış *P. Kraepelini* akrebi. 4-metil-7-hidroksi-kumarin molekülü (küçük resim) (111).

2.6.2. Akrep Morfolojisi

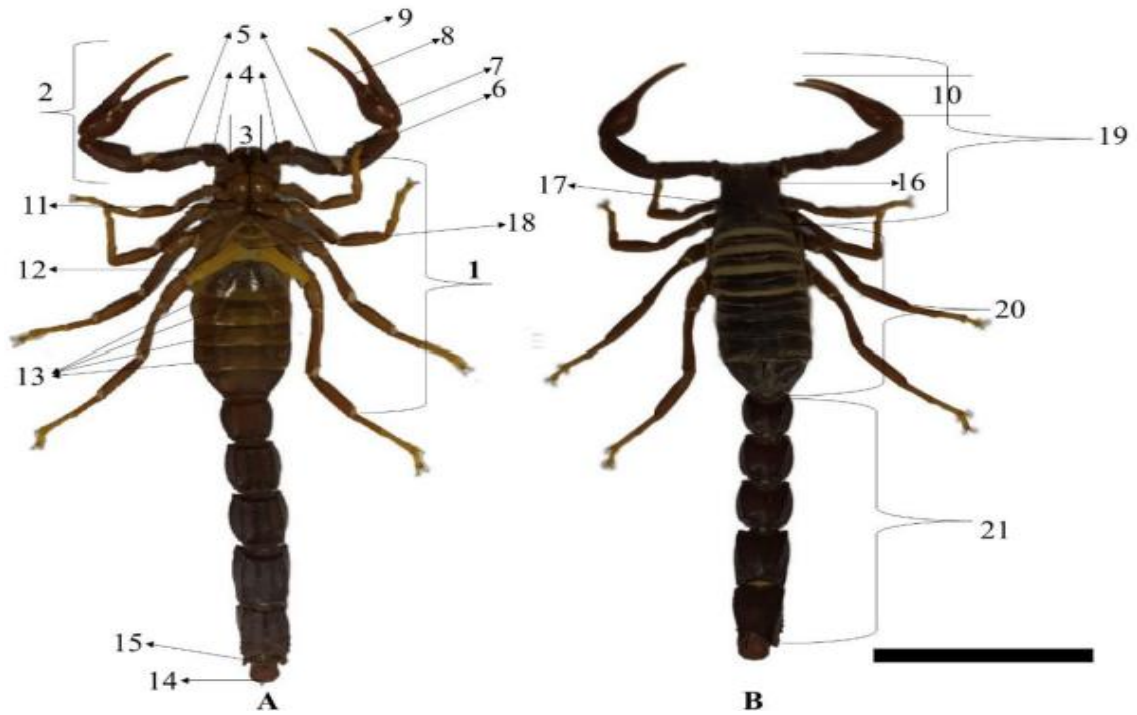
Arachnida sınıfı filogenetik olarak Arthropoda filumuna ve Chelicerata alt filumuna aittir. Şu anda yaşayan araknidler yaklaşık dört yüz milyon yıl önce evrimleşmiş ve deniz ekosistemlerinden kaynaklanmıştır. Araknidler, sekiz bacaklı anatomileri ve chelicerae olarak adlandırılan ayırt edilebilir ağız parçaları ile böceklerden kolaylıkla ayırt edilebilirler.

Akrelerin telsonda, distal metazomada zehir bezleri vardır ve Bir akrebin sokması üzerindeki zehir kanalının ve keliserin morfolojisi Şekil 2.9'da görülebilir.

Akrep, yaklaşık 1-20 cm arasında değişen bir boyuta sahiptir ve segmentli morfolojisi ile karakterizedir. Akrep 3 bölümden oluşur: baş (avın hareketsizleştirilmesi, savunma ve duysal amaçlar için bir çift şela ile prosoma) ; Karın (mezosoma, her iki tarafta 4 bacaklı) ; Kuyruk (zehir salgılanması için telson ve aculeus ile metazoma) (Şekil 2.10). Telsonda bir kas septumu ile ayrılmış bir çift zehir bezi bulunur. Her bezin katlanmış glandüler epitel ile çevrili kıvrımlı bir lümeni vardır. Stimülasyon üzerine kas kasılacak ve lümende depolanan zehir akuleus yoluyla dışarı atılacaktır.



Şekil 2.8. Akrep telson ve keliserin elektron mikroskop altında morfolojik görüntüsü(<https://merlab.metu.edu.tr/>).



Şekil 2.9. *Androctonus crassicauda* akrebinin genel morfolojisi (112).

1.Yürüme bacakları 2.Pedipalp 3. Keliser 4.Trochanter 5. Femur 6. Tibia 7. Manus 8. Sabit parmak 9. Hareketli parmak 10. Chela 11. Sternum 12. Pecten 13.Stigma 14. Telson 15. Anal açıklık 16. Lateral gözler 17. Median gözler 18. Genital operculum 19. Prosoma 20. Mesosoma 21. Metasoma (ölçek: 3cm) ifade etmektedir.

2.7. Akrep Zehirleri

Araknid zehirleri, karmaşık zehir karışımları birçok peptit toksini içerdiğinden, eklembacaklılar arasında en zengin biyoaktif peptit kütüphanelerinden biri olarak kabul edilir (113). Örümceklerin ve akrelerin zehirleri esas olarak inorganik tuzları, amino asitleri, nükleotidleri, biyojenik aminler, poliaminler, peptitler ve proteinler gibi küçük organik molekülleri içerir (114, 115). Zehrin büyük bölümünü peptit yapıdaki nörotoksinler oluşturur ve akrep zehrinde yüzden fazla farklı peptit bulunabilir (116). Araknid zehirlerinin peptit nörotoksinleri, hedef iyon kanallarına göre dört gruba ayrılır. Bu gruplar Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Cl^- kanal inhibitörleridir (117).

Dört yüz milyon yıllık evrimsel süreç boyunca, örümcek zehirlerinin nörotoksinleri, onları oldukça güçlü iyon kanalı blokerleri yapan hedef iyon kanallarına karşı mükemmel bir afinite ve özgüllük kazanmıştır (118). İyon kanalı inhibitörü nörotoksinlerin yanı sıra, araknid zehirleri, çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkiler sergileyen kısa polipeptitler de içerir. Araknidlerin beslenmesi esas olarak böcekleri içerdiğinden, insektisidal aktiviteye sahip peptitlerin varlığı gerçekten şaşırtıcı değildir (119). Bu nedenle, araknid zehirleri, biyoaktif peptit taraması için harika bir doğal kaynaktır. Olağanüstü işlevsellikleri ve yapıları nedeniyle venomik peptit toksinleri, yeni terapötik ve tanısal yaklaşımlar geliştirmek için paha biçilmez platformlar sunar (120).

Akrep zehri kompleks bir karışımdan oluşmaktadır. Bu sıvı karışım; mukus, inorganik tuzlar, düşük molekül ağırlıklı organik moleküller, enzimler, nükleotidler, aminler ve nörotoksik peptidler olarak adlandırılan birçok küçük proteinleri içermektedir. Bunların yanı sıra sitolitik peptidler, tripsin inhibitör benzeri peptidler, lizozimler, bradikinin güçlendirici benzeri peptid ve anyonik peptidlerde akrep venomlarında bulunmaktadır (121-123).

Zehrin bileşenlerinin protein kökenli olduğu 1950'li yıllerin ortasında anlaşılmıştır. Gelişen protein ayırma teknikleri ile yaklaşık 10 yıl sonra da ilk nörotoksin izole edilebilmiştir (124). Bugüne kadar akrep venomlarından saflaştırılan peptidlerle birçok biyokimyasal ve moleküler çalışmalar yapılmıştır. Farklı akrep türlerinin venom peptidlerinden; insektisit, analjezik (125, 126), anti-epileptik (127), anti-malaryal ve anti-mikrobiyal (128-131), anti-bakteriyal (132) etkiye sahip olan

farmakolojik bileşenler izole edilmiştir. Araknid zehirlerinde olduğu gibi, akrep zehirinin çoğunluğu peptitlerden oluşur. Bu peptitler iki grupta değerlendirilebilir: disülfid köprüleri olan peptitler ve disülfid köprüleri olmayan peptitler (disülfid köprüsü olmayan peptitler, NDBP'ler).

Disülfid köprüsü peptitler, nörotoksinler olarak görev yapan Na^+ , K^+ , Ca^{2+} veya Cl^- iyon kanal inhibitörleri olan sistein açısından zengin katyonik peptitlerdir. Bunlar ayrıca yapısal olarak iki gruba ayrılabilir: kısa zincirli nörotoksinler ve uzun zincirli nörotoksinler. Kısa zincirli nörotoksinler yaklaşık 3 kDa ila 5 kDa'dır, burada uzun zincirli nörotoksinlerin moleküler ağırlığı 6-8 kDa'dır.

Kısa zincirli nörotoksinler, potasyum iyon kanalı akış modülatörlerini içerirken, uzun zincirli nörotoksinler, hücre zarlarından sodyum iyon akışının modülatörlerini içerir. Peptit kütlelerinin bu iki modlu dağılımı, akrep zehirlerinin de olduğu gibi, eklem bacaklı zehirinin bir özelliğidir. Kısa zincirli nörotoksinler, inhibitör sistein düğümü (ICK) olarak adlandırılan ortak bir yapısal motifi paylaşır. ICK motifi, bu peptitlerin düşük pH, yüksek sıcaklıklar ve hatta proteaz saldırılarına karşı önemli ölçüde dirençli olduğu peptidik yapıyı oldukça güçlendirir (133, 134). Bu nedenle, peptitleri içeren ICK motifinin yapısal kararlılığı, doğal polipeptit molekülleri arasında benzersizdir. Öte yandan, akrep zehirlerinde disülfid köprüsü olmayan peptitler nispeten yakın zamanda tespit edilmiştir. Bu peptitler genellikle 1-5 kDa arasında bir moleküler ağırlığa sahiptir, ancak çoğunlukla 1-3 kDa'ya kadar birikmiştir. NDBP'lerin antimikrobiyal, immünomodülatör, Bradykinin güçlendirici ve hemolitik aktiviteler sergilediği gösterilmiştir (135).

Küçük peptitler (<10 kDa), akrep zehirlerinde zehirlenmeden sorumlu olduğuna inanılan ve biyomedikal ve bilimsel uygulamalar için geniş çapta araştırılan en önemli bileşenlerdir. Peptitlerin çoğu, uyarılabilir hücrelerin (ör. nöronlar) iyon kanallarını hedefleyip modifiye ettiğinden, genellikle nörotoksinler olarak kabul edilirler, bu da onları sinirbilimde iyon kanalı araştırmaları için değerli araçlar haline getirir.

2.8. Akrep Zehir Toksinlerinin Sınıflandırılması

Akrep venomunda, uyarılabilen ya da uyarılamayan iyon kanal fonksiyonlarını etkileyen; çoğunun toksik olduğu bilinen 100.000 farklı peptid

bulundurmaktadır. Bugüne kadar akrep toksinlerinin yaklaşık 400 kadarının birincil yapıları tanımlanmıştır. Bu rakam olası farklı peptidlerin sayısının % 4'ünü oluşturmaktadır (136, 137).

Akreplerde bulunan peptid toksinlerinin farklı özelliklerine göre sınıflandırıldığı bilinmektedir. Moleküler boyutlarına göre, uzun zincirli toksinler ve kısa zincirli toksinler olarak ayrılmaktadırlar. Genel olarak kısa zincirli peptidler 22-47 aminoasit uzunluğunda iken, uzun zincirli peptidler 60-76 aminoasit uzunluğundadır. Farklı hayvanlar üzerindeki aktivitelerine göre, memeli özgül toksinler, böceklere (insekt) özgül toksinler ve kabuklulara (crustacea) özgül toksinler; mekanizmalarına göre, nörotoksinler ve sitotoksinler; disülfid köprüsü içeren toksinler ve disülfid köprüsü içermeyen toksinler olarak sınıflandırılmaktadır (138). Disülfid köprüsü içermeyen akrep zehir toksinleri biyoaktif peptidlerin geliştiği önemli bir sınıftır (139).

2.8.1. Akrep Zehirlerinden T Kaynaklı Sodyum Kanalı Toksinleri (NaScTx's)

Akrep Na^+ kanal toksinleri (NaScTx'ler), dört disülfid köprüsü ile sıkı bir şekilde bağlanmış, uzunluk olarak (6.5-8.5 kDa) 60-76 amino asit kalıntısından oluşan polipeptitlerdir (140).

Mevcut veri tabanı, “World Wide Web: Scorpion”da bulunabilen yaklaşık 200 varsayılan NaScTx dizisini kapsar (117). Bu toksinler için en yaygın olarak kullanılan sınıflandırma bağlanma ve yer değiştirme çalıştırmalarına göre yapılmaktadır. Memelilere ve böceklere karşı toksiklerdir. Memeliler için özgül nörotoksinlerdir.

Na^+ kanalı bir α alt birimi ve iki β alt birimi içerdiğinden, Na^+ toksinleri iki kategoriye ayrılır: bağlanma bölgelerine ve fizyolojik etkilere göre α - NaScTx's ve β - NaScTx's.

α -NaScTx'ler voltaja bağlı bir modda reseptör sitesi 3'e (a alt birimindeki bir alan) bağlanır ve sodyum kanalının hızlı inaktivasyon sürecini engeller (141).

β -NaScTx'ler voltajdan bağımsız olarak reseptör bölgesi 4'e (β 1 alt birimindeki bir alan) bağlanır ve kanal aktivasyon eşliğini daha hiperpolarize bir membran potansiyeline kaydırır (141).

2.8.2. Akrep Zehirlerinden Potasyum Kanalı Toksinleri (KTxs)

K^+ kanal toksinleri 20-70 aminoasit ve 3 disülfid köprüsü içerirler. K^+ kanallarını bloke eden toksik peptidlerdir. Bu peptidler, kanalın dış girişine bağlanmakta ve kanalı tıkayarak iyon iletimini engellemektedirler. Uyarılabilir ve uyarılamayan hücrelerdeki K^+ geçirgenliğini bloke eden ya da değiştiren akrep venomlarından elde edilen günümüzde bilinen yaklaşık 140 peptit bulunmaktadır (142, 143).

Bu peptidlerin tümü disülfid bağları ile bir α -heliks bölgesine bağlı üç anti-paralel beta dizisi içeren biçimdedir. En iyi tanımlanmış olan peptidler (ChTX, IbTX ve AgTX) voltaja bağlı K^+ kanalları ya da Ca^{+2} ile aktive edilmiş K^+ kanallarının Kv1 ailesinin üyeleri ile etkileşirler. İlk olarak tanımlanan K^+ kanalları için özgül toksin *Centruroides noxius* akrep venomundaki Noksiustoksin (NTX) dir (144).

Akrep zehirleri, çeşitli K^+ kanallarını bloke eden zengin potasyum kanalı toksinleri (KTxs) kaynaklarıdır; KTxs'ler yapısal olarak dört aileye ayrılır: α -, β -, γ ve κ -KTxs'ler, bunların çoğu korunmuş bir sistein stabilize α -sarmal ve β -levha yapısal motifi (CS $\alpha\beta$) paylaşır (142, 145).

α -KTxs ailesi, α -KTxs1-26 olarak adlandırılan 26 alt aileye düşen yaklaşık 140 peptit ile sayıca en büyük olarak kabul edilir ve sürekli olarak yeni peptitler açıklanır (146). Bu peptitler, 3 veya 4 disülfid köprüsü ile 23-42 amino asit kalıntısından oluşur. Bu toksin ailesi, voltaj kapılı potasyum kanallarının önemli blokerleridir ve Kv kanal yapısı-fonksiyonu ve Kv ile ilgili kanalopati çalışmalarında çok dikkat çekmektedir (147).

β -KTxs'ler, 50-75 amino asit kalıntısı olan uzun zincirli peptitlerdir. γ - KTxs ler, hücre döngüsü ve birkaç kanserin proliferasyonu ile ilişkili olan, esas olarak hERG kanallarını hedefleyen yeni ilginç kısa zincirli peptitlerdir (148, 149).

κ -KTxs toksinleri, *Heterometrus fulvipes* akrep zehirinden izole edilen iyi bilinen κ -Hefutoksin ile temsil edilen iki disülfid köprüsü CS $\alpha\alpha$ ile bağlanan iki paralel α -helis ile karakterize edilir (150).

2.8.3. Kalsiyum ve Klor Kanal Toksinleri

Cl⁻ kanal toksinleri düşük moleköl ağırlıklı polipeptidlerdir, 35-38 aminoasit ve 4 disülfid köprüsü içerirler. Bugüne kadar Cl⁻ kanalına etkili pek çok akrep venom toksinleri ve toksin benzeri peptidler belirlenmiştir. Bunlardan en dikkat çekici olanlarından biri akrebinin ham venomundan (*L. quinquestriatus*) saflaştırılan “chlorotoxin” dir. Klorotoksin fare epitelindeki Cl⁻ kanallarını bloke edebilir ve özellikle glia hücrelerinde patolojik değişikliklerle Cl⁻ kanallarına bağlanabilir yapıdadır (139, 151). Ca⁺² kanal toksinleri, temelde 33 aminoasitve 3 disülfid köprüsü içerirler.

NaScTxs ve KTxs'den farklı olarak, kalsiyum ve klorür kanallarını hedefleyen akrep zehiri peptitleri çok az bilinir ve değişken amino asit uzunluklarına sahiptir (136).

Pandinus imperator akrep zehirinden saflaştırılan imperatoksin A (IpTxa), ryanodin reseptörüne (RyR, bir tür ligandla aktive olan kalsiyum kanalları) yüksek afiniteye sahip olduğu bildirilen ilk peptittir. IpTxa, [³H] ryanodin bağlanmasını artırır ve sarkoplazmik retikulumdan hızlı bir kalsiyum salınımını indükler (152). Daha sonra, Maurocalcin, Hemicalcin ve Hadrucalcin dahil olmak üzere diğer akrep zehirlerinden birkaç IpTxa benzeri peptit tanımlandı (114).

Akrep *Parabuthus transvaalicus*'un zehirinden elde edilen 63 amino asitlik bir peptit olan Kurtoksin'in, başlangıçta, T tipi voltaj kapılı kalsiyum kanallarına (Cav3.x) yüksek afinite ile bağlandığı gösterilmiştir. Daha sonra, merkezi ve periferik nöronlarda T-, L-, N- ve P tipi Cv kanalları ile de etkileşime girebildiği bulunmuştur (153, 154).

Şimdiye kadar klorür kanallarını hedefleyen bazı küçük peptitler tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. *Leiurus quinquestriatus* akrep zehrinden saflaştırılan 36 amino asitlik küçük bir peptit olan klorotoksin (CTX/CITx), başlangıçta küçük böcekler için paralitik bir ajan olarak işlev gören bir klorür kanal blokeri olarak tanımlandı (155). Bu toksinin dikkate değer bir bulgusu ve uygulaması, CTX'in glioma hücreleri üzerindeki klorür kanalına spesifik olarak bağlanabilmesi ve glioma ilerlemesini engelleyebilmesidir (156). Yüksek afinitesi, özgüllüğü ve düşük toksisitesi nedeniyle CTX, gliomalar için görüntüleme ve hedefe yönelik tedaviler

için umut verici bir ajan olarak kabul edilir. Akrep zehirlerinden kaynaklanan diğer klorür kanalı inhibitörleri arasında *Mesobuthus martensi* kaynaklı BmKCT, *Buthus indicus* kaynaklı Klorotoksin benzeri peptit Bs 14, *Parabuthus schlechteri* kaynaklı Toksin PBITx1 yer alır (142, 157, 158).

2.8.4. Disülfid Köprüleri Olmayan Akrep Zehri Peptitleri

Birçok araştırmacı gerçekleştirmiş olduğu çalışmalarla hayvan zehirlerinden çeşitli enzimler tuzlar ve toksik biyobileşenler tespit etmişlerdir (159). Asetilkolinesteraz, hyaluronidaz gibi enzimler zehirlerde bulunmaktadır (160).

Disülfid köprülü iyon kanalı hedefli peptitlerin yanı sıra, akrep zehirlerinde bir dizi disülfid köprülü olmayan peptit (NDBP'ler) vardır (161). Bu peptitler hem yapı hem de biyoaktivite bakımından yüksek çeşitlilik gösterir.

Bugüne kadar 40'tan fazla akrep zehiri NDBP'si izole edilmiş ve işlevsel olarak tanımlanmıştır. NDBP'lerin çoğunluğu bakteri, maya, mantar ve virüslere karşı bir tahta aktivite spektrumuna sahip antimikrobiyal peptitlerdir (162).

Hadrurus aztecus'tan izole edilen 41 amino asitlik bir peptit olan Hadruin, düşük mikromolar konsantrasyonda (10-50 uM) hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösteren ilk kişidir (129). Akrep *Lychnas mucronatus*'tan modifiye edilmiş bir antimikrobiyal peptit olan Mucroporin-M1'in antibiyotiğe dirençli patojenlere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (163). Bir başka küçük NDBP grubu, bradikinin güçlendirici peptitler (Bpps) olarak adlandırılanlardır. Bradikinin, bir enzim tarafından inaktive edilebilen kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynayan vazoaktif bir peptittir, anjiyotensin dönüştürücü enzim ve Bpp'ler bu enzimin inhibitörleridir. *Tityus serrulatus*'tan T peptidleri, *Buthus occitanus*'tan K-12 ve *Mesobuthus martensi* Karsch'tan BmKbpp bu gruba örnektir (161).

2.8.5. Yüksek Moleküler Ağırlıklı Enzimler

Akrep zehirlerindeki düşük molekül ağırlıklı proteinler, esas olarak, zehir sitotoksitesine katkıda bulunduğuna veya zehirlenme sürecini güçlendirdiğine inanılan çeşitli enzimlerdir. Bu nedenle, bu enzimlerin yapılarının ve işlevlerinin iyi

anlaşılması, anti-zehir stratejisi için yararlıdır. Örümcek ve yılan zehirlerinin aksine, akrep zehirleri düşük seviyede enzimatik aktivite sergiler (164).

Akrep zehirlerinde bulunan enzimler arasında hiyaluronidaz, fosfolipaz A2, L-amino asit oksidaz ve proteazlar bulunur (165).

Hiyaluronidaz:

Hyaluronidaz yılan, arı, örümcek ve akrep gibi çeşitli zehirli türlerde bulunabilir (166). Hyaluronidazlar yüksek toksik etki göstermemelerine rağmen ısırılan dokuda zehrin emilim ve taşınımını hızla arttırarak zehrin diğer doku ve hücrelere yayılımını hızlandıran enzimlerdir (167).

Bu enzim, kan damarlarının etrafındaki yumuşak bağ dokularında bulunan hücre dışı bir matris proteini olan hyaluronan'ı parçalayabilir ve toksinlerin difüzyonunu artırabilir (168).

Hyaluronidase, birkaç akrep zehirinden, örneğin *Heterometrus fulvipes*, *Tityus serrulatus* ve *Palamneus gravimanus*'tan saflaştırılmıştır. *Mesobuthus martensi*'den izole edilen bir hiyaluronidaz BmHYA1'in, hyaluronan'ı çıkardığı ve MDA-MB-231 meme kanseri hücresinde CD44 varyantının ekspresyonunu modüle ettiği gösterilmiştir (169).

Palanmeus gravimonus akrep türü kullanılarak yapılan bir çalışmada zehirde hyaluronidaz aktivitesi olduğu tespit edilmiştir (170).

Başka bir çalışmada *Tityus serrulatus* türü akrep zehrinden Tityustoxin-I (TsTX1) adı verilen hyaluronidaz enzimi başarı ile saflaştırılmıştır. Tityustoxin-I kreatin kinaz (CK), laktat dehidrojenaz (LD), aspartat aminotransferaz (AST) gibi intrasellüler enzimlerin kanda salınımı arttırmakta ve bu enzimlerin artışına bağlı olarak bağlı olarak dokularda lokal harabiyete, kalp yetmezliğine ve pulmoner ödeme neden olmaktadır (171). Yapılan klinik çalışmalara göre vücutta emilim ve difüzyonu arttıran topikal hyaluronidazların, antitümör ilaçlarıyla birlikte kullanımı terapötik etkiyi arttırdığı bilinmektedir.

Fosfolipazlar A₂ (PLA₂):

Fosfolipazlar; farmakolojik ve biyolojik fonksiyonlarının yanı sıra inflamatuvar yanıt, kan trombosit agregasyonu, nörotoksisite, kardiyotoksisite ve iyon kanalı bloklama fonksiyonlarında da görev alırlar (172).

Fosfolipazlar A₂ (PLA₂), fosfolipidlerin ester bağlarını lizofosfolipid, yağ asitleri ve diğerlerine hidrolize eden bir enzim grubudur (173). PLA₂ 4 alt aileye ayrılabilir: salgılayıcı PLA₂ (sPLA₂), sitozolik PLA₂ (cPLA₂), kalsiyumdan bağımsız PLA₂ (iPLA₂) ve lipoprotein PLA₂ (LpPLA₂) (174). Akrep zehirlerinde tanımlanan tüm PLA₂'ler, düşük moleküler ağırlığa sahip (13-15 kDa) sPLA₂'ye aittir ve akrep eylemi sırasında doku yıkımı ve iltihaplanmada rol oynar (175).

Afrika akrebi *Pandinus imperator* zehrinden Imperatoxin I ve Phospholipin, odun akrebinden (*Androctonus phaiodactylus*) Phaiodactylipin ve *Heterometrus laoticus* akrep zehrinden Heteromtoksin gibi birkaç akrep sPLA₂ tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (176, 177). Bu enzimler, pıhtılaşma önleyici ve bakteri önleyici faaliyetler gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik potansiyellere sahiptir (178).

Proteazlar:

Proteolitik enzimler birçok araştırma sonucu çok çeşitli fizyolojik aktiviteleri olduğu kanıtlanmıştır.

Proteazların sindirim aşamalarında, kanın pıhtılaşmasında ve fibrinolizisinde biyoaktif peptidlerin salınımını, hasarlı dokuların yenilenmesi, nekrozu ve ödem oluşumu gibi birçok mekanizmayı indüklediği iyi bilinmektedir (179).

Proteazlar, toksinlerin translasyon sonrası işlenmesinde yer alan ve matriks proteinlerinin bozunması yoluyla toksinlerin yayılmasını destekleyen zehirlerdeki önemli proteinlerdir (180). Akrep zehir bezlerinde bulunan proteazlar oldukça yakın zamanda proteomik ve transkriptome çalışmaları yardımıyla rapor edilmiştir.

Akrep zehirlerinde iki ana proteaz türü tanımlanmıştır: serin proteazlar ve metalloproteazlar (181). Akrep zehrinden saflaştırılan ilk metalloproteaz, vezikülle ilişkili zar proteinleri 2 ve 8'i (VAMP2 ve VAMP8) parçalayan Brezilya akrebi *Tityus serrulatus*'tan antareaz olarak adlandırılmıştır (182). Çin kırmızı akrebi

Mesobuthus martensi'den de serin proteaz benzeri bir protein (BMK-CBP) izole edildi (183).

Çalışkan ve arkadaşları *Androctonus crassicauda* akrep türünden birtakım enzim çalışmaları yapmışlardır. Çalışma sonucunda peptid fraksiyonunda serin metalloproteaz belirlenmiştir. Proteolitik enzimler sınıfına dahil olan serin metalloproteaz akrep tarafından sokulmuş kişilerde zehrin yayılmasına yardımcı olduğu ve doku geçirgenliğini arttırdığı bilinmektedir. Akrep zehrinde bulunan proteolitik enzimlerin ısırılan kişinin vücudunda tripsinojenin in pankreatik aktivasyonu, nekroz ve akut solunum yolu sendromuna neden olduğu daha önce bildirilmiştir (179).

L-amino asit oksidazlar (LAAOs):

L-amino asit oksidazlar (LAAO'lar), L-amino asit substratlarının oksidatif deaminasyonunu katalize eden ve karşılık gelen α -keto asitleri, hidrojen peroksit ve amonyak oluşturan bir grup flavoenzimdir (184). LAAO'lar, bakteriler, mantarlar, deniz yosunları ve yılan zehirleri dahil olmak üzere doğada yaygın olarak bulunabilir. Normalde, LAAO'lar homodimeriktir, moleküler ağırlık aralığı 110-150 kDa olan %3-4 karbonhidratlı FAD bağlayıcı glikoproteinlerdir. Bununla birlikte, deglikosilasyonun, çeşitli yılan zehirlerinden elde edilen LAAO'ların enzimatik aktiviteleri üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Yılan zehirleri, zehirlerin sarımsı renginden sorumlu olan LAAO'ların en zengin kaynağıdır (185).

Son zamanlarda, LAAO'lar, anti-mikrobiyal, anti-HIV, anti-pıhtılaştırıcı, apoptoz indükleyici, ödem indükleyici ve hemorajik aktiviteler gibi multibiyolojik aktivitelere sahip oldukları için biyotıpta bir araştırma konusu haline geldi (186). İlginç bir şekilde, *B. moojeni*, *Bothrops atrox* ve *Trimeresurus jerdonii* kaynaklı LAAO'lar gibi bazı yılan zehiri LAAO'lar trombosit agregasyonunu indükleyebilir.

LAAO'ların kanser araştırmalarında uygulanması, LAAO enzimatik reaksiyonundan üretilen H_2O_2 'nin sitotoksik etkilerini uygulayarak yeni bir başka bilimsel girişimdir. Yılan zehirlerinden elde edilen LAAO'ların çalışmalarda veya hayvan deneylerinde kanser proliferasyonunu inhibe ettiği ve kanser hücreleri apoptozunu indüklediği bulundu.

2.9. Türkiye’de Yaşayan Akrepler

Son kayıtlara göre Türkiye’de dört familya ve on üç cins altında yirmi sekiz akrep türü bulunmaktadır (187, 188).

Sırasıyla bu dört familya *Buthidae*, *Scorpionidae*, *Iuridae* ve *Euscorpiidae*’dir. *Buthidae* familyası yedi cins tarafından sınıflandırılır: *Androctonus*, *Buthacus*, *Compsobuthus*, *Hottentotta*, *Leiurus*, *Mesobuthus* ve *Orthochirus*.

Androctonus crassicauda akrebinin taksonomik sınıflandırması aşağıdaki gibidir (189).

Sınıf	:Arachnida
Takım	:Scorpiones
Alt takım	:Neoscorpionina
İnfracım	:Orthosterni
Üst familya	:Buthoidea
Familya	:Buthidae
Cins	:Androctonus
Tür	:A. Crassicauda

2.10. Türkiye’de Akrep Zehri Araştırmalarının Mevcut Durumu

Türkiye’nin zengin ve farklı akrep faunasının yanı sıra günümüze kadar çok azının zehri karakterize edilmiştir. Halk Sağlığı Enstitüsü akrep zehri araştırmalarının yapıldığı ana kurumdur ve devlet tarafından desteklenmektedir (187). Üç buthid türünün tam biyokimyasal karakterizasyonu, son on yılda bir zehir yaklaşımla sağlandı. Bunlar kronolojik olarak *A. crassicauda*, *B. macrocentrus* ve *M. gibbosus*’tur. *A. crassicauda* türleri üzerinde yapılan zehir karakterizasyon çalışmaları, Acra1 ila Acra8 adlı sekiz benzersiz uzun zincirli peptit tanımlamıştır (187, 190-192).

B. macrocentrus’un zehri de karakterize edildi ve 65 amino asit memeliye özgü Na⁺ kanalı α -toksin Bu1’in keşfedilmesini sağladı. MegTx1, MegTx2 ve MegTx3 adlı üç yeni α -KTx tipi K⁺ kanal inhibitörü, zehir bezinde eksprese edilen mRNA’lardan oluşturulan cDNA kitaplığının taranmasıyla akrep *M. gibbosus* zehirinden oluşturulmuştur. Bu toksinlerin sırasıyla farklı α -KTx aileleri α -KTx3.x, α -KTx9.x

ve α -KTx16.x'e ait olduğu gözlemlendi (146). Ayrıca *M. gibbosus* türünün Ege popülasyonundan bazı bireylerin zehir protein profili de belirlenmiştir (193).

2.11. Akrep Zehirlerinde Tanımlanmış Peptit Toksinleri ve Farmakolojik Etkileri, İlaç Adayı Olabilirler mi?

Günümüzde akrep venomları iyon kanalları yapı araştırmalarında ve aktivasyon/inhibasyon çalışmalarında, protein ilaç tasarımı, akrep zehirlenmelerine karşı antiserum üretiminde ve biyopestisid üretiminde kullanılmaktadır. Yeni toksin dizilimlerinin belirlenmesi, işlevlerinin ve yapısal niteliklerinin tanımlanması ile bilimsel araştırmalarda ve aynı zamanda tıbbi ve ticari uygulamalarda büyük ilgi görmektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda memelilere toksik olmayan akrep peptidlerinin tedavi amaçlı kullanımları araştırılmaktadır. Akrep toksinleri spesifiklikleri ve yüksek etkinlikleri nedeniyle iyon kanal fonksiyonunu gösteren çeşitli reseptör proteinlerin tanımlanması için kullanılan farmakolojik araçlardır (121).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda memelilere toksik olmayan akrep venom peptidlerinin tedavi amaçlı kullanımları araştırılmaktadır. *Buthus martensii* türün akrep venomunun malignant glioma kültür hücrelerinde iyon kanallarına etkileme yolu ile apoptosizi uyardığı belirlenmiştir (194).

UniProt veritabanına (UniProt) göre şimdiye kadar dokuz yüzden fazla akrep zehiri peptidi tanımlanmıştır. Peptidlerin; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antimalaryal, immünomodülatör, bradikinin güçlendirici, antitümöral ve otoimmünite baskılayıcı aktiviteler gösterdiği mevcutta bildirilmiştir.

Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), birçok canlıda bulunabilir. AMP'lerin bir zehirlerdeki AMP komponentinin rolü hala belirsizdir, ancak bunların büyük bir kısmı akrep zehirlerinden izole edilmiştir.

Günümüze kadar keşfedilen bazı AMP'ler; hadrurin, pandininler ve parabutopirin'dir.

Akrep zehirlerindeki AMP'lerin çoğu, temel olarak NDBP'ler grubuna sınıflandırılır. Bu peptitler genellikle çoklu dirençli patojenik suşlara karşı bile düşük minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri gösterir (108, 155, 195-197).

Bununla birlikte, zehirli antibakteriyel peptitlerin en büyük dezavantajı, memeli hücreleri üzerindeki yüksek sitotoksik ve hemolitik aktivitedir. Bu peptitler, bu fenomenin üstesinden gelmek için tasarlanmaya çalışılmaktadır.

Antibakteriyel aktivite gösteren NDBP'ler genellikle *Candida* türleri gibi patojenik mantar türlerinde de etkilidir. Örneğin; Pandinin2 ve parabutoporinin, mikromolar konsantrasyonlarda sırasıyla *Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae'nin* büyümesini engellediği gösterilmiştir. Akrep zehirlerinden karşı antimalaryal biyoaktif peptitlerde keşfedilmiştir (108, 155, 195-197).

Disülfid olmayan köprülü yapı motifini takip eden iki peptit, *Mesobuthus eupeus'un* zehir bezinden elde edilen cDNA kütüphanesinin taranmasıyla izole edildi. Meucin-24 ve meucin-25 adlı peptitler, *P. falciparum* enfeksiyonunu 10 uM dozda 72 saatte, konakçı hücrelere herhangi bir toksisite olmaksızın tamamen ortadan kaldırmaktadır. Öte yandan, antiviral aktiviteye sahip sınırlı sayıda venomik peptit ile karşılaşılmıştır.

Antiviral akrep zehiri peptidine bir örnek, *Heterometrus petersii'den* Hp1090 olabilir. Yine mikromolar konsantrasyonlarda, Hp1090'ın fosfolipid zarını bozarak Hepatit C virüsünün amplifikasyonunu engelleyebildiği gösterilmiştir. Akrep zehirlerinden elde edilen peptitler üzerinde yapılan birçok çalışmada, bunların immünomodülatör işlevleri vurgulanmıştır. Bu akrep zehiri peptitlerinin bazıları, proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını artırmak için immün sistemi uyarıcı ajanlar olarak işlev görür ve bazılarının, IL-10 gibi immünosupresan sitokinlerin salgılanmasını indüklediği gösterilmiştir (108, 155, 195-197).

Tityus serrulatus, TsV'den izole edilen bir peptit, tamamlayıcı sistemi aktive etmenin yanı sıra Toll benzeri reseptörler TLR2 ve TLR4 ile etkileşime girerek NF- κ B yolunun aktivasyonu ile sonuçlanır.

Bradikinin, endojen olarak eksprese edilen ve kan basıncını düşürmede önemli bir role sahip olan bir vazodilatör peptittir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), Bradikinin aktivitesini keser ve inaktive eder, böylece hipertansiyon tedavisi için önemli bir hedeftir.

Buthus occitanus'un zehirinden izole edilen K₁₂ peptidi, ACE'yi doğrudan inhibe ederek Bradikinin güçlendirici aktivite gösterir. Akrep toksinlerinden gelen diğer peptitlerin, Bradikinin aktivitesini güçlendirdiği belirlendi, ancak bunlar

doğrudan ACE üzerinde etkili olmayıp ve muhtemel olarak endotelial fonksiyon üzerinde hareket etmektedirler (108, 155, 195-197).

Kv1.3 iyon kanalları, T hücre proliferasyonu ve aktivasyonunda birincil rolü üstlenir. Akrep zehirleri, Kv iyon kanalı inhibitörü peptidler açısından zengin olduklarından, otoimmün bozukluklar ve lenfoproliferatif hastalıklar için ilaç geliştirilmesinde paha biçilmez kaynaklardır.

Centruroides margaritatus kaynaklı margatoksin ve *Leiurus quinquestriatus*'un charybdotoxin'i, Kv1.3 inhibitörü venomik peptitlerin iyi bilinen örnekleridir. Antikanser etkisi olan belki de en ilginç akrep zehiri peptidi *L. quinquestriatus*'tan elde edilen klorotoksindir (108, 155, 195-197).

Klorotoksinin başlangıçta sadece küçük iletkenli Cl⁻ kanallarının inhibitörü olduğu düşünülmüş fakat bununla birlikte, daha fazla araştırma yapılarak matris metalloproteinaz-2'yi (MMP-2) bağlama konusundaki benzersiz kapasitesi tanımlanmıştır. Bununla, klorotoksin, in vitro olarak glioma hücrelerinin metastazını inhibe edebilir ve daha da ilginç, klorotoksin-MMP-2 etkileşimi glioma hücrelerine özgü olup sağlıklı nöronlara veya glial hücrelerde görülmemektedir. Bu özel etkileşim sayesinde, floresan boya konjuge klorotoksin, tümör yükünün dağılımını doğrulamak için cerrahlar adına bir tanı aracı olarak kullanılabilecek duruma gelmektedir (108, 155, 195-197).

Terapötik ve tanısal yaklaşımların bir parçası olarak venomik peptitlerin kullanımına ilişkin bahsedilen örnekler, akrep zehirlerinin önemini ve potansiyelini vurgulamaktadır. Bu doğal kaynaklar, önümüzdeki zamanlarda birçok yeni peptit ilacının geliştirilmesi ve kullanımı için temel bilgiler verebilir (108, 155, 195-197).

Tablo 2.1. Pennington, Czerwinski ve ark. (2017) tarafından tartışılan zehir türevi ilaçlar (95).

İlaç adı	Tedavisinde kullanıldığı hastalık	Hedef bölge	Zehrin alındığı hayvan	Onay durumu
Kaptopril	Hipertansiyon/ Konjestif kalp yetmezliği	ACE inhibitörü	Çukur engerek (<i>Botrops jararaca</i>)	Onaylandı
Eptifibatid	Antiplatelet ilaç	Kan dolaşım sistemi	Cüce çingiraklı yılan (<i>Sistrurus miliarius barbouri</i>)	Onaylandı
Tirofiban	Antiplatelet ilaç	Kan dolaşım sistemi	Russell'in engerek (<i>Daboia russelii</i>)	Onaylandı
Lepirudin	Antikoagülan	Trombin inhibitörü	Testere ölçekli engerek (<i>Echis carinatus</i>)	Onaylandı
Zikonotid	Kronik ağrı	Voltaj kapılı kalsiyum kanalları	Koni salyangozu (<i>C. geographus</i>)	Onaylandı
Klorotoksin	Tümör görüntüleme	Cl ⁻ kanallar/ Glioma hücreleri	Ölüm avcısı akrep (<i>Leiurus quinquestriatus</i>)	Klinik gelişim
Stichodactyla (ShK)	Otoimmün hastalık(lar)	Voltaj kapılı potasyum kanalları	Karayip deniz anemon (<i>Stoichactis helianthus</i>)	Klinik gelişim
SOR-C13	Kanser	TRPV6	N. kısa kuyruklu kır faresi (<i>Blarina brevicauda</i>)	Klinik Gelişim
HsTX1 [R14A]	Otoimmün hastalık(lar)	Voltaj kapılı potasyum kanalları	Dev Orman akrebi (<i>Heterometrus spinnife</i>)	Klinik öncesi gelişim
NaV1.7 engelleyiciler	Ağrı	Na _v 1.7	Birkaç tarantula türü (<i>Thrixopelma pruriens</i> <i>Selenocosmia huwena</i> , <i>Pamphobeteus nigricolor</i>)	Klinik öncesi gelişim
α-konotoksin RgIA	Ağrı	nACh reseptörleri	Koni salyangozu (<i>Konus regius</i>)	Klinik öncesi gelişim

2.12. Akrep Zehirlerinin ve Toksinlerin Antikanser Potansiyeli

Akrep zehirlenmesi tropikal ve subtropikal bölgelerde halk sağlığı için bir risktir ve spesifik (antivenom) ve sistematik tedavilerde iyileştirmeye açık bir ihtiyaç vardır. Ancak her madalyonun iki yüzü vardır ve akrep zehirlerinin tıbbi önemi göz ardı edilmemelidir. Akrepler ve akrep zehirleri Çin, Hindistan ve Afrika'da

geleneksel tıpta uzun süredir uygulanmaktadır. Örneğin, bir Çin ünlü farmakopesi kitabında 'Ben Cao Gang Mu' (Materia Medica Özeti, A.D. 1578), akrebin kurutulmuş tüm gövdesi bir antiepilepsi ve analjezik ajan olarak tanımlanmıştır (198).

Çalışmalar, akrep zehirlerinden türetilen protein Mucroporin-M1'in hepatit virüsü B'nin amplifikasyonunu engelleyebileceğini ve başka bir peptid Kn2-7'nin anti-HIV-1 aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (199). Antikanser potansiyeli, akrep zehirlerinin ve toksinlerin yakın zamanda gözlemlenen bir başka biyolojik özelliğidir.

Bir dizi deneysel ve prelinik çalışma, akrep zehirlerinin ve toksinlerinin kanser büyümesini bozabileceğini, apoptozu indükleyebileceğini ve in vitro ve in vivo kanser metastazını engelleyebileceğini göstermiştir. Antikanser aktiviteleri olan birçok aktif molekül, proliferasyonun inhibisyonu, hücre döngüsü durması, apoptoz indüksiyonu ve hücre göçünü ve invazyonunu azaltma açısından akrep zehirlerinden saflaştırılmıştır.

İncelenen kanser türleri arasında glioma, nöroblastom, lösemi, lenfoma, meme, akciğer ve prostat kanserleri yer almaktadır (200). Kanser araştırmalarında test edilen tüm akrepler arasında *Mesobuthus martensi Karsch* (BmK) akrep zehiri muhtemelen antitümör özelliklere sahip olduğu bildirilen ilk akrep türüdür.

1980'lerin başlarında, Çinli bir araştırmacı Zhang Futong, kurutulmuş tüm BmK vücudundan bir solüsyon çıkardı ve bunu retikulum hücreli Sarkom ve MA-737 meme kanseri olan farelere uyguladı. Sonuçlar, BmK çözeltisinin tümör büyümesini önemli ölçüde engelleyebileceğini ve tümör dokularındaki DNA içeriğini azaltabileceğini gösterdi (201). Bu yenilikçi çalışma, kanser tedavisinde BmK ve diğer akrep zehirlerinin araştırılmasının önünü açmıştır.

BmK akrep zehiri, Çin'de en kapsamlı olarak çalışılan ve birkaç aktif molekül izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. BmK'nın ham zehirinden elde edilen 50-60 amino asitli bir grup kısmen saflaştırılmış polipeptit olan akrep zehirinden (PESV) elde edilen polipeptit ekstraktının, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve DU 145 insan prostat kanseri hücrelerinin hücre apoptozunu indüklediği rapor edilmiştir (202).

6.280 Da moleküler kütleye sahip BmK'dan izole edilen bir analjezik-antitümör peptidi olan AGAP'ın, fare S-180 fibro sarkomu ve Ehrlich assit tümörüne karşı antitümöral aktivite gösterdiği gösterilmiştir (203). AGAP daha sonra voltaj kapılı bir sodyum kanalı akrep toksini olarak tanımlandı(204). AGAP'ye ubikuitin ile ilgili küçük bir değiştirici bağlayan bir füzyon proteini SUMO-AGAP, p-AKT, NF-KB, BCL-2, MAPK sinyal yollarına müdahale ederek hücre çoğalmasını ve SHG-44 insan malign glioma hücrelerinin göçünü inhibe etmiştir (205).

Akrep zehirlerinin antikanser etkilerine ilişkin en dikkate değer kanıt, glioma tedavisinde kullanılan Chlorotoxin'den (CTX) gelmektedir. Elektrofizyolojik kanıtlara dayanarak, klorür iyon kanalının başlangıçta CTX'in glioma afinitesinden ve özgülüğünden sorumlu olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, bir rekombinant His-CTX ile protein etkileşimi yaklaşımlarıyla yapılan daha ileri çalışmalar, CTX'in ana reseptörünün, glioma hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edilen bir proteaz olan matris metalloproteinaz-2 (MMP-2) olduğunu ortaya çıkarmıştır (206).

Son yıllarda, kanser hücrelerine karşı apoptozu indükleyen etki için birkaç akrep zehiri taranarak ve bazı aktif moleküller tanımlanmış ve karakterize edilmiştir.

Hint kara *scorpion Heterometrus bengalensis koch'tan* izole edilen 72 kDa'lık bir protein olan Bengalinin, normal insan lenfositlerine sitotoksikite olmaksızın insan lösemik hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir. Hasarlı çekirdeklere, DNA fragmentasyonuna, ısı şoku proteini (HSP) 70 ve 90'ın azalmış ekspresyonu, kaspaz-3,9 aktivasyonunun eşlik ettiği gözlemlendi (207). Moleküler kütlesi yaklaşık 30 kDa olan iki yeni apoptojenik peptit, sırasıyla Neopladine 1 ve Neopladine 2 olarak adlandırılan *Tityus discrepans* akrep zehirinden saflaştırılmıştır.

İmmünohistokimya çalışmaları, Neopladinlerin SKBR3 meme kanseri hücrelerinin hücre yüzeyine bağlanabildiğini, Fas ligandının (FasL) ekspresyonunu indükleyebildiğini ve hücre apoptozunu tetiklediğini göstermiştir. Oysa Neopladinler, malign olmayan MA104 maymun böbrek hücreleri üzerinde ihmal edilebilir bir etkiye sahiptir, bu da antikanser ilaçlarının geliştirilmesindeki potansiyellerini gösterir (208).

Odontobuthus doriae ve *Androctonus crassicauda* dahil olmak üzere diğer iki ham akrep zehiri de SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerine ve MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı antikanser etkileri açısından değerlendirildi. Oksidatif

stresin, S fazında hücre döngüsü durmasına ve apoptozun indüklenmesine katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (209, 210). Akrep zehirlerinin kanser hücrelerine karşı eylemlerinde iki mekanizmanın tanımlandığı sonucuna varılabilir.

1. Hücre proliferasyonunu ve metastazı inhibe etmek için iyon kanallarını hedefleme;
2. Hücre döngüsü durması, kaspaz aktivasyonu, mitokondri depolarizasyonu veya oksidatif stres ile apoptoz indüksiyonu.

Bununla birlikte, yeni bir araştırma alanı olarak, akrep zehirlerinin ve toksinlerin antikanser etkilerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek ve etki mekanizmalarını anlamak için çok daha fazla çaba gösterilmeli ve daha fazla çalışmalar yapılmalıdır. Şu anda sadece birkaç akrep türü test edilmiştir ve çoğu çalışma hayvan modelinde değil hücre kültüründe gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, mekanizmalar net bir şekilde açıklanmamıştır ve aktif moleküllerin saflaştırılması ve karakterizasyonu bir sorun olmaya devam etmektedir.

Akrep zehrinde bulunan 36 amino asit içeren küçük bir protein olan klorotoksinin kanser hücre metastazını azaltırken (211) normal hücrelere üzerinde toksik olmadığı tespit edilmiştir (212, 213). Ayrıca klorotoksinin in-vitro koşullar altında, bu peptit, MMP-2'nin (matris metaloproteinaz 2) jelatinaz aktivitesini inhibe ederek glioma hücre metastazını engellediği tespit edilmiştir (213).

Mavi akrep zehiriyle ilgili yapılan kapsamlı bir araştırmada akrep zehrinin analjezik, antienflamatuar ve antitümör bir ajan olabileceği sonucuna varmıştır (214). 2011 yılında küba Labiofam adlı şirket Küba'da bulunan nadir görülen bir mavi akrep olan Rhopalurus junceus'un zehirinden, potansiyel yeni bir kanser terapisi olarak kabul edilen Vidatox 30-CH adlı bir ilaç geliştirilmiştir. Bu ilaç % 33'lük bir alkolik çözeltisi içinde mavi akrep zehirinden elde edilen beş düşük molekül ağırlıklı peptitden oluşmaktadır. Vidatox ilacı 10.000'den fazla kanser hastasında test edildi. Yapılan çalışma sonucunda ilacın tümör büyümesini yavaşlatarak kanserli hastaların yaşam kalitesini artırdığı tespit edilmiştir (215).

Kanser kemoterapisinde kullanılmakta olan ilaçların önemli yan etkileri, terapötik yetersizlikleri ve etkide selektivite sorunları nedeniyle, kesin çözüm

olabilecek bir tedavi yöntemi tam olarak geliştirilemediği için, bu yöndeki çalışmalar artarak devam etmekte ve güncelliğini korumaktadır. Bu yüzden etkin ve seçici kemoterapik yöntemlerin araştırılması kanser tedavisi için önem teşkil etmektedir. Bu nedenle araştırmacılar kanser tedavisinde kemoterapi yerine kullanılacak yeni alternatif tedavi stratejilerine yönelmektedir. Son zamanlarda ise, hayvan zehirlerinin ve toksinlerinin ümit verici antikanser aktivitesini tespit etmeye yönelik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (216).

Zehirler olumsuz etkileri ile bilinir ve insan için ciddi sağlık sorunlarına neden olurlar (217). Ancak, olumsuz etkilerine rağmen, bu zehirler farmakolojik olarak aktif bileşiklerin zengin bir kaynağıdır (218). Akrep zehiri, heyecan verici tıbbi beklentileri olup, bir ilaç adayı olma potansiyeli olan ölümcül zehirdir. Birkaç akrep zehiri peptidi birçok hastalıkta umut verici olmuştur.

Yapısal ve fonksiyonel spesifikliği nedeniyle, akrep peptidleri, özellikle kardiyovasküler ve diğer immün hastalıklar için spesifik ilaçların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (219). Akrep zehiri, mukopolisakaritler, serbest amino asitler, fosfolipazlar, hiyalüronidazlar, aminler ve nükleotitler gibi çeşitli biyoaktif bileşikler içerir (108). Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalar akrep zehiri'nin kansere karşı da etki edebilecek biyolojik olarak aktif moleküller içeriği tespit edilmiştir. Akrep zehri, tümör tedavilerinde doğal bir kaynak olarak kabul edilir. Ayrıca son zamanlarda *Androctonus crassicauda* türü akrep zehiriyle yapılan bir çalışmada, zehirin meme ve kolorektal kanser hücre hatları üzerinde doza ve zamana bağlı bir şekilde sitotoksik etkiler gösterdiği ve kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinde artışa yol açarak apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir (220).

Yapılan birkaç çalışmada farklı akrep türlerinden elde edilen zehirlerin invitro ortamda kanser hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğu, tümör büyümesinin azaltılmasında etkili olduğu ve çeşitli tümör modellerinde spesifik olmayan toksik etkiler olmadan metastazı inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu tür inhibitörlerin özellikle konvansiyonel kemoterapi ya da radyoterapi ile kombinasyon halinde uygulandığında çeşitli tümörlerin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir.

2.13. Zehir Çalışmalarında Metabolomiks Uygulamaları

Hem zehirler hem de zehirli salgılar, hayvanlar dünyasında savunma, avlanma, iletişim ve rekabete yardımcı olan karmaşık karışımlardır. Proteinler, peptitler, tuzlar ve ayrıca metabolitler gibi değişken biyoaktif moleküllerden oluşurlar. Metabolomik, daha önce keşfedilmemiş düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerini araştırma fırsatı verdiği için zehirler ve zehirlerin incelenmesi için yeni perspektifler açmaktadır (221).

Hayvan zehirleri ve zehirleri üzerine yapılan araştırmalar, yeni biyoaktif molekülleri keşfetme fırsatları sunan teknolojik ilerlemeyle sürekli olarak geliştirilmiştir. Proteomik, transkriptomik, genomik ve metabolomik gibi zehir araştırmaları için “omik” teknolojilerinin tanıtılması, büyük ölçekli veri toplama ve analizini mümkün kılmıştır. Yukarıda sıralanan teknolojilere benzer şekilde, yeni "zehir" terimi türetilmiştir. Venomiks, hayvan zehiri ve zehir bezlerinin son derece hassas ve yüksek verimli teknikler kullanılarak incelenmesi olarak tanımlanabilir (222).

Başlangıçta "zehir" kelimesi sadece zehirlerin proteomik analizlerine atıfta bulunuyordu (223, 224). 2006 yılında, bu terimle birkaç zehirli hayvandan tam genomlar, transkriptomlar ve proteomların incelenmesi üzerine bir proje tanımlandı (225). Daha sonra "venomiks", proteomik ve transkriptomikleri birleştiren daha küçük ölçekli çalışmaları tanımlamak için de kullanıldı (226-229).

“Omik” teknolojilerin en sonuncusu olan metabolomik, hücrelerde, biyolojik sıvılarda ve dokularda (metabolom olarak adlandırılan) bulunan tüm metabolit setini tanımlamayı ve ölçmeyi amaçlar.

Endojen metabolitler, genom ile başlayan ve ardından transkriptom ve proteom ile devam eden bir dizi işlemin sonundadır. Bu nedenle metabolom, belirli bir genotip ve fenotip arasındaki boşluğu doldurur. Metabolom bileşenleri, aminler, amino asitler, organik asitler, steroidler, alkaloidler ve şekerler gibi bileşik sınıflarını içerir. “Metabolomik” terimi 1999 yılında Nicholson, Lindon ve Holmes tarafından tanıtıldı (230). Metabolomik ve proteomik çalışmalar ile sıklıkla hastalıklar için kullanılan LC-MS/MS ile yeni biyokimyasal belirteçlerin belirlenmesi koruyucu ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir (231).

Hu ve ark. canlı akrep ve kurbağadan aldıkları salgılarda iyonizasyon kütle spektrometresi kullanarak metabolitleri tespit ettiler. MS spektrumları lizin, serotonin ve triptofanı ve bazı lipidleri tanımladılar (232).

Aird ve ark. (233) yılan zehirindeki poliamin içeriğini (spermin, spermidin, putresin ve kadaverin) analiz etmek için hedefe yönelik bir yaklaşım uyguladılar.

Poliaminler, %4 benzoil klorür ile türevlendirildi ve UHPLC-TOF-MS kullanılarak nicelendirildi. Poliaminlerin varlığı tüm numunelerde ancak önemli ölçüde farklı seviyelerde belirlendi. Elapid zehirleri, diğer zehirlerden daha az amin içeriyordu, spermin neredeyse tamamen yoktu ve hiç spermidin bulunamadı, oysa putresin en fazla miktarda olanıydı. Viperid ve kortalid zehirleri arasındaki poliamin düzeylerindeki büyük farklılıklara rağmen, spermin ve spermidin bu taksonlarda en yüksek miktarda meydana gelmiştir.

Torres ve arkadaşları (234) yaban arısı *Polistes lanio'nun* zehrinde serbest amino asitleri belirledi. *P. lanio'nun* üç yüz dışından zehir rezervuarları toplandı ve HPLC yöntemi kullanılarak analiz edildi. HPLC analizinden önce amino asitler, dietil etoksümetilenmalonat (DEEM) ile işlenerek türevlendirildi. Araştırma, 10 amino asidin tanımlanmasına ve bunlardan 8'inin miktarının belirlenmesine olanak verdi. İncelenen analitler arasında, yaban arısı zehrinde bol miktarda arginin, alanin, treonin ve serin gözlemlendi. Hedeflenen strateji aynı zamanda kurbağa zehrinin antikanser bileşenleri olan bufadienolidlerin belirlenmesi için de kullanıldı (235, 236). Zehirlerin ve zehirlerin düşük moleküler bileşenleri çeşitli işlevlere sahiptir. Bazı çalışmalar, tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitelerini göstererek onları potansiyel anti-kanser ilaçları haline getirmiştir (237, 238).

Farklı hayvanlardan alınan zehir ve zehirlerin düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonlarının analizleri, bu salgılarda bazı ortak bileşenlerin ve ayrıca spesifik moleküllerin meydana geldiğini göstermiştir. Benzersiz bileşenler arasında kurbağa zehirlerindeki bufadienolidler, örümcek zehirlerindeki açilpoliaminler ve ateş karınca zehirlerindeki piperidin alkaloidleri bulunurken, birçok zehirli ve zehirli salgı türünde serbest amino asitler ve monoaminler bulunur. Her bileşenin bir avın hareketsizleştirilmesinde kendi rolü vardır (233).

Poliaminler, yılanlar ve örümcekler de dahil olmak üzere birçok zehirde bulunur. Konsantrasyonları, kaynaklandıkları metabolik yola bağlı olarak farklılık

gösterir. Örneğin, kadaverin, diğer üç poliamin (spermin, spermidin, putresin) veren yoldan ayrılan bir anabolik yolda üretilir. Çoğu zehir, çok düşük poliamin seviyesi nedeniyle muhtemelen avda sistemik bir yanıtı tetiklemez, ancak yerel etkiler göstermektedir (233).

Aminoasitler, çeşitli peptit moleküllerinin yapısal bileşenleri olarak, yapısal ve kimyasal özelliklerinde önemli roller oynarlar. Bazı peptitler kanser gibi ölümcül hastalıklara karşı engelleyici etki gösterir. Amino asitler ayrıca kimyasal haberciler, metabolik ara ürünler ve diğer biyomoleküllerin öncüleri olarak da işlev görür (239-242).

Aminoasitler hem proteinlerin yapımında hem de hücre ve doku metabolizmasında ara ürünler olarak merkezi rol oynayan biyolojik olarak önemli organik moleküllerdir. Serbest amino asitler (FAA'lar), aktif metabolik sisteme katılmak için vücut boyunca dağıtılırlar (243).

Glisin ve glutamat, nörotransmitterler olarak işlev görür ve triptofan, hücrelerde kimyasal sinyalleşme rolüne hizmet eden indol asetik asit için bir öncüdür (241, 242).

Enerji metabolizması, mitokondri yapısının bozulmasının bir sonucu olarak bozulur ve hücresel açlık, enerji üretiminde glutamin kullanımı artar. Böylece glutamin, glikoz yokluğunda kanser hücrelerinin birincil enerji kaynağı olarak kullanılır. Bu glikoz yoksunluğunda, yetersiz glutamin kaynağı kanser hücrelerinde apoptotik mekanizmayı harekete geçirmek için yeterlidir.

β -alanin, hücre göçü ve çoğalmasında kullanılan metabolik yollarda rol oynar. β -alanin'in sitoplazmik asitliğin düzenlenmesinde de rol oynadığını belgelenmiştir. Glisin ve serin, mitokondride amino asit biyosentezini ve enzimatik yolları düzenleyen onkometabolittir. Glisin biyosentezindeki bir artışın tümör oluşumunu ve metastazı hızlandırdığı gösterilmiş ve bu durum da onu kanser tedavisinde olası bir hedef haline getirmiştir (244). Zincir uzunluğu iki amino asitten binlere kadar değişir ve moleküler ağırlıklar daha sonra yüzlerce ile yüzbinlerce dalton arasında değişir. Sağlık açısından bakıldığında, bir proteinin önemli bir yönü amino asit bileşimi olmasıdır.

Bazı amino asitler esansiyel (vazgeçilmez) olarak sınıflandırılır. Bunlar insanlar tarafından sentezlenemeyen amino asitlerdir ve bu nedenle diyetle

sağlanmalıdır. Esansiyel olmayan amino asitler, diğer amino asitlerden veya diğer öncülerden sentezlenebilir. Bazı amino asitler yarı esansiyel olarak sınıflandırılır. Bu amino asitler diğer amino asitlerden sentezlenebilir ancak sentezleri belirli koşullar altında sınırlıdır (245-247). Yirmi doğal amino asitten dokuz amino asit vücutta üretilir ve bunlar esansiyel olmayan amino asitler olarak bilinir (248).

Örümceklerin, akrelerin, kara kurbağalarının ve kurbağaların salgılarında bulunan amino asitler, monoaminlerin öncüleri olarak işlev görür. Her iki metabolit sınıfı da zehirlerde veya zehirlerde değişken biyolojik işlevlere sahiptir. Akrep *Tityus serrulatus*'un zehrinde bulunan lizin ve triptofan, avın hareketsiz kalmasına neden olur ve kaçmasını önler (249).

Glutamik asit, avı felç edebilen nöroaktif bir bileşiktir. Bu etki, küçük boyutları ve dolaşım sistemlerinin yapısı nedeniyle glutamik asidin doğrudan ve hızlı bir şekilde etki ettiği böceklerde gözlemlenmiştir. Memelilerde karaciğerde hızla metabolize edilir (250). Örümcek zehirlerinde tespit edilen bir monoamin olan oktopamin, bir nörotransmitterdir ve kas dinamiklerini modüle ederek ve sempatik sinir sistemini aşırı aktive ederek av felcine katkıda bulunur. Canlı bir akrep sokmasından salınan bir salgının doğrudan iyonizasyon kütle spektrometrisi (DI-MS) analizi ile elde edilen bir kütle spektrumu, birçok yüksek yüksek piki içermesine rağmen, sadece lizin, triptofan ve serotonin tanımlanabilmiştir (232).

Metabolitler, moleküler ağırlığı 1500 Da'nın altında olan ve farklı fizikokimyasal özelliklere sahip moleküllerdir. Metabolitler, polarite, pKa, pH, çözünürlük, kimyasal ve termal stabilite vb. açısından son derece farklı özelliklere sahip bileşik sınıfları içerir (251).

"Omik" teknolojilerin tanıtılması, zehirler ve zehirli salgıların incelenmesinde devrim yaratmıştır. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu protein ve peptit profillemeye üzerine odaklanmıştır ve zehir ve zehirlerin düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonlarını araştıran sadece birkaç yayın mevcuttur. Bu nedenle, zehir ve zehirlerin metabolomiklerinin henüz emekleme döneminde olduğu sonucuna varılabilir. Bahsedilen çalışmaların çoğu, LC-MS tabanlı hedeflenmemiş metabolomikleri kullanmıştır, çünkü bu strateji, zehirlerin ve zehirlerin düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerine geniş bir genel bakış sağlamaktadır. Metabolomik, zehirli ve zehirli organizmalar hakkındaki bilgimizi büyük ölçüde artıracak bir alandır.

Salgılarının biyolojik aktivitesinin temelini anlamak, ısırıkların veya sokmaların tedavisini iyileştirebilir ve terapötik potansiyele sahip moleküllerin keşfedilmesine yardımcı olabilecektir (221).

Bu kapsamda bu çalışmada Şanlıurfa’da yaşayan *androctonus crassicauda* akrep türünden elde edilecek zehir’inin;

1. *Androctonus crassicauda* türü akrep elektriksel uyarım yöntemi ile sağılarak zehiri elde edilerek, liyofilize edilecek.
2. Kolon kanseri (HCT-116,), meme kanseri (MDA-MB-231), prostat kanseri (DU-145), akciğer kanseri (A-549), serviks kanseri (HELA), kemik kanseri (U2OS) ve normal hücreler (BEAS-2B, HEK-293, HUVEC, CRL-4010) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle incelenecek.
3. Zehirin güçlü sitotoksik etki gösterdiği kanser hücresinin; hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi, hücre içi radikal değişimi ROS, mitokondiryal membran potansiyeli JC-1 değişimi flourimetrik prob yöntemi, apoptotik ve nekrotik etkileri ise flow sitometride Annexin-V yöntemi ile incelenecek.
4. Ayrıca akrep zehrinin metabolit profilinin tespiti için serbest aminoasit LC-MS/MS yöntemiyle incelenecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Akrep Zehrinin Elde Edilmesine Yönelik Çalışmalar

3.1.1. Akrep Toplanması ve Bakımı

Bu çalışmada kullanılan akrepler Şanlıurfa ilinin çeşitli bölgelerinden toplanmıştır. Toplama çalışmaları gece, UV ışık altında gerçekleştirilmiştir. Toplanan akrepler, Harran Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarında havalandırma delikleri açılmış ve içerisine su kapları konulmuş 25×14×13 cm boyutlarındaki plastik kaplarda saklanmıştır. Akrep kapları haftada bir olmak üzere temizlenmiştir. Beslenmeleri haftalık olarak *Tenebrio molitor* larvaları ile sağlanmıştır (Şekil 3.1) (252).



Şekil 3.1. Laboratuvar ortamına adapte olup ortamında yaşayan *Androctonus crassicauda* akrebi

3.1.2. Akrep Zehrinin Eldesi ve Hazırlanması

Akrelerden ham zehir eldesinde elektrostimülasyon yöntemi kullanılmıştır. Akrep kuyruğuna iki elektrot yardımıyla 20 voltluk elektrik akımı uygulanmasına dayanan yöntemle elde edilen akrep venomları, ependorf tüplere toplanmıştır (253). Toplanan venom deiyonize suda çözülerek, 14000 rpm’de 4°C de 15 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Peptid toksinlerin bulunduğu süpernatant kısmı yeni bir tüpe aktarılmış ve vakum kurutucuda liyofilize edilerek kurutulmuştur. Toplanan kuru ham venomlar -80 °C de saklanmıştır (254).

Bu şekilde zehir eldesi ayda 1 kez olacak şekilde çalışma süresince yapılmıştır.



Şekil 3.2. Elektriksel uyarım yöntemi ile zehir sağımı



Şekil 3.3. Ham zehrin santifürüjlenmesi ve liyofilizatörde kurutulması

3.2. Akrep Zehrinin Antikanser Özelliğinin Tespitine Yönelik Çalışmalar

Çalışma başlıca yedi iş paketinden oluşmaktadır;

1. Akrep zehrinin kanser ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkinliğinin MTT yöntemi ile incelenmesi
2. Akrep zehrinin yüksek sitotoksik etki gösterdiği kanser türü üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkinliğin incelenmesi
3. Zehrin apoptotik etkinliğinin morfolojik olarak flouresan mikroskop ile incelenmesi
4. Kanser hücresinde apoptozise yol açan etkenlerin incelenmesi
 - ✓ Hücre içi ROS
 - ✓ Mitokondriyal membran potansiyeli
5. Zehrin metabolit profilinin LC/MS MS ile incelenmesi

3.2.1. Akrep Zehrinin Kanser ve Normal Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkinliğinin İncelenmesi

3.2.1.1. Çalışmada Kullanılacak Hücreler

Çalışmada ATCC'den temin ettiğimiz; kolon kanseri (HCT-116,), meme kanseri (MDA-MB-231), prostat kanseri (DU-145), akciğer kanseri (A-549), serviks kanseri (HELA), kemik kanseri (U2OS), normal akciğer (BEAS-2B), böbrek (HEK-293) ve endotel hücreleri (HUVEC) kullanılacaktır. Hücre hatları %10 FBS ve %1 glutamin ile desteklenmiş DMEM-F12, RPMI-1640 besi yerlerinde %5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırıldı.

3.2.1.2. Hücrelerin Bakımı

Hücrelerin büyümesi ve beslenmesini sağlamak için %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin, içeren DMEM F-12 besi ortamı kullanıldı. Yüzeye bağımlı hücreler büyütülürken hücreler yüzeyi tamamen kaplayıncaya kadar rutin olarak 2 günde bir ortamları steril cam pastör pipeti yardımıyla çekilerek ve ardından hücrelerin üzerine taze steril besi ortam eklenerek hücrelerin ortamı değiştirildi. Hücreler, 75 cm³ hücre kültürü kaplarında 37°C' de %5 CO₂' li inkübatörde çoğalmaya bırakıldı.

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması İşlemi

Çoğalan hücreler tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıkları zaman hücrelerin üzerlerindeki besi ortamı steril pastör pipetleri ile çekilerek atıldı. Ardından hücre kültürünün yüzeyi tripsin-edta muamelesini aktivitesini arttırmak için Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen ticari olarak satılan steril 1X PBS ile muamele edilerek hücreler 1 kere yıkanıp ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Hücre kültürünün üzerine tripsin-EDTA eklenip, hücrelerin birbirlerinden ve plate yüzeyinden ayrılması beklendi. Ardından 1200 rpm de +4°C' de santrifüj edildi. Çöken hücrelerin üzerine %95 besiyeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan hücre dondurma solüsyonu eklenip, hücreler bu

solüsyon içerisinde önce -20⁰C'lik derin dondurucuda veya -86⁰C'lik derin dondurucuda kısa süreli saklanırken uzun süreli olarak sıvı azota alınarak saklandı.

3.2.1.4. Hücre Sayımı

Hücrelerden yeni kültürlerle istenilen sayıda hücre alabilmek için thoma lamı hücre sayımı yapıldı. Sayım için var olan hücre süspansiyonundan 10 µl alınırken tripan mavisinden 90 µl alınıp karışım 100 µl' ye tamamlandı. Thoma lamının üzerine bir lamel koyulur ve homojenize edilen hücre boya karışımından pipet yardımıyla thoma lamı ve lamel arasına kenardan yavaşça aktarıldı. Thoma lamı üzerinde yer alan büyük 9 kare içerisindeki hücreler sayıldı. Milimetredeki hücre sayısını (hücre sayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı.

$$\text{Hücre sayısı/ml} = ((\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oranı (10)}) \times 10^4) / 8$$

3.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

MTT hücre proliferasyon reaktifi kullanılarak ilaçların sitotoksik etkileri incelendi. Hücreler stoktan açılarak 25 cm³ flasklara ekilip, %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik süre ardından besi yerleri uzaklaştırılıp ve akrep zehiri 0, 2.5, 5,10,25,50,100 ve 200 µg/ml dozlarında olacak şekilde hücrelere uygulandı ve sitotoksik doz bulunmaya çalışıldı. İlaçlar her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklendi ve ardından 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süresince %5 CO₂'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

Bu şekilde zehirin doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi incelenir. Inkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri çekilip 200 µl serumsuz besi yeri üzerine 90 µl MTT solüsyonu eklendi ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırılır, formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 470 ve 690 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi. Akrep zehirinin hücreler üzerindeki sitotoksik dozu (IC₅₀) ve inkübasyon süresi MTT yöntemiyle tespit edildi.

3.4. Akrep Zehrinin Yüksek Sitotoksik Etki Gösterdiği Kanser Türü Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkinliğin İncelenmesi

Akrep zehrinin hücreler üzerinde gösterdiği sitotoksik etkinin, apoptotik yolağın aktiflenerek mi yoksa hücrelerde nekrozisle mi olduğu Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC kit protokolü uygulandıktan sonra flow sitometri (BD FACS Canto) ile analiz edildi. Annexin-V apoptoz analizinde kullanılan FITC ile konjüge Annexin-V lektini, apoptotik hücrelerin hücre membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidil serin fosfolipidine bağlanır. FITC, Annexin-V bağlanan hücrelerin flüoresan (FL1 detektörü; eksitasyon= 488nm, emisyon=535nm) ışımaya neden olmaktadır. Hücrelerdeki bu flüoresan ışımaya akış sitometrideki FL1 dedektörü ile belirlenebilir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır ve bir diyagrama yerleştirilir. Ölü (mekrotik) hücreler ise nükleik asitlere bağlanabilen flüoresan PI (FL2 detektörü, eksitasyon= 488nm, emisyon=562-588nm) boyası ile belirlenir. PI nekrotik hücrelerin zarar görmüş hücre membranından geçerek DNA'larını boyar. DNA'ları boyanan hücrelerdeki flüoresan ışımaya akış sitometrideki FL2 dedektörü ile belirlenir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır ve bir diyagrama yerleştirilir. Çalışmada 6 well pleytlere ekilecek olan hücrelere belirlenen IC₅₀ dozunun alt ve üst dozları belirlenecek inkübasyon sürelerinde uygulandıktan sonra kit protokolü şu şekilde uygulandı.

1. Hücreler tripsinize edilip kaldırıldıktan sonra PBS ile yıkandıktan sonra 1200 rpm 5dk santrifüj edilip, 1X bindig buffer ile yıkandı.
2. Pelet 5×10^6 /ml hücre olacak şekilde 1X binding buffer ile süspanse edildi.
3. 100 µL hücre süspansiyonu yeni bir eppendorf tüpe aktarıldıktan sonra, üzerine 5 µL of fluorochrome-conjugated Annexin V eklendi.
4. 15 dk oda ısısında inkübe edildi. 200 µL 1X binding solüsyonu ile yıkandı. Elde edilen pelet 200 µL 1X Bindig Solüsyonu ile süspanse edilip üzerine 5 µL of Propidium Iodide Staining solüsyonu eklendikten sonra flow sitometride analiz edildi.

3.5. Akrep Zehrinin Apoptotik Etkinliğinin Morfolojik Olarak Floresan Mikroskop ile İncelenmesi

Zehrin hücreler üzerinde apoptotik etkisinin morfolojik olarak tespiti için Acridine Orange /Ethidium Bromide metodu kullanıldı. Belirlenen sitotoksik dozdaki zehir ile muamele edilmiş hücre lamelleri alınıp, 2 kez 2 dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine akridin orange/Ethidium bromide çalışma solüsyonu ile 15 dakika boyamaya bırakıldı. Boyama sonunda lameller PBS ile yıkandıktan sonra kurutma kâğıdı üzerinde dik tutulması suretiyle boya uzaklaştırıldı ve floresans mikroskopta incelendi.

3.6. Kanser Hücresinde Apoptozise Yol Açan Etkenlerin İncelenmesi

Akrep zehrinin kanserli hücrelerde apoptozise neden olduğu tespit edildikten sonra, hangi etki ile apoptozisi tetiklediğini tespit etmek amacıyla aşağıda belirtilen analizlerin yapılması gereklidir.

3.6.1. Hücre İçi Serbest Radikal Değişimi Analizi (ROS)

Hücre içi artan serbest radikaller hücre DNA'sında hasara yol açarak apoptozis mekanizmasını tetikleyen en önemli mekanizmalardan birisidir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçların çoğunluğu bu etki mekanizması ile kanseri tedavi etmektedir. Çalışmamızda hücre içi serbest radikal ölçümü Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay kiti kullanılarak yapıldı. Bu kitte, hücreye geçirgen olan bir floresans prop kullanılır. Bu prop ROS ile reaksiyona girdiğinde kırmızı flüoresan oluşturur. Kit protokolü şu şekilde uygulandı.

1. Siyah pleytlere 100µl'de 3×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılarak 24 saat inkübe edildi.
2. IC₅₀ dozu tespit edilen akrep zehiri kanser hücresine belirlenen süre boyunca inkübatörde 37°C'de %5 CO₂ inkübe edildi (ışıktan korunarak).

3. Bileşikler döküldükten sonra kuyucuklara 100 µl' ROS Deep Red Working Solution eklenip 37°C'de %5 CO₂ 1 saat inkübe edildi.
4. Fluorimetri cihazında (Biotek, Cytation-1) veya flow sitometride Ex/Em = 650/675 nm (cut off = 665 nm) ölçüm yapıldı.

3.6.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) Ölçümü

Akrep zehrinin kanser hücre içi serbest radikal miktarını artırması durumunda, bu artışın mitokondri kaynaklı olup olmadığının tespit edilmesi için bu analiz yapıldı. Çalışmada 6 well pleytlere ekilen MDA-MB-231 hücrelerine akrep zehrinin 1 ve 2 dozları 36 saat uygulandıktan sonra mitokondri membran potansiyelini ölçmek için BDTM MitoScreen (JC-1) (Cat No./ID:551302) (BD, New Jersey, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki şekilde uygulandı;

1. 6 kuyucuklu steril plakalara 1x10⁶ hücre/ml ekim yapılarak hücreler yaklaşık 1 gün sonrasında belirlenen dozda akrep zehri ve negatif kontrol ile 36 saat inkübe edilmiştir.
2. Hücreler tripsin ile kaldırılarak 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak süspanse edilmiştir.
3. Liyofilize JC-1 boyası üzerine 125 µl DMSO eklenerek stok solüsyonu hazırlanmış ve her örnek için 500 µl stok boya ve 1X Assay buffer kullanılarak çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
4. Çalışma solüsyonu eklenen hücre pelletleri 37 °C'de 15 dk inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek 2 kez 1X Assay buffer ile yıkanmıştır.
5. Son aşamada 500 µl 1X Assay buffer eklenerek BD FACS via (BD, New Jersey, ABD) akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.
6. Mitokondri membran potansiyeli bozulan hücreler ölen hücre yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.7. Akrep Zehrinin Metabolit Profilinin İncelenmesi

Akrep zehiri çeşitli enzimler ve peptidler gibi molekül ağırlığı 0.50 kDalton'dan büyük makro moleküller ile aminoasit, organik asit ve yağ asitleri gibi küçük mikro molekülleri içermektedir. Bu çalışmada daha çok akrep zehrinde bulunan mikro moleküllerden bazıları tespit edilecektir. Bu amaçla akrep zehrinin içerdiği serbest aminoasit miktarları LC-MS/MS yöntemi kullanılarak tespit edildi.

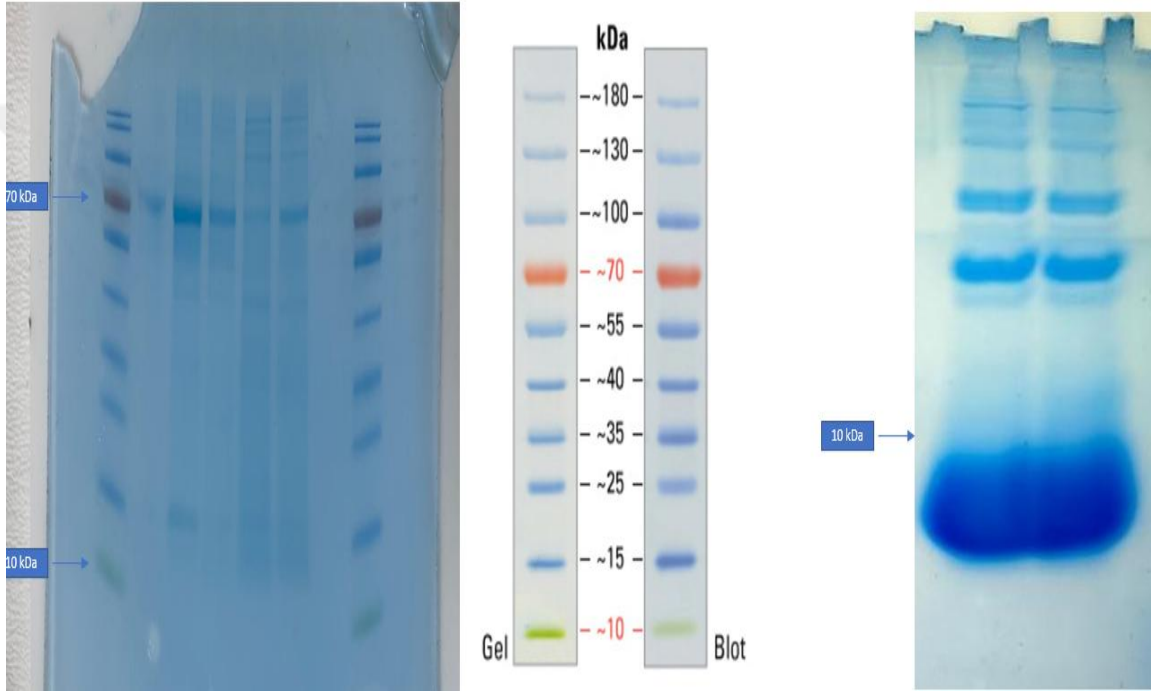
Aminoasit çalışması için; -80°C'den çıkarılan akrep zehir numuneleri oda ısısına gelene kadar bekletildi. Amino asit çalışması için JASEM aminoasit kiti kullanıldı. Her bir hastanın PS ve plazma numuneleri için aşağıdaki basamaklar izlendi.

1. Hastaların PS ve plazma örneklerinden numaralandırılmış steril ependorf tüplere 50µl alındı.
2. Bu tüplerin üzerine aminoasit kitinde bulunan Internal Standart solüsyonundan 50µl eklendi.
3. Her tüp dikkatli bir şekilde 5 sn'ye vortekslendi.
4. Ardından vortekslenen tüplerin üzerine kit içerisinde bulunan Reagent-1 solüsyonundan 700µl eklendi.
5. Tüpler tekrar dikkatli bir şekilde 15 sn'ye vortekslendi.
6. Vortekslenen tüpler 5 dk 3000 rpm de santrifüj edildi.
7. Santrifüjden dikkatli bir şekilde alınan örneklerin süpernatant kısmı steril pipet yardımı ile HPLC vial tüplerine aktarıldı.
8. Analiz için LC-MS/MS (Shimadzu 8045, Japan) cihazında ki HPLC kısmında bulunan tepsi bölmesine yerleştirildi ve okutuldu.
9. Mobil faz olarak aminoasit kiti içerisindeki Mobil Faz-A ve Mobil Faz-B kullanıldı.
10. Kolon olarak Restek LC Columns kullanıldı.

4.BULGULAR

Çalışmamızda akrep zehrinde protein varlığını göstermek için SDS-PAGE yapıldı. Kolon kullanılarak ham zehirden 10 kDa altındaki peptitler ayrıldı ve SDS-PAGE yöntemi ile peptit varlığı gösterildi.

Sonuçlar aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.1. Liyofilizatör cihazında toz haline getirilen zehrin SDS-PAGE yöntemi ile görüntülenmesi.

4.1. Akrep Zehrinin Kanser ve Normal Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkinliğinin İncelenmesi

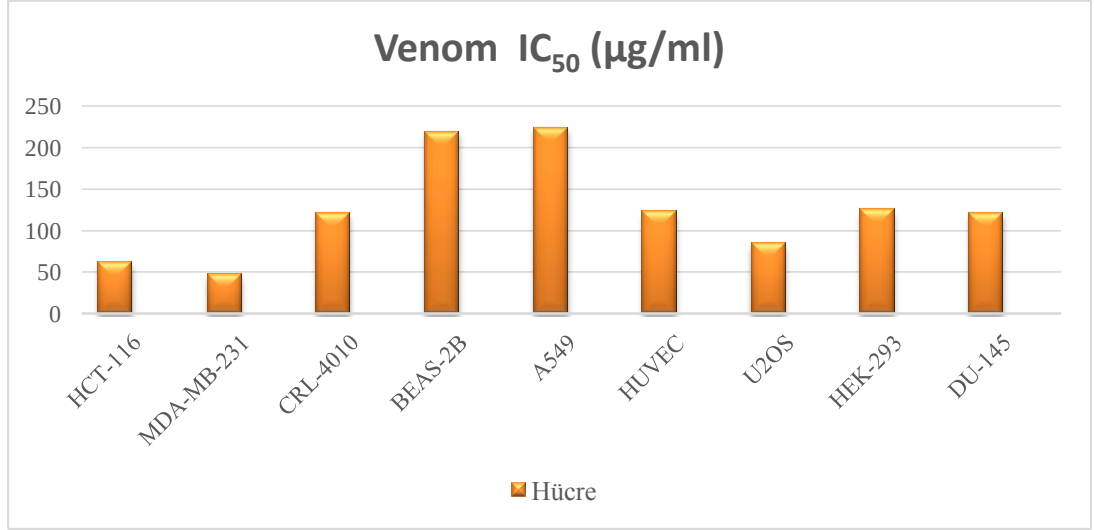
Akrep zehrinin çeşitli kanser ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri MTT metodu ile incelendikten sonra IC_{50} değerleri belirlenip tüm sonuçlar tablo 1’de gösterilmiştir. Hücre canlılığının değişimi doza bağlı olarak incelendi. Akrep zehri hücrelere 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında uygulandıktan 48 saat sonra sitotoksik etkileri incelendi. Madde ilave edilmeyen (0 μM) kontrol grubu hücrelerinin canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edildi ve diğer örneklerle ait canlılık değerleri oransal olarak absorbans değerlerinden hesaplandı.

Akrep zehrinin IC_{50} değerleri incelendiğinde en güçlü sırasıyla en çok meme kanseri (MD-MB231), kolon kanseri (HCT-116) ve kemik kanseri (U2OS) üzerinde en çok sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Akrep zehri meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231) üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterirken, normal meme doku hücresi (CRL-4010) üzerinde ise sitotoksik etkisinin kanser hücrelerine göre düşük olduğu gözlemlendi. Bu nedenle akrep zehrinin meme kanseri üzerinde selektif etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. Akrep zehrinin normal ve kanserli hücreler üzerindeki IC_{50} değerleri

	HCT-116	MDA-MB-231	CRL-4010	BEAS-2BA549	HUVEC	U2OS	HEK-293	DU-145
Venom ($\mu\text{g/ml}$) (IC_{50})	62,3	47,4	120,3	219,2	224	122,3	84,4	124,8

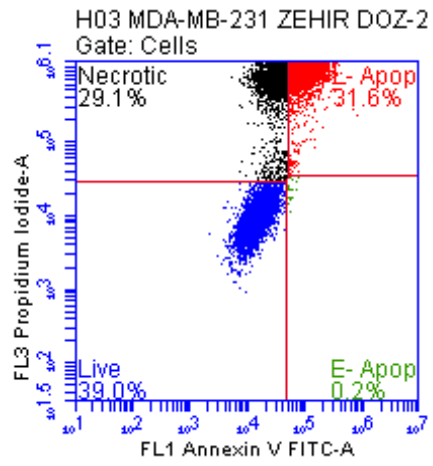
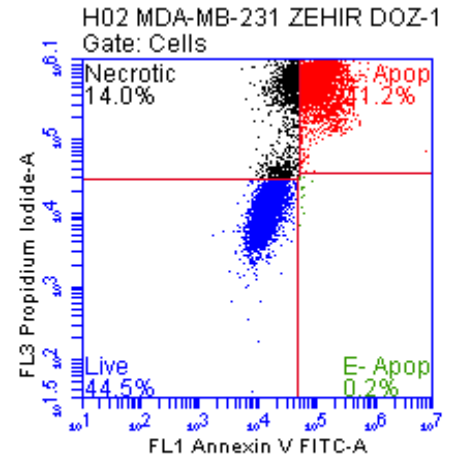
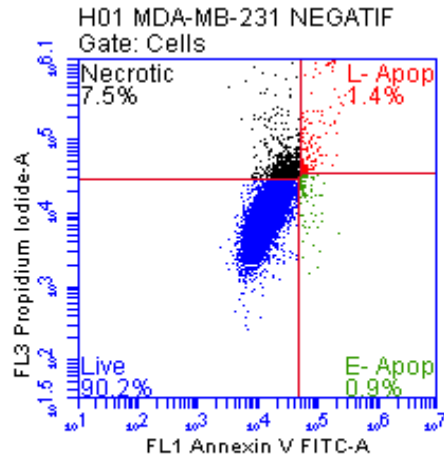


Şekil 4.2. Akrep zehrinin normal ve kanserli hücreler üzerindeki IC₅₀ değerlerinin grafik gösterimi.

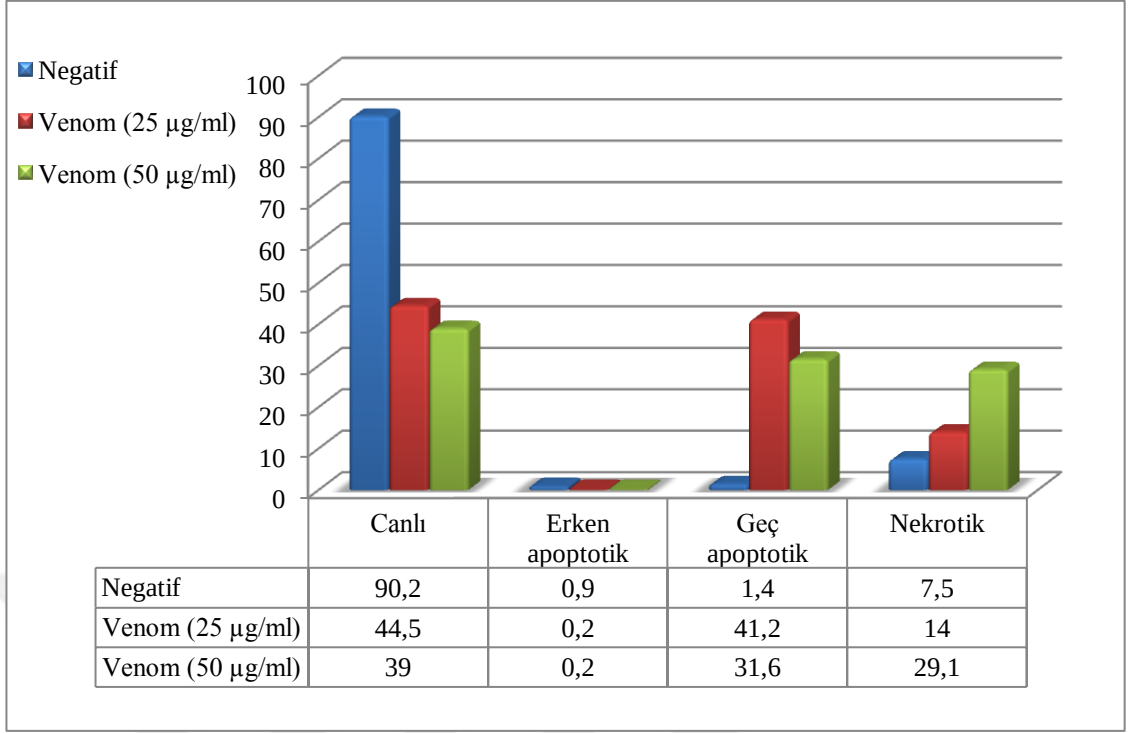
4.2. Akrep Zehrinin Yüksek Sitotoksik Etki Gösterdiği Kanser Türü Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkinliğin İncelenmesi

Akrep zehrinin hücreler üzerinde gösterdiği sitotoksik etkinin, apoptotik yolağın aktiflenerek mi yoksa hücrelerde nekrozisle mi olduğu Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC kit protokolü uygulandıktan sonra flow sitometri (BD FACS Canto) ile analiz edildi. Meme kanseri hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki gösteren akrep zehrinin bu etkisinin apoptotik olup olmadığını tespit etmek amacıyla flow sitometrik Annexin -V yöntemi kullanıldı. Sonuçlar şekil 4.3 ve şekil 4.4 verilmiştir.

Akrep zehrinin her iki dozunun 48 saat uygulamadan sonra meme kanseri hücrelerinde apoptozisi indüklediği tespit edildi. Meme kanseri hücrelerine uygulanan 25 µg/ml akrep zehrinin 48 saat sonucunda geç apoptozise neden olduğu gözlenirken, 50 µg/ml dozunun nekroza doğru bir kaymanın olduğu gözlemlendi. Nekrotik hücre görünümünün zamana bağlı olarak geç apoptotik hücrelerden kaynaklı olduğu tespit edildi. Bu nedenle bir sonra analizlerde ya 25 µg/ml zehir dozunun kullanılması ya da 24 saat uygulamanın yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.



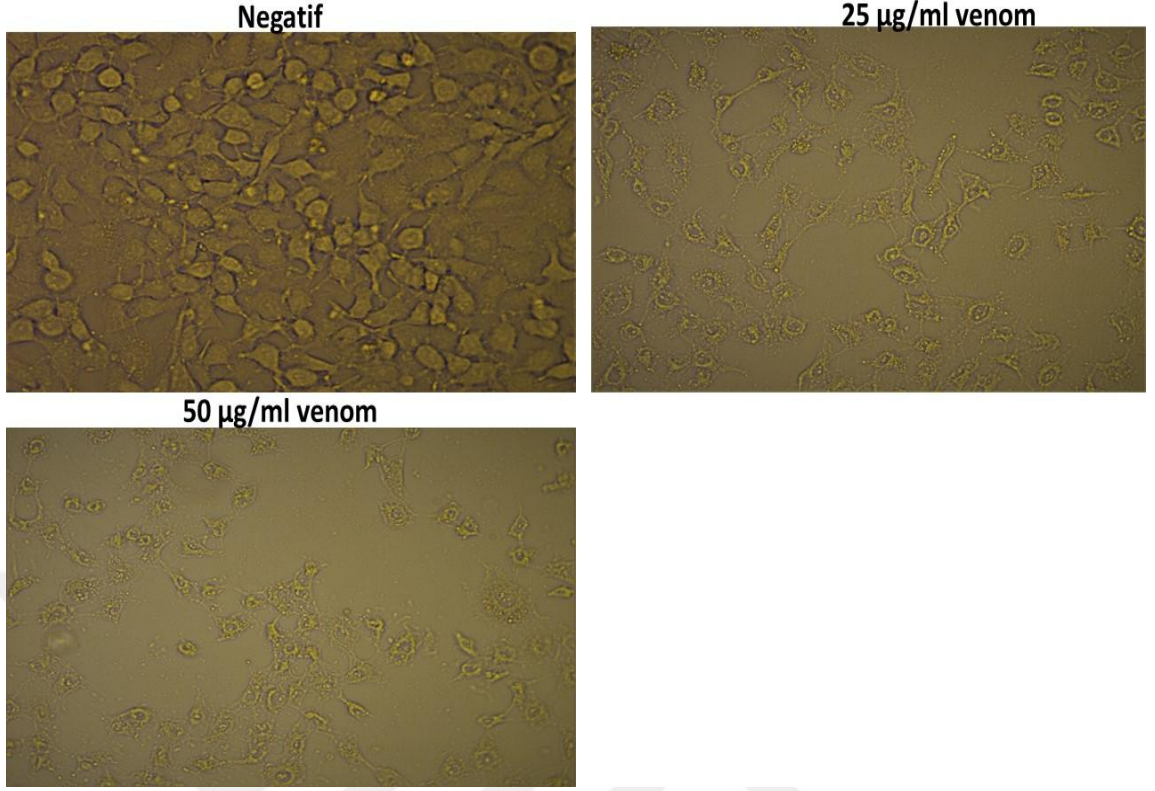
Şekil 4.3. Akrep zehrinin MDA-MB-231 hücre apoptozisi üzerindeki etkisinin Annexin-V ile incelenmesi.



Şekil 4.4. Akrep zehrinin MDA-MB-231 hücre apoptozisi üzerindeki etkisinin Annexin-V ile incelenmesi (% canlı, % apoptoz ve % nekroz olan hücrelerin dağılımı).

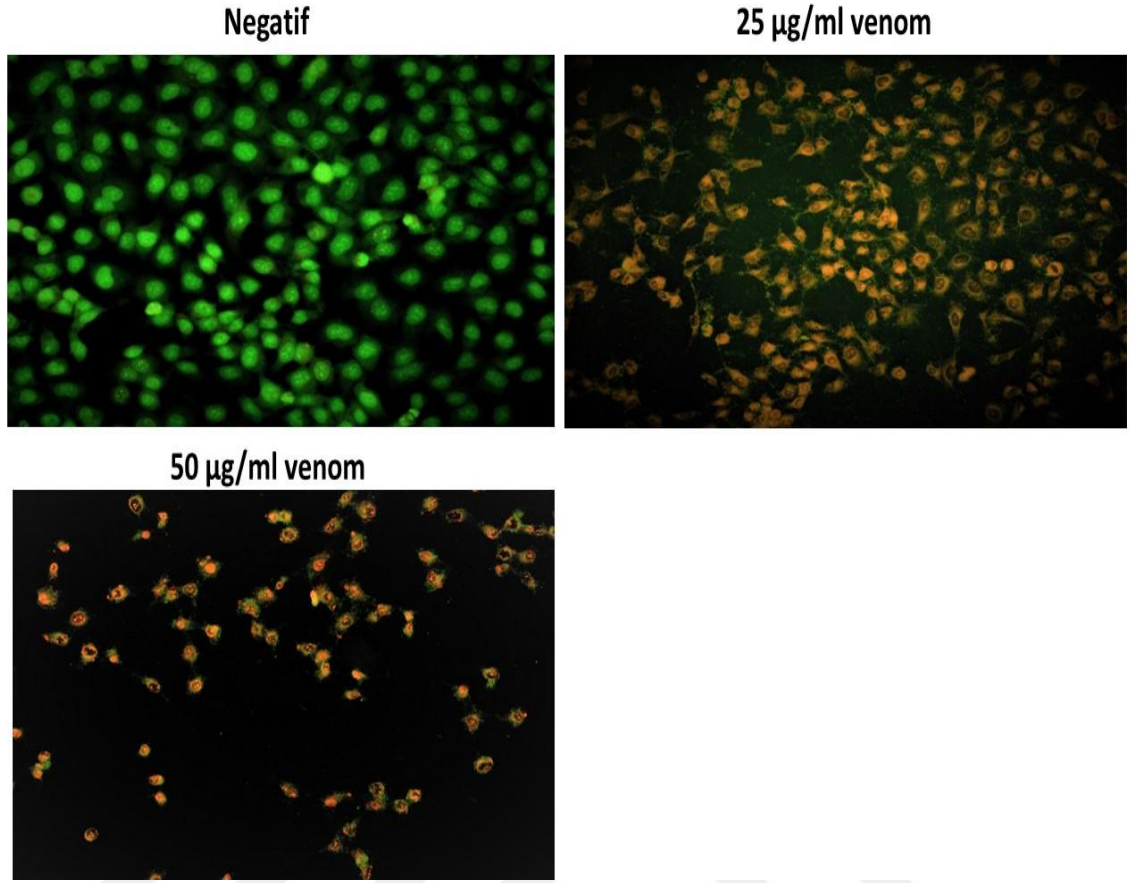
4.3. Akrep Zehrinin Apoptotik Etkiliğinin Morfolojik Olarak Floresan Mikroskop ile İncelenmesi

Akrep zehrinin meme kanseri hücreleri üzerinde apoptotik etkisinin morfolojik olarak tespiti için Acridine Orange /Ethidium Bromide metodu kullanıldı. Boyama sonunda lameller PBS ile yıkandıktan sonra kurutma kâğıdı üzerinde dik tutulması suretiyle boya uzaklaştırıldı ve floresans mikroskopta incelendi.



Şekil 4.5. Akrep zehri uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüsü.

Akrep zehri uygulanan hücrelerin görüntüleri incelendiğinde negatif gruba göre hücre sayısının azaldığı gözlemlendi. Ayrıca negatif gruba göre hücre morfolojilerinin de değiştiği gözlemlendi.



Şekil 4.6. Akrep zehri uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin flouresan görüntüsü.

Akridin oranj-etidyum bromür boyaması akrep zehrinin bileşiklerinin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Bu boya canlı ve ölü hücreler ile nükleusta ve hücre membranındaki nekroz ve apoptoza bağlı değişiklikler hakkında bilgi vermektedir.

Vital bir boya olan akridin oranj, hem canlı hem ölü hücreleri boyarken, etidyum bromür ise sadece membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyamaktadır. Canlı hücreler morfolojik olarak üniform yeşil renkli boyanırlar. Apoptozun erken dönemindeki hücreler de yeşil renkte boyanmakta ancak nükleuslarında, kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyonu gösteren parlak yeşil renkli noktalanmalar içerirler. Geç apoptotik dönemdeki hücreler de nekrotik hücreler gibi etidyum bromür ile turuncu renkte boyanırlar. Çalışmada hücreler etidyum bromür akridin oranj boyaları ile boyandıktan sonra floresan mikroskop kullanılarak morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Bu metodla edilen

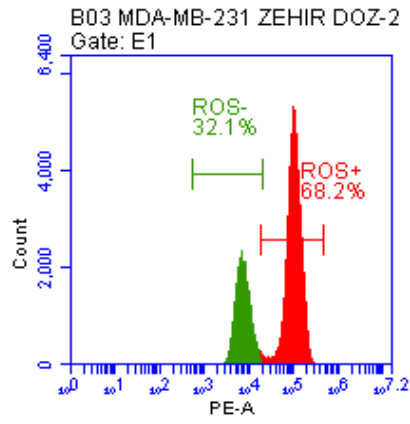
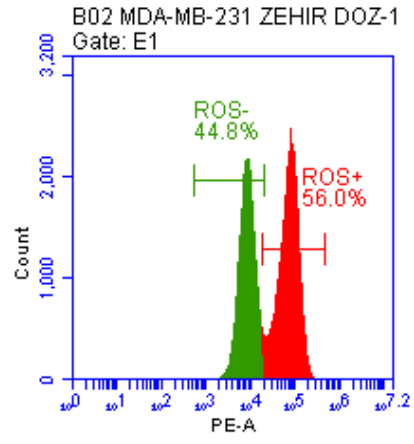
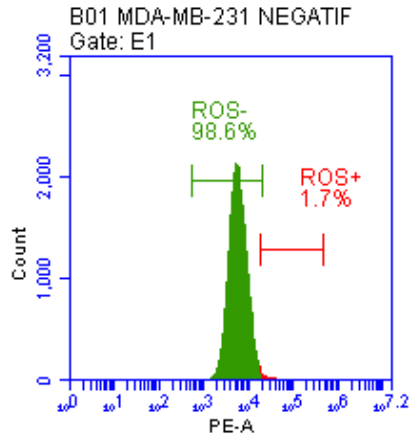
sonuçların diğer apoptotik testleri destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

4.4. Kanser Hücresinde Apoptozise Yol Açan Etkenlerin İncelenmesi

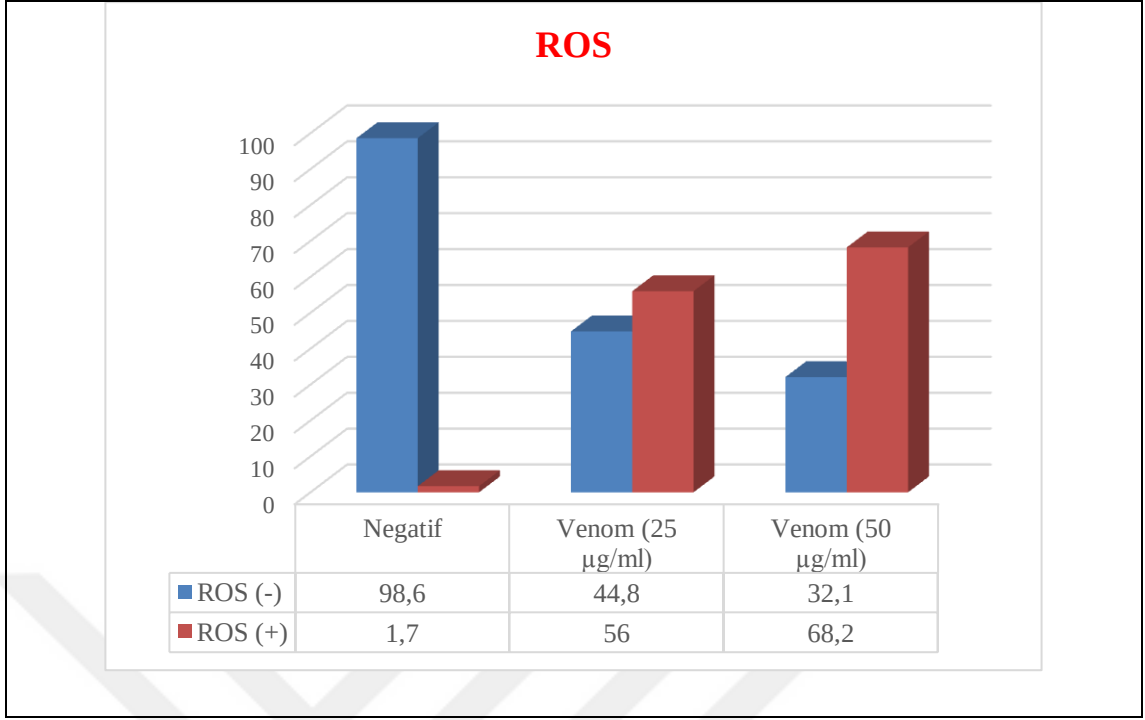
Akrep zehrinin MDA-MB231 meme kanseri hücrelerinde apoptozise neden olduğu tespit edildikten sonra, hangi etki ile apoptozisi tetiklediğini tespit etmek amacıyla aşağıda belirtilen analizler yapıldı.

4.4.1. Hücre İçi Serbest Radikal Değişimi Analizi (ROS)

Hücre içi artan serbest radikaller hücre DNA'sında hasara yol açarak apoptozis mekanizmasını tetikleyen en önemli mekanizmalardan birisidir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçların çoğunluğu bu etki mekanizması ile kanseri tedavi etmektedir. Çalışmamızda hücre içi serbest radikal ölçümü Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay kiti (Muse, Millipore) kullanılarak yapıldı.



Şekil 4.7. Akrep zehrinin MDA-MB-231 hücreleri hücre içi ROS üzerindeki etkileri (%).

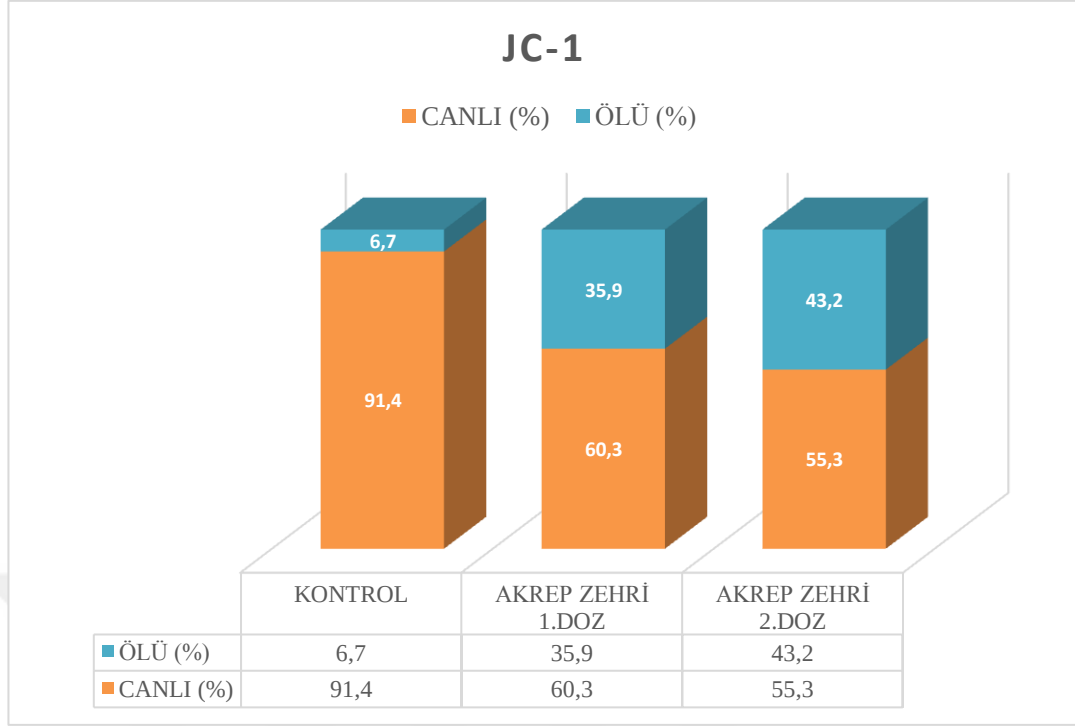


Şekil 4.8. Akrep zehrinin MDA-MB-231 hücreleri hücre içi ROS üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi (%)

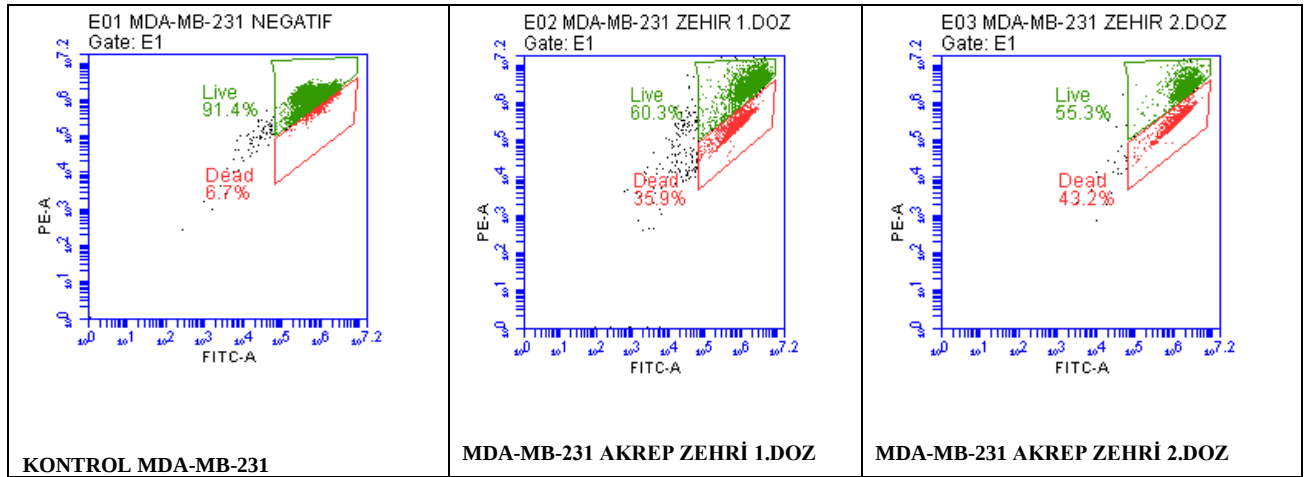
Akrep zehrinin MDA-MB-231 hücrelerinde doz artışına bağlı olarak hücre içi serbest radikal miktarını artırdığı gözlenmiştir.

4.4.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) ölçümü

MDA-MB-231 hücrelerinde JC-1 boyama sonucuna göre sırasıyla kontrol hücrelerindeki canlı hücre oranı %91,4 ve ölü hücre oranı %6,7; 1.doz'daki canlı hücre oranı %60,3 ve ölü hücre oranı %35,9 ve 2.doz'daki canlı hücre oranı %55,3 ve ölü hücre oranı %43,2 olarak bulunmuştur. Gruplar arası sonuçlar kıyaslandığında kontrol grubuna göre akrep zehrinin uygulandığı gruplarda ölü hücre oranı artmıştır. Artan dozlarda mitokondri membran potansiyelini bozarak ROS seviyesini arttırmış ve apoptotik genleri tetikleyerek hücrelerde apoptozisi uyardığı görülmüştür.



Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücrelerinin tüm gruplardaki mitokondri membrane potansiyeli ölçümünün grafiksel sonuçları Mavi: Ölü; Turuncu: Canlı hücre yüzdesini göstermektedir.



Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücrelerinin tüm gruplardaki mitokondri membran potansiyeli ölçümü (%)

4.5. Akrep Zehrinin Metabolit Profilinin İncelenmesi

Akrep zehri çeşitli enzimler ve peptidler gibi molekül ağırlı 5000 daltondan büyük makro moleküller ile aminoasit, organik asit ve yağ asitleri gibi küçük micro molekülleri içermektedir.

Tablo 4.2. Akrep zehrinin serbest aminoasit profilinin LC-MS/MS ile incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar.

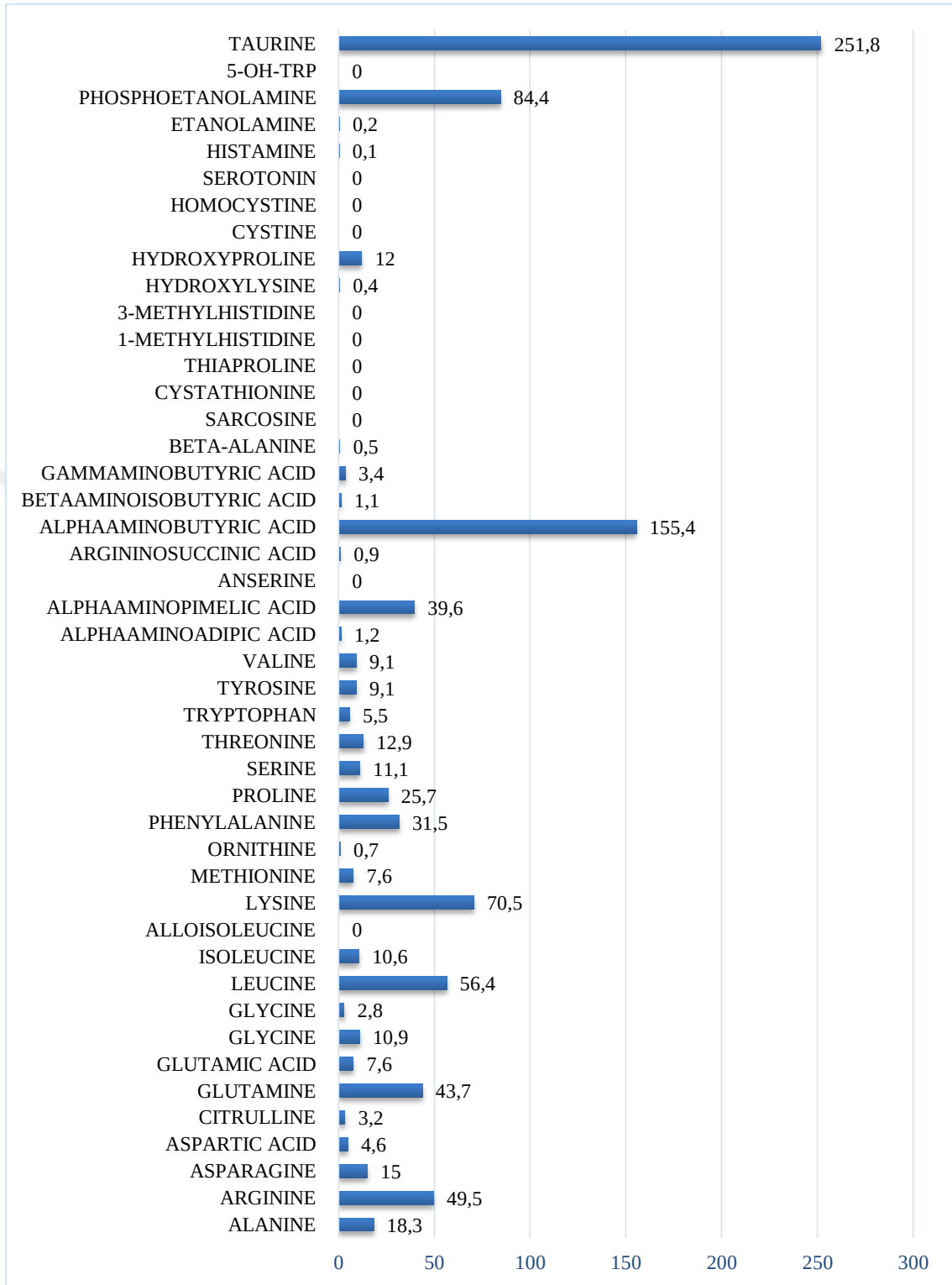
Aminoasit adı	Zehirde Tespit Edilen Miktarı (nmol/L)
ALANINE	18,3
ARGININE	49,5
ASPARAGINE	15,0
ASPARTIC ACID	4,6
CITRULLINE	3,2
GLUTAMINE	43,7
GLUTAMIC ACID	7,6
GLYCINE	10,9
GLYCINE	2,8
LEUCINE	56,4
ISOLEUCINE	10,6
ALLOISOLEUCINE	0,0
LYSINE	70,5
METHIONINE	7,6
ORNITHINE	0,7
PHENYLALANINE	31,5
PROLINE	25,7
SERINE	11,1
THREONINE	12,9
TRYPTOPHAN	5,5
TYROSINE	9,1
VALINE	9,1
ALPHAAMINOADIPIC ACID	1,2
ALPHAAMINOPIMELIC ACID	39,6
ANSERINE	0,0
ARGININOSUCCINIC ACID	0,9
ALPHAAMINOBUTYRIC ACID	155,4
BETAAMINOISOBUTYRIC ACID	1,1
GAMMAMINOBUTYRIC ACID	3,4
BETA-ALANINE	0,5
SARCOSINE	0,0
CYSTATHIONINE	0,0
THIAPROLINE	0,0
1-METHYLHISTIDINE	0,0
3-METHYLHISTIDINE	0,0
HYDROXYLYSINE	0,4
HYDROXYPROLINE	12,0
CYSTINE	0,0
HOMOCYSTINE	0,0
SEROTONIN	0,0
HISTAMINE	0,1
ETANOLAMINE	0,2
PHOSPHOETANOLAMINE	84,4
5-OH-TRP	0,0
TAURINE	251,8

Bu çalışmada akrep zehrinde bulunan serbest aminoasit miktarları LC-MS/MS yöntemleri ile tespit edildi.

Zehir serbest aminoasit profili LC-MS ile incelenmiş elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

LC/MS MS sonuçlarına göre; akrep zehrinde taurin, fosfoetanolamine, alfaaminobütirik asit, alfaaminopimelik asit, lizin, lösin amino asitleri varlığı tespit edilmiştir.





Şekil 4.11. Akrep zehrini serbest aminoasit profilinin LC-MS/MS ile incelenmesi sonucu elde edilen sonuçların grafik gösterimi(nmol/L).

5. TARTIŞMA

Kanser, tüm gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önde gelen ölüm nedenidir. 2016 yılında, yaklaşık 1,7 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık yarım milyon kanser ölümünün Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleşeceği öngörülmektedir. Kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi gibi çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır.

Bu tedavi türleri normal hücreler üzerinde olumsuz etkilere neden olarak, nörotoksisite, hepatotoksisite ve nefrotoksisite gibi çeşitli toksik yan etkilere neden olabilir (256).

Kanser kemoterapisinde kullanılmakta olan ilaçların önemli yan etkileri, terapötik yetersizlikleri ve etkide selektivite sorunları nedeniyle, kesin çözüm olabilecek bir tedavi yöntemi tam olarak geliştirilemediği için, bu yöndeki çalışmalar artarak devam etmekte ve güncelliğini korumaktadır. Bu yüzden etkin ve seçici kemoterapik yöntemlerin araştırılması kanser tedavisi için önem teşkil etmektedir. Bu nedenle araştırmacılar kanser tedavisinde kemoterapi yerine kullanılacak yeni alternatif tedavi stratejilerine yönelmektedir.

Son zamanlarda ise, hayvan zehirlerinin ve toksinlerinin ümit verici antikanser aktivitesini tespit etmeye yönelik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (216). Zehirler olumsuz etkileri ile bilinir ve insan için ciddi sağlık sorunlarına neden olurlar (217). Ancak, olumsuz etkilerine rağmen, bu zehirler farmakolojik olarak aktif bileşiklerin zengin bir kaynağıdır (257). Birkaç akrep zehiri peptidi birçok hastalıkta umut verici olmuştur. Yapısal ve fonksiyonel spesifikliği nedeniyle, akrep peptidleri, özellikle kardiyovasküler ve diğer immün hastalıklar için spesifik ilaçların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (219).

Akrep zehiri, peptidler, mukopolisakaritler, serbest amino asitler, fosfolipazlar, hiyalüronidazlar, aminler ve nükleotitler gibi çeşitli biyoaktif bileşikler içerir (108). Akrep peptidleri çeşitli akrep türlerinden tanımlanmıştır, ancak küçük türlerin zehirleri büyük ölçüde araştırılmamıştır.

Akrep zehiri bileşenlerinin çok çeşitli olması, toksikolojiden antivenom geliştirmeye ve terapötik uygulamalara kadar bu moleküller üzerinde çok çeşitli çalışmaları hızlandırdı. Özellikle akrep zehiri bileşenlerinin terapötik uygulamaları,

geniş bir hastalık yelpazesine karşı tedavilerin bulunmasına veya iyileştirilmesine yönelik acil ihtiyaç nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Akrepten türetilen biyoaktif moleküllerin farmakolojik özellikleri, diğerleri arasında antimikrobiyal, immünosupresif, bradikinin güçlendirici, analjezik ve antikanser etkilerini içerir.

Akrep zehrinin, kanser hücre döngüsünü S-fazında durdurduğu ve hücre proliferasyonu azalttığı böylece proliferatif bir bordür görevi görerek kanser hücrelerine neden olduğu için kansere karşı şaşırtıcı bir terapötik ajan olabilmektedir (216, 258).

Hint kara akrep (*Heterometrus bengalensis Koch*) zehiri, insan lösemik hücreleri (U937 ve K562) üzerinde araştırıldığında hücre büyümesi inhibisyonu, hücre döngüsü durması, apoptojenik özellikler ve antiproliferatif rol göstermiştir (259).

Asmari ve ark. 2018’de 2 akrep türü (*Androctonus crassicauda* ve *Leiurus quinquestriatus*) zehirleri üzerinde yaptığı bir çalışmaya göre her iki türde alınan zehirler; doza ve zamana bağlı bir şekilde meme ve kolorektal hücre hatları üzerinde sitotoksik etkiler gösterdi. Gelişmiş apoptotik hücreler, reaktif oksijen türlerinde artış ve bu hücre hatlarında akrep zehirleri ile muamelesi sonrası hücre döngüsü durması gözlemlendi (220).

Çalışmamızda Şanlıurfa’da yaygın olarak bulunan *Androctonus crassicauda* elde edilen zehirlerin antikanser özelliklerini belirledik. Sitotoksik etkinin uyarılması, kanser gelişiminin ayırt edici özelliği olan kontrolsüz hücre büyümesini engelleyebilen anahtar bir mekanizmadır. Uygun bir zehir dozu belirlemek için meme ve diğer kanser hücre hatlarında bu zehirlerin sitotoksikite ve IC₅₀ değerlerini ölçtük. Akrep zehrinin meme kanser (MD-MB 231) hücre hattına karşı sitotoksik (IC₅₀=47,4 µg/ml) etkisini gösterdik (CRL-4010 için IC₅₀=120,3 µg/ml).

Bu bulgulara ve yayınlanmış çalışmalara dayanarak, akrep zehrinin meme kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik özelliği olduğu sonucuna varılabilir.

Bir diğer önemli nokta, akrep zehri uygulanmış ve uygulanmamış hücre hatlarında ilgili moleküler olayları analiz etmek için ROS oluşumunu değerlendirmektir. Kanser hücrelerinin zehirle tedavisi stresli bir ortam yaratır. Akrep zehirleri ile tedavi edildikten sonra, hücreler sitotoksitenin daha da yükselmesine maruz kalır. Tümör hücrelerinde meydana gelen bu stresli olaylar, serbest

radikallerin oluşumunu tetikler ve dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin oluşumu başlar (249).

Meme kanser hücre hatlarında bu mekanizmayı aydınlatmak için, bu kanser hücre hattı üzerinde akrep zehrinin etkisi altında ROS oluşumunun kapsamını belirledik (Şekil 4.6). ROS için spesifik boya ile boyandığında ve Muse hücre analiz cihazında izlendiğinde 25 µg/ml ve 50 µg/ml zehirle muamele edilmiş hücre hatlarında zehir uygulanmamış hücre hatlarına göre ROS pozitif hücrelerde çarpıcı bir artış tespit ettik (sırasıyla %56- %68,2). Sonuçlarımız, hipoksinin kanser hücrelerinde ROS dahil olmak üzere serbest radikaller ürettiğini ve sonuçta anjiyogenezi modüle ettiğini öne süren bir mekanizma ile güçlü bir uyum içindedir. Bir sonraki önemli soru, ROS'un kanser hücrelerinin büyümesini ve ilerlemesini nasıl engellediğidir.

ROS'un DNA hasarının indüklenmesinde ve ayrıca birçok kanser türünün ilaç duyarlılığının değiştirilmesinde iyi bilinen bir oyuncu olduğunu belirtmek önemlidir (250,251). Ek olarak, ROS'un hücre ölümüne yol açan normal protein işlevini bozduğu daha önceki çalışmalar ile gösterilmiştir (260).

Apoptoz, programlanmış hücre ölümünün ana tiplerinden biridir. Organizmada ihtiyaç duyulmayan veya anormalleşmiş hücrelerden kurtulmanın normal yoludur. Akut hücresel zarar sonucu olan hücre ölümü tipi nekrozdan farklı olarak apoptoz belirli bir moleküler işlemler serisinin sonunda hücrenin ölümünü sağlar ve aynı zamanda organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve yararlıdır. Kanser hücre proliferasyonunda artış ve apoptozda azalmaya bağlı olarak geliştiği bilinmektedir. Böylece kanserde apoptoz kanserde belirleyici bir rol üstlenmektedir.

Apoptozun morfolojik özellikleri arasında membran ve hücreyi saran zarların bozulması, kromatin yoğunlaşması ve nükleozomal bozulma yer alır. Kemoterapinin neden olduğu hücre ölümünün mekanizması olarak kabul edilen apoptozu düzenleyen yollar, birçok klinik öncesi ilaç keşfi araştırmasının odak noktasıdır. Bu yollar genellikle DNA hasarı, artan reaktif oksijen türleri (ROS), viral enfeksiyon ve onkogenlerin aktivasyonu gibi hücre içi stres sinyallerine hücresel tepkinin bir sonucu olarak aktive edilir (22).

Akrep zehrinin yüksek ROS ve apoptoz üzerindeki etkisini incelemek için bu testi yaptık. Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, apoptotik ve ayrıca nekrotik hücrelerde algılanabilir bir artış tespit edildi. Apoptotik hücre yüzdesindeki artış, 25 µg/ml ve 50 µg/ml zehir uygulan hücre hatlarında sırasıyla %41,4 ve %31,8 kadar yüksekti.

Akrep zehirlerinin, apoptozu indükleyerek ve hücre döngüsü ilerlemesini engelleyerek kanser tedavisi için etkili ajanlar olduğu birçok defa belgelenmiştir (261-263).

Zehir tedavisi üzerine yapılan bu çalışmada DNA hasarının boyutu, DNA hasarını değerlendirmek ve çekirde bozulmayı analiz etmek için hücrelerin akrinin oranj-etidyum bromür ile boyanması ile değerlendirildi. Şekil 4.5'te de gösterildiği gibi MDA-MB-231 kanser hücre hatlarında zehir tedavisinde kromatin parçalanması, marjinalleşme ve çekirdekte şişme canlı bir şekilde gözlenmiştir. Akrep zehri uygulanan hücrelerin görüntüleri incelendiğinde negatif gruba göre hücre sayısının azaldığı gözlemlendi ve herhangi bir zehir uygulanmayan negatif gruba göre hücre morfolojilerinin de bozulduğu gözlemlendi (Şekil 4.4).

Çok sayıda literatür, çeşitli kanser türlerinde apoptozu indükleyen akrep zehirlerinin rolünü ortaya koymaktadır (264-269).

Mitokondri fonksiyonel durumunu yansıtan mitokondri membran potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) hücre farklılaşma durumu, tümörijenite ve malignite ile ilişkili olduğu bilinmektedir (269). Çalışmamızda MDA-MB-231 hücrelerinde JC-1 boyama sonucuna göre sırasıyla kontrol hücrelerindeki canlı hücre oranı %91,4 ve ölü hücre oranı %6,7; 1.doz'daki canlı hücre oranı %60,3 ve ölü hücre oranı %35,9 ve 2.doz'daki canlı hücre oranı %55,3 ve ölü hücre oranı %43,2 olarak bulunmuştur. Gruplar arası sonuçlar kıyaslandığında kontrol grubuna göre akrep zehrinin uygulandığı gruplarda ölü hücre oranı artmıştır.

Metabolomik; hücrelerde, biyolojik sıvılarda ve dokularda (metabolom olarak adlandırılan) bulunan tüm metabolit setini tanımlamayı ve ölçmeyi amaçlar. Endojen metabolitler, genom ile başlayan ve ardından transkriptom ve proteom ile devam eden bir dizi işlemin sonundadır. Bu nedenle metabolom, belirli bir genotip ve fenotip arasındaki boşluğu doldurur. Metabolom bileşenleri, aminler, amino asitler, organik asitler, steroidler, alkaloidler ve şekerler gibi bileşik sınıflarını içerir. "Omik" teknolojilerin tanıtılması, zehirler ve zehirli salgıların incelenmesinde devrim

yarattı. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu protein ve peptit profillemeye üzerine odaklanmıştır ve zehir ve zehirlerin düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonlarını araştıran sadece birkaç yayın mevcuttur(230). Çalışmamızda literatüre yardımcı olmak için akrep zehrinin metabolit profilini LC/MS-MS ile inceledik ve taurin, fosfoetanolamine, alfaaminobütirik asit, alfaaminopimelik asit, lizin, lösin amino asitlerinin varlığını tespit etti muhtemelen bu avını felç etmek ve hareketsiz hale getirmeyi sağlamıştır (Şekil 4.10). Daha önce yapılan bir çalışmada Akrep *Tityus serrulatus*'un zehrinde bulunan lizin ve triptofanın, avın hareketsiz kalmasına neden olur ve kaçmasını önlediği savunuldu(249). Literatüre baktığımızda bu çalışma için seçtiğimiz akrep türünün zehri daha önce hücresel ve moleküler düzeyde bu denli test edilmemişti. Bu nedenle, meme kanserine karşı bu zehirlerle ilgili çalışmamız bugüne kadar benzersizdir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada kullanılan akrep zehri, MDA-MB-231 kanser hücre hattında güçlü bir kemoterapik ajan potansiyeli göstermiştir. Bu nedenle, akrep zehrinin meme kanseri hastalarının tedavisinde alternatif bir araç olarak kullanılabileceği varsayılabilir ve bunun için daha fazla klinik öncesi deneye ihtiyaç olduğu söylenebilir.

Bu çalışmadan sonra yapılacak olan, zehir içeriğinin fraksiyonlanması ve akrep zehrinin etkili saf peptitlerinin izolasyonunda hangi hedef doğrultusunda nasıl hareket edileceği tespit edilmiş olacak, hayvan deneyleri gibi yeni projelere ışık tutacak ve özellikle kanser tedavisi için yeni ve özgün çalışma alanları oluşturacaktır. Buna ek olarak akrep zehrinin aminoasit profilini moleküler biyolojik yöntemler ile ortaya çıkarılarak kanser tedavisinde selektif yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine ışık tutacak verilerin elde edilmesi sağlamaya çalıştık.

7. KAYNAKLAR

1. Boyle P, Levin B. World cancer report 2008. Lyon: IARC Press, International Agency for Research on Cancer ; 2008.
2. Mariotto AB, Enewold L, Zhao J, Zeruto CA, Yabroff KR. Medical care costs associated with cancer survivorship in the United States. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2020; 29(7):1304-1312.
3. Rusciano D, Burger MM. Why do cancer cells metastasize into particular organs?. *Bioessays* 1992; 14(3):185-194.
4. Fidler IJ. Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 1989; 10(6):673-680.
5. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6(2):107-116.
6. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The lancet oncology* 2012; 13(8):790-801.
7. Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. *Current molecular medicine* 2012; 12(1):96-110.
8. Weinberg RA. Finding the anti-oncogene. *Scientific American* 1988; 259(3):44-53.
9. Nelson DA, Tan TT, Rabson AB, Anderson D, Degenhardt K, White, E. Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. *Genes & development* 2004; 18(17):2095-2107.
10. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews cancer* 2004 ;3(1):11-22.
11. Finver SN, Nishikura K, Finger LR, Haluska FG, Finan J, Nowell PC, et al. Sequence analysis of the MYC oncogene involved in the t (8; 14)(q24; q11) chromosome translocation in a human leukemia T-cell line indicates that putative regulatory regions are not altered. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988; 85(9): 3052-3056.

12. Friedenson B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. BMC cancer 2007; 7(1):1-11.
13. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. Science 1990; 249(4971):912-915.
14. Devilee P CJ. Cornelisse. Somatic genetic changes in human breast cancer. Biochim Biophys Acta 1994; 1198(2-3):113-30.
15. Biz AK. Potential Novel Molecular Targets for Breast Cancer Diagnosis and Treatment. Sweden: Doctoral dissertation, Karolinska Institutet; 2016.
16. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Tumor cells and the onset of cancer. Molecular cell biology 2000.
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144(5):646-674.
18. Develi ES. Yeni protoflavon bazlı hibrid bileşiklerin meme kanseri hücre soylarında sitotoksik/apoptotik etkilerinin araştırılması. İstanbul:Yüksek lisans tezi, İstinye Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2019.
19. International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Press release 2018; 263.
20. GLOBOCAN W. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2015.
21. Benson JR, Jatoi I. KM, Esteva FC, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. J Lancet 2009; 373(9673):1469-79.
22. Koyuncu I, Tülüce Y, Slahaddin Qadir H, Durgun M, Supuran CT. Evaluation of the anticancer potential of a sulphonamide carbonic anhydrase IX inhibitor on cervical cancer cells. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry 2019; 34(1):703-711.
23. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. Cancer biology & therapy 2010; 10(10):955-960.

24. Siegal R, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *Ca Cancer J Clin* 2014; 64(1):9-29.
25. Blackwood MA, Weber BL. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16(5):1969-1977.
26. Offit K, McGuire P, Schluger A, Hampel H, Brown K, Gilewski T, et al. Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. *The Lancet* 1996; 347(9016):1643-1645.
27. Frank TS, Manley SA, Olopade OI, Cummings S, Garber JE, Bernhardt B, et al. Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16(7):2417-2425.
28. Easton D, Thompson D, McGuffog L. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers: the breast cancer linkage consortium. *J National Cancer Institute* 1999; 91(15):1310-6.
29. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *The Lancet*; 343(8899): 692-695.
30. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 2015; 136(5):359-386.
31. Widakowich C, de Azambuja E, Gil T, Cardoso F, Dinh P, Awada A, et al. Molecular targeted therapies in breast cancer: where are we now?. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007; 39(7-8):1375-1387.
32. Chabner BA, Roberts TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5(1):65-72.
33. Matsen CB, Neumayer LA. Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA surgery* 2013; 148(10):971-980.
34. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the

- treatment of invasive breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2002; 347(16):1233-1241.
35. Biz AK. Potential Novel Molecular Targets for Breast Cancer Diagnosis and Treatment. Sweden: Doctoral dissertation, Karolinska Institutet; 2016.
 36. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992; 20(6):479-489.
 37. Elston CW. The assessment of histological differentiation in breast cancer. *Australian and New Zealand Journal of Surgery* 1984; 54(1):11-15.
 38. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem cells* 2009; 27(5):1050-1056.
 39. Drusano GL. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2(4):289-300.
 40. Temiz E, Koyuncu I, Durgun M, Caglayan M, Gonel A, Güler EM, et al. Inhibition of Carbonic Anhydrase IX Promotes Apoptosis through Intracellular pH Level Alterations in Cervical Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(11):6098.
 41. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438(7070):967-974.
 42. Conklin KA. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutrition and cancer* 2000; 37(1):1-18.
 43. Macdonald JS. Toxicity of 5-fluorouracil. *J Oncology* 1999; 13(7):33-4.
 44. Rexroth G, Scotland VJMK. Cardiac toxicity of 5-fluorouracil. *Medizinische Klinik* 1994; 89(12):680-688.
 45. Avilés A, Arévila N, Díaz Maqueo JC, Nambo MJ. Late cardiac toxicity of doxorubicin, epirubicin, and mitoxantrone therapy for Hodgkin's disease in adults. *Leukemia & lymphoma* 1993; 11(3-4):275-279.

46. Leo E, Arletti R, Forni F, Cameroni R. General and cardiac toxicity of doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles. *Farmaco* 1997; 52(6-7):385-388.
47. Kilickap S, Akgul E, Aksoy S, Aytemir K, Barista I. Doxorubicin-induced second degree and complete atrioventricular block. *EP Europace* 2005; 7(3):227-230.
48. Manil L, Mahieu P, Couvreur P. Acute renal toxicity of doxorubicin (adriamycin)-loaded cyanoacrylate nanoparticles. *Pharmaceutical research* 1995; 12(1):85-87.
49. Gibaud S, Andreux JP, Weingarten C, Renard M, Couvreur P. Increased bone marrow toxicity of doxorubicin bound to nanoparticles. *European Journal of Cancer* 1994; 30(6):820-826.
50. Adamson IY. Pulmonary toxicity of bleomycin. *Environmental health perspectives* 1976; 16:119-125.
51. Parvinen LM, Kilku P, Mäkinen E, Liukko P, Grönroos M. Factors affecting the pulmonary toxicity of bleomycin. *Acta Radiologica: Oncology* 1993; 22(6):417-421.
52. Karam H, Hurbain-Kosmath I, Housset B. Direct toxic effect of bleomycin on alveolar type 2 cells. *Toxicology letters* 1995; 76(2):155-163.
53. Cohen IS, Mosher MB, O'Keefe EJ, Klaus SN, De Conti RC. Cutaneous toxicity of bleomycin therapy. *Archives of dermatology* 1973; 107(4):553-555.
54. Fraiser LH, Kanekal S, Kehrler JP. Cyclophosphamide toxicity. *Drugs* 1991; 42(5):781-795.
55. Özkol H, Musa D, Tuluce Y, Koyuncu I. Ameliorative influence of *Urtica dioica* L against cisplatin-induced toxicity in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Drug and chemical toxicology* 2012; 35(3):251-257.
56. Koyuncu I, Kocyigit A, Gonel A, Arslan E, Durgun M. The protective effect of naringenin-oxime on cisplatin-induced toxicity in rats. *Biochemistry research international*, 2017.

57. Koyuncu İ. Investigation of the protective effect of naringenin on the cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2018; 7(1):119-125.
58. Wang S, Placzek WJ, Stebbins JL, Mitra S, Noberini R, Koolpe M, et al. Novel targeted system to deliver chemotherapeutic drugs to EphA2-expressing cancer cells. *Journal of medicinal chemistry* 2012; 55(5):2427-2436.
59. Love RR, Koroltchouk V. Tamoxifen therapy in breast cancer control worldwide. *Bulletin of the World Health Organization* 1993; 71(6):795.
60. Meiser B, Wong WT, Peate M, Julian-Reynier C, Kirk J, Mitchell G. Motivators and barriers of tamoxifen use as risk-reducing medication amongst women at increased breast cancer risk: a systematic literature review. *Hereditary cancer in clinical practice* 2017; 15(1):1-9.
61. Cuzick J, Sestak I, Bonanni B, Costantino JP, Cummings S, DeCensi A, et al. Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *The Lancet* 2013; 381(9880):1827-1834.
62. Nazarali SA, Narod SA. Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy* 2014; 6:29.
63. Narod SA Tamoxifen chemoprevention end of the road?. *JAMA oncology* 2015; 1(8):1033-1034.
64. Karpiński TM, Adameczak A. Anticancer activity of bacterial proteins and peptides. *Pharmaceutics* 2018; 10(2):54.
65. Gao J, Yang X, Yin W, Li M. Gallnuts: a potential treasure in anticancer drug discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
66. Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 1997; 278(5340):1073-1077.
67. Temiz E, Koyuncu İ, Saadat S, Yüksekdağ Ö. Exploring the Antiproliferative Mechanisms of *Urtica dioica* L. extract in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2021; 18(3):468-474.

68. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products* 2012; 75(3):311-335.
69. Cragg GM, Newman DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry reviews* 2009; 8(2):313-331.
70. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical reviews* 2009; 109(7):3012-3043.
71. Grothaus PM, Cragg G, Newman D. Plant natural products in anticancer drug discovery. *J Current Organic Chemistry* 2010; 14(16):1781-91.
72. Basmadjian C, Zhao Q, Bentouhami E, Djehal A, Nebigil CG, Johnson RA, et al. Cancer wars: natural products strike back. *Frontiers in chemistry* 2014; 2:20.
73. Cragg GM, Kingston DG, Newman DJ. *Anticancer agents from natural products*. Florida: CRC press; 2005.
74. Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol* 2011; 4(6):687-99.
75. Verdine G. L. The combinatorial chemistry of nature. *Nature* 1996; 384(6604):11-13.
76. Cragg GM, Kingston DG, Newman DJ. *Anticancer agents from natural products*. Ed. 2. Florida: CRC press; 2012.
77. Cragg GM, Pezzuto JM. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Medical Principles and Practice* 2016; 25(2):41-59.
78. Koyuncu İ. Urfa fıstığından (*Pistacia vera* L.) elde edilen çeşitli ekstraktların antikanser özelliklerinin incelenmesi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2018; 15(2):72-75.
79. Koyuncu I. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. extract. *Cellular and Molecular Biology* 2018; 64(3):25-34.

80. Koyuncu I, Guler EM, Kocyigit A, Yuksekdağ O, Kirmit A. Antioxidant and anticancer effect of *Artemisia absinthium* extract on colon and endometrium adenocarcinoma cells. *BezmiAlem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2016; 283:203.
81. Koyuncu I, Koçyiğit A, Dikme R, Selek Ş. Phytotherapeutic Properties of Urfa Pistachio Nuts (*Pistacia vera* L.). *BezmiAlem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2018.
82. Koyuncu İ, Gönel A, Temiz E, Karaoğul E, Uyar Z. Pistachio Green Hull Extract Induces Apoptosis Through Multiple Signaling Pathways by Causing Oxidative Stress on Colon Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2021; 21(6):725-737.
83. Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature reviews drug discovery* 2003; 2(10):790-802.
84. Yang S, Xiao Y, Kang D, Liu J, Li Y, Undheim EA, et al. Discovery of a selective NaV1.7 inhibitor from centipede venom with analgesic efficacy exceeding morphine in rodent pain models. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; 110(43):17534-17539.
85. Muttenthaler M, King GF, Adams DJ, Alewood PF. Trends in peptide drug discovery. *J Nature Reviews Drug Discovery* 2021; 20(4):309-25.
86. Vetter I, Davis JL, Rash LD, Anangi R, Mobli M, Alewood PF, et al. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino acids* 2011; 40(1):15-28.
87. King G. Venoms to drugs: venom as a source for the development of human therapeutics. *Royal Society of Chemistry* 2015.
88. Klint JK, Senff S, Saez NJ, Seshadri R, Lau HY, Bende NS, et al. Production of recombinant disulfide-rich venom peptides for structural and functional analysis via expression in the periplasm of *E. coli*. *PloS one* 2013; 8(5):63865.
89. King G. Venoms to drugs: venom as a source for the development of human therapeutics. *Royal Society of Chemistry* 2015.
90. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today* 2015; 20(1):122-128.

91. Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2018; 26(10):2700-2707.
92. Mobli M, Undheim EA, Rash LD. Modulation of ion channels by cysteine-rich peptides: from sequence to structure. In *Advances in Pharmacology* 2017; 79:199-223. Academic Press.
93. Animal Toxins Sabatier J, Michel D, editors. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*; 2017. p.407-15.
94. De Waard M, Sabatier JM. Structure-function strategies to improve the pharmacological value of animal toxins. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Cambridge: Academic Press; 2017. p. 415-419.
95. Pennington MW, Czerwinski A, Norton RS. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2018; 26(10):2738-2758.
96. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 2003; 42(8):885-901.
97. Duffy C, Sorolla A, Wang E, Golden E, Woodward E, Davern K, et al. Honeybee venom and melittin suppress growth factor receptor activation in HER2-enriched and triple-negative breast cancer. *NPJ precision oncology* 2020; 4(1):1-16.
98. Arzamasov AA, Vassilevski AA, Grishin EV. Chlorotoxin and related peptides: Short insect toxins from scorpion venom. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2014; 40(4):359-369.
99. Kastin A. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Cambridge: Academic Press; 2013. p.473-82.
100. Kastin A ed. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Cambridge: Academic Press; 2013.
101. Gao B, Peng C, Yang J, Yi Y, Zhang J, Shi Q. Cone snails: A big store of conotoxins for novel drug discovery. *Toxins* 2017; 9(12):397.

102. Wehbe R, Frangieh J, Rima M, El Obeid D, Sabatier JM, Fajloun Z. Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules* 2019; 24(16):2997.
103. Leandro LF, Mendes CA, Casemiro LA, Vinholis AH, Cunha WR, Almeida RD, et al. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A 2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2015; 87:147-155.
104. Warrell DA. Animals hazardous to humans: venomous bites and stings and envenoming. In: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Amsterdam: Elsevier; 2020. p. 966-87.
105. Wang SZ, Xu YL, Zhu Q, Kou JQ, Qin ZH. Cobrotoxin from *Naja naja atra* venom ameliorates adriamycin nephropathy in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015.
106. Lin F, Reid PF, Qin ZH. Cobrotoxin could be an effective therapeutic for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica* 2020; 41(9):1258-1260.
107. White J, Meier J. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Florida: CRC press; 2017.
108. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon* 2015; 93:125-135.
109. Frost LM, Butler DR, O'Dell B, Fet V. A coumarin as a fluorescent compound in scorpion cuticle. *Scorpions* 2001; 363-368.
110. Özkan Ö, Karaer KZ. Akreplerin biyolojisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2007; 64(1):51-60.
111. Erdeş E. Peptidomic characterization and bioactivity screening of *Leiurus abduhbayrami* (scorpiones: *buthidae*) venom. Ankara: Master's thesis, Middle East Technical University; 2015.
112. Demir MA. *Androctonus crassicauda* Akrep Türünün Diş Morfolojik Özelliklerinin Taramalı Elektron Mikroskopla Belirlenmesi ve Zehirinin Biyokimyasal Analizi. Kastamonu: Doctoral dissertation, Kastamonu Üniversitesi; 2020.

113. Possani LD, de la Vega RC. R: Scorpion venom peptides. Handbook of biologically active peptides 2006; 1:339-354.
114. Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani L. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* 2013; 76:328-342.
115. Rash LD, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 2002; 40(3):225-254.
116. Delepierre M, Prochnicka-Chalufour A, Boisbouvier J, Possani LD. Pi7, an orphan peptide from the scorpion *Pandinus imperator*: a ¹H-NMR analysis using a nano-NMR Probe. *Biochemistry* 1999; 38(51):16756-16765.
117. Srinivasan KN, Gopalakrishnakone P, Tan PT, Chew KC, Cheng B, Kini RM, et al. SCORPION, a molecular database of scorpion toxins. *Toxicon* 2002; 40(1):23-31.
118. Tan PT, Veeramani A, Srinivasan KN, Ranganathan S, Brusic V. Scorpion 2: a database for structure–function analysis of scorpion toxins. *Toxicon* 2006; 47(3):356-363.
119. De Lima ME, Figueiredo SG, Pimenta AMC, Santos DM, Borges MH, Cordeiro MN, et al. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2007; 146(1-2):264-279.
120. Escoubas P, Rash L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon* 2004; 43(5):555-574.
121. Bosmans F, Tytgat J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon* 2007; 49(2):142-158.
122. Du Plessis LH, Elgar D, Du Plessis JL. Southern African scorpion toxins: an overview. *Toxicon* 2008; 51(1):1-9.
123. Yuan W, Cao L, Ma Y, Mao P, Wang W, Zhao R, et al. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. *Peptides* 2010; 31(1):22-26.

124. De la Vega RCR, Schwartz EF, Possani LD. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 2010; 56(7):1155-1161.
125. Kozlov S, Lipkin A, Nosyreva E, Blake A, Windass JD, Grishin E. Purification and cDNA cloning of an insecticidal protein from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. *Toxicon* 2000; 38(3):361-371.
126. Xiong YM, Lan ZD, Wang M, Liu B, Liu XQ, Fei H, et al. Molecular characterization of a new excitatory insect neurotoxin with an analgesic effect on mice from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 1999; 37(8):1165-1180.
127. Wang CG, He XL, Shao F, Liu W, Ling MH, Wang DC, et al. Molecular characterization of an anti- epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *European journal of biochemistry* 2001; 268(8):2480-2485.
128. Conde R, Zamudio FZ, Rodríguez MH, Possani LD. Scorpine, an anti- malaria and anti- bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS letters* 2000; 471(2-3):165-168.
129. Torres- Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *European journal of biochemistry* 2000; 267(16):5023-5031.
130. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal* 2001; 359(1):35-45.
131. Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, et al. Antibacterial and antifungal properties of α - helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European journal of biochemistry* 2002; 269(19):4799-4810.
132. Díaz P, D'Suze G, Salazar V, Sevcik C, Shannon JD, Sherman NE, et al. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na^+ permeability changes. *Toxicon* 2009; 54(6):802-817.

133. King GF, Hardy MC. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. *Annual review of entomology* 2013; 58:475-496.
134. Daly NL, Craik DJ. Bioactive cystine knot proteins. *Current opinion in chemical biology* 2011; 15(3):362-368.
135. Zeng XC, Corzo G, Hahin R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB life* 2005; 57(1):13-21.
136. Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 2000; 82(9-10):861-868.
137. Goudet C, Chi CW, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 2002; 40(9):1239-1258.
138. Zhijian C, Feng L, Yingliang W, Xin M, Wenxin L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon* 2006; 47(3):348-355.
139. Zhijian C, Feng L, Yingliang W, Xin M, Wenxin L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon* 2006; 47(3):348-355.
140. Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺- channels. *European journal of biochemistry* 1999; 264(2):287-300.
141. Couraud F, Jover E, Dubois JM, Rochat H. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 1982; 20(1):9-16.
142. Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in pharmacological sciences* 1999; 20(11):444-447.
143. De La Vega RR, Garcia BI, D'Ambrosio C, Diego-Garcia E, Scaloni A, Possani, LD. Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2004; 61(12):1507-1519.

144. Possani LD, Martin BM, Svendsen IB. The primary structure of noxiustoxin: AK⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Carlsberg Research Communications 1982; 47(5):285-289.
145. De La Vega RCR, Possani LD. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. Toxicon 2004; 43(8):865-875.
146. Diego-García E, Peigneu S, Debaveye S, Gheldof E, Tytgat J, Caliskan F. Novel Potassium Channel Blocker Venom Peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae). Toxicon 2012; 60(2):181-181.
147. Castle NA. Pharmacological modulation of voltage-gated potassium channels as a therapeutic strategy. Expert opinion on therapeutic patents ; 20(11):1471-1503.
148. Corona M, Gurrola GB, Merino E, Cassulini RR, Valdez-Cruz NA, García B, et al. A large number of novel Ergotoxin- like genes and ERG K⁺- channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. FEBS letters 2002; 532(1-2):121-126.
149. Asher V, Sowter H, Shaw R, Bali A, Khan R. Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. World journal of surgical oncology 2010; 8(1):1-9.
150. Srinivasan KN, Sivaraja V, Huys I, Sasaki T, Cheng B, Kumar TKS, et al. κ -Hefutoxin1, a Novel Toxin from the Scorpion *Heterometrus fulvipes* with Unique Structure and Function: Importance Of The Functional Diad In Potassium Channel Selectivity. Journal of Biological Chemistry 2002; 277(33):30040-30047.
151. Tytgat J, Debont T, Rostoll K, Müller GJ, Verdonck F, Daenens P, et al. Purification and partial characterization of a 'short' insectotoxin- like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri*. FEBS letters 1998; 441(3):387-391.
152. Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ, Coronado R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca (2⁺)-release channel of skeletal and cardiac muscle. Proceedings of the National Academy of Sciences 1992; 89(24):12185-12189.

153. Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature neuroscience* 1998; 1(8):668-674.
154. Sidach SS, Mintz IM. Kurtxin, a gating modifier of neuronal high-and low-threshold Ca channels. *Journal of Neuroscience* 2002; 22(6):2023-2034.
155. DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American journal of physiology-cell physiology* 1993; 264(2):361-369.
156. Lyons SA, O'Neal J, Sontheimer H. Chlorotoxin, a scorpion- derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. *Glia* 2002; 39(2):162-173.
157. Zeng XC, Li WX, Zhu SY, Peng F, Zhu ZH, Wu KL, et al. Cloning and characterization of a cDNA sequence encoding the precursor of a chlorotoxin-like peptide from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 2000; 38(8):1009-1014.
158. Ali SA, Stoeva S, Schütz J, Kaye R, Abassi A, Zaidi ZH, et al. Purification and primary structure of low molecular mass peptides from scorpion (*Buthus indicus*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 1998; 121(4):323-332.
159. Lee H, Jung ES, Kang C, Yoon WD, Kim JS, Kim E. Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon* 2011; 58(3):277-284.
160. Incesu Z, Caliskan F, Zeytinoglu H. Cytotoxic and gelatinolytic activities of *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832) venom. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 2005; 36.
161. Almaaytah A, Albalas Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. *Peptides* 2014; 51:35-45.
162. Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology* 2006; 24(12):1551-1557.

163. Dai C, Ma Y, Zhao Z, Zhao R, Wang Q, Wu Y, et al. Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; 52(11):3967-3972.
164. Gwee MC, Nirthanan S, Khoo HE, Gopalakrishnakone P, Kini RM, Cheah LS. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2002; 29(9):795-801.
165. Petricevich VL. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators of inflammation* 2010.
166. Kemparaju K, Girish KS. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease* 2006; 24(1):7-12.
167. Xu X, Wang X, Xi X, Liu J, Huang J, Lu Z. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon* 1982; 20(6):973-981.
168. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life sciences* 2007; 80(21):1921-1943.
169. Feng L, Gao R, Gopalakrishnakone P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2008;148(3):250-257.
170. Morey SS, Kiran KM, Gadag JR. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 2006; 47(2):188-195.
171. Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 2001; 39(10):1495-1504.
172. Valdez-Cruz NA, Segovia L, Corona M, Possani LD. Sequence analysis and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaidactylus*. *Gene* 2007; 396(1):149-158.

173. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling1. *Journal of lipid research* 2009; 50:237-242.
174. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2000; 1488(1-2):1-19.
175. Valentin E, Lambeau G. What can venom phospholipases A2 tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A2?. *Biochimie* 2000; 82(9-10):815-831.
176. Zamudio FZ, Conde R, Arévalo C, Becerril B, Martin BM, Valdivia HH, et al. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(18):11886-11894.
177. Incamnoi P, Patramanon R, Thammasirirak S, Chaveerach A, Uawonggul N, Sukprasert S, et al. Heteromtoxin (HmTx), a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon* 2013; 61:62-71.
178. Perumal Samy R, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Chow TKV, Bow H, Yap EH, et al. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. *Journal of applied microbiology* 2007; 102(3):650-659.
179. Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 114(5):997-1008.
180. Almeida FM, Pimenta AMC, De Figueiredo SG, Santoro MM, Martin-Eauclaire MF, Diniz CR, et al. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 2002; 40(7):1041-1045.
181. Valdez-Velázquez LL, Quintero-Hernández V, Romero-Gutiérrez MT, Coronas FI, Possani LD. Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of scorpion *Centruroides tecomanus*. *PloS one* 2013; 8(6):e66486.

182. Fletcher MD, Weninger K, Anderson TE, Martin BM. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(10):7405-7416.
183. Gao R, Zhang Y, Gopalakrishnakone P. Purification and N-terminal sequence of a serine proteinase-like protein (BMK-CBP) from the venom of the Chinese scorpion (*Buthus martensii* Karsch). *Toxicon* 2008; 52(2):348-353.
184. Du XY, Clemetson KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon* 2002; 40(6):659-665.
185. De Vieira Santos MM, Sant'Ana CD, Giglio JR, Da Silva RJ, Sampaio SV, Soares AM, et al. Antitumoural effect of an L- amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2008; 102(6):533-542.
186. Tan NH, Fung SY. Snake venom L-amino acid oxidases and their potential biomedical applications. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2008; 16(1):1-10.
187. Caliskan F. Scorpion venom research around the world: Turkish scorpions. *Scorpion venoms* 2015; 327-349.
188. Tropea G, Yağmur EA. Two New Species of *Euscorpius* Thorell, 1876 from Southern Turkey (Scorpiones: Euscorpiidae). *Euscorpius* 2016; 234:1-19.
189. Olivier AG. No. 92. Paropsidae, Paropsis. *Entomologie, ou Histoire Naturelle des Insectes, avec leurs caractères génériques et spécifiques, leur description, leur synonymie, et leurs figure enluminée. Coléoptères*, 1807; 596-605.
190. Caliskan F, García BI, Coronas FI, Batista CV, Zamudio FZ, Possani LD. Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. *Toxicon* 2006; 48(1):12-22.
191. Caliskan F, Ergene E, Sogut I, Hatipoglu I, Basalp A, Sivas H, et al. Biological assays on the effects of Acra3 peptide from Turkish scorpion *Androctonus crassicauda* venom on a mouse brain tumor cell line (BC3H1)

- and production of specific monoclonal antibodies. *Toxicon* 2013; 76:350-361.
192. Caliskan F, Quintero-Hernández V, Restano-Cassulini R, Coronas-Valderrama FI, Corzo G, Possani LD. Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na⁺-channel α -type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom. *Biochimie* 2013; 95(6):1216-1222.
 193. 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* 2010; 16:505-508.
 194. Wang WX, Ji YH. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. *Journal of neuro-oncology* 2005; 73(1):1-7.
 195. Veisheh M, Gabikian P, Bahrami SB, Veisheh O, Zhang M, Hackman RC, et al. Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5. 5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer research* 2007; 67(14):6882-6888.
 196. Lui VCH, Lung SSS, Pu JKS, Hung KN, Leung GKK. Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including ClC-3. *Anticancer Research* 2010; 30(11):4515-4524.
 197. Gimenez-Gallego G, Navia MA, Reuben JP, Katz GM, Kaczorowski GJ, Garcia, ML. Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988; 85(10):3329-3333.
 198. Shao J, Kang N, Liu Y, Song S, Wu C, Zhang J. Purification and characterization of an analgesic peptide from *Buthus martensii* Karsch. *Biomedical Chromatography* 2007; 21(12):1266-1271.
 199. Chen Y, Cao L, Zhong M, Zhang Y, Han C, Li Q, et al. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. *PloS one* 2012; 7(4):e34947.

200. Ding J, Chua PJ, Bay BH, Gopalakrishnakone P. Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. *Experimental biology and medicine* 2014; 239(4):387-393.
201. Zhang FT, Xu ZS, Qi YX. A preliminary research of the antineoplastic effects induced by *Buthus martensii* of Chinese drug-I. Observation of the effect on mice with tumor. *J Gannan Med Coll* 1987; 6:1-5.
202. Zhang YY, Wu LC, Wang ZP, Wang ZX, Jia Q, Jiang GS, et al. Anti-proliferation effect of polypeptide extracted from scorpion venom on human prostate cancer cells in vitro. *Journal of clinical medicine research* 2009; 1(1):24.
203. Liu C, Russell RM. Nutrition and gastric cancer risk: an update. *Nutrition reviews* 2008; 66(5):237-249.
204. Cui Y, Liu Y, Chen Q, Zhang R, Song Y, Jiang Z, et al. Genomic cloning, characterization and statistical analysis of an antitumor-analgesic peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 2010; 56(3):432-439.
205. Zhao Y, Cai X, Ye T, Huo J, Liu C, Zhang S, et al. Analgesic- antitumor peptide inhibits proliferation and migration of SHG- 44 human malignant glioma cells. *Journal of cellular biochemistry* 2011; 112(9):2424-2434.
206. Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *Journal of biological chemistry* 2003; 278(6):4135-4144.
207. 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. *Chemico-biological interactions* 2010; 183(2):293-303.
208. D'Suze G, Rosales A, Salazar V, Sevcik C. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon* 2010; 56(8):1497-1505.
209. Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion (*Odontobuthus doriae*) venom induces apoptosis and inhibits DNA synthesis in human neuroblastoma cells. *Molecular and cellular biochemistry* 2011; 348(1):173-181.

210. Zargan J, Umar S, Sajad M, Naime M, Ali S, Khan HA. 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* 2011; 25(8):1748-1756.
211. Chen Z, Luo F, Feng J, Yang W, Zeng D, Zhao R, et al. Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins. *PLoS One* 2013; 8(4):60201.
212. Ghosh A, Roy R, Nandi M, Mukhopadhyay A. Scorpion venom–toxins that aid in drug development: a review. *International journal of peptide research and therapeutics* 2019; 25(1):27-37.
213. Gomes A, Bhattacharjee P, Mishra R, Biswas AK, Dasgupta SC, Giri B, et al. Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian J Exp Biol* 2010.
214. Giovannini C, Baglioni M, Toaldo MB, Cescon M, Bolondi L, Gramantieri L. Vidatox 30 CH has tumor activating effect in hepatocellular carcinoma. *Scientific reports* 2017; 7(1):1-11.
215. Giovannini C, Baglioni M, Toaldo MB, Cescon M, Bolondi L, Gramantieri L. Vidatox 30 CH has tumor activating effect in hepatocellular carcinoma. *Scientific reports* 2017; 7(1):1-11.
216. Lorenzo LD, Chiara P, Antonio C, Calogero F. Cancer pain management with a venom of blue scorpion endemic in Cuba, called *rhopalurus junceus* “escozul”. *The Open Cancer Journal* 2012; 5(1).
217. Veiga ABG, Berger M, Guimarães JA. *Lonomia obliqua* venom: pharmaco-toxicological effects and biotechnological perspectives. *Animal toxins: the state of the art. perspectives on health and biotechnology*, 1st edn. UFMG, Belo Horizonte 2009; 371-390.
218. Andreotti N, Jouirou B, Mouhat S, Mouhat L, Sabatier JM. Therapeutic value of peptides from animal venoms 2010.
219. Uzair B, Bint-e-Irshad S, Khan BA, Azad B, Mahmood T, Rehman MU et al. Scorpion venom peptides as a potential source for human drug candidates. *Protein and peptide letters* 2018; 25(7):702-708.

220. Al-Asmari AK, Riyasdeen A, Islam M. Scorpion venom causes apoptosis by increasing reactive oxygen species and cell cycle arrest in MDA-MB-231 and HCT-8 cancer cell lines. *Journal of evidence-based integrative medicine* 2018; 23: 2156587217751796.
221. Klupczynska A, Pawlak M, Kokot ZJ, Matysiak J. Application of metabolomic tools for studying low molecular-weight fraction of animal venoms and poisons. *Toxins* 2018; 10(8):306.
222. Von Reumont BM, Campbell LI, Jenner RA. Quo vadis venomomics? A roadmap to neglected venomous invertebrates. *Toxins* 2014; 6(12):3488-3551.
223. Juárez P, Sanz L, Calvete JJ. Snake venomomics: Characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N- terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. *Proteomics* 2004; 4(2):327-338.
224. Bazaa A, Marrakchi N, El Ayeb M, Sanz L, Calvete JJ. Snake venomomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. *Proteomics* 2005; 5(16):4223-4235.
225. Ménez A, Stocklin R, Mebs D. 'Venomics' or: The venomous systems genome project. *Toxicon (Oxford)*; 47(3):255-259.
226. Sunagar K, Morgenstern D, Reitzel AM, Moran Y. Ecological venomomics: How genomics, transcriptomics and proteomics can shed new light on the ecology and evolution of venom. *Journal of proteomics* 2016; 135:62-72.
227. Tan NH, Wong KY, Ta CH. Venomomics of *Naja sputatrix*, the Javan spitting cobra: A short neurotoxin-driven venom needing improved antivenom neutralization. *Journal of proteomics* 2017; 157:18-32.
228. Biass D, Violette A, Hulo N, Lisacek F, Favreau P, Stöcklin R. Uncovering intense protein diversification in a cone snail venom gland using an integrative venomomics approach. *Journal of proteome research* 2015; 14(2):628-638.
229. Viala VL, Hildebrand D, Trusch M, Fucase TM, Sciani JM, Pimenta DC, et al. Venomomics of the Australian eastern brown snake (*Pseudonaja textilis*):

Detection of new venom proteins and splicing variants. *Toxicon* 2015; 107:252-265.

230. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29(11):1181-1189.
231. Gonel A, Koyuncu I, Aksoy M, Celik H. Metabolomics in Lipoid Proteinosis. *Current Metabolomics and Systems Biology Formerly: Current Metabolomics* 2020; 7(1):32-41.
232. Hu B, Wang L, Ye WC, Yao ZP. In vivo and real-time monitoring of secondary metabolites of living organisms by mass spectrometry. *Scientific reports* 2013; 3(1):1-4.
233. Aird SD, Villar Briones A, Roy MC, Mikheyev AS. Polyamines as snake toxins and their probable pharmacological functions in envenomation. *Toxins* 2016; 8(10):279.
234. Torres VDO, Piva RC, Antonialli Junior WF, Lima Cardoso CA. Free Amino Acids Analysis in the Venom of the Social Wasp *Polistes lanio* Under Different Forms of Preservation. *Orbital-The Electronic Journal Of Chemistry* 2018; 10(1, SI):1.
235. Qi F, Li A, Inagaki Y, Kokudo N, Tamura S, Nakata M, et al. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor. *International immunopharmacology* 2011; 11(3):342-349.
236. Terness P, Navolan D, Dufter C, Kopp B, Opelz G. The T-cell suppressive effect of bufadienolides: structural requirements for their immunoregulatory activity. *International immunopharmacology* 2001; 1(1):119-134.
237. Ma H, Niu H, Cao Q, Zhou J, Gong Y, Zhu Z, et al. Metabolomics method based on ultra high performance liquid chromatography with time- of- flight mass spectrometry to analyze toxins in fresh and dried toad venom. *Journal of separation science* 2016; 39(24):4681-4687.
238. Meng Q, Yau LF, Lu JG, Wu ZZ, Zhang BX, Wang JR, et al. Chemical profiling and cytotoxicity assay of bufadienolides in toad venom and toad skin. *Journal of ethnopharmacology* 2016; 187:74-82.

239. Iversen LL. The Ferrier lecture, 1983-Amino acids and peptides: fast and slow chemical signals in the nervous system?. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences 1984; 221(1224):245-260.
240. Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. Journal of neurochemistry 1984; 42(1):1-11.
241. Johnson J, Tian N, Caywood MS, Reimer RJ, Edwards RH, Copenhagen DR. Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. Journal of Neuroscience 2003; 23(2):518-529.
242. Davanger S, Ottersen OP, Storm- Mathisen J. Glutamate, GABA, and glycine in the human retina: an immunocytochemical investigation. Journal of Comparative Neurology 1991; 311(4):483-494.
243. Uyanıkoğlu H, Koyuncu İ, SAK ME. Plasma Free Amino Acid and Carnitine Levels in Pregnant Women with Hydatidiform Mole: A Case-Controlled Study. Authorea Preprints 2021.
244. Temiz E, Koyuncu I, Sahin E. CCT3 suppression prompts apoptotic machinery through oxidative stress and energy deprivation in breast and prostate cancers. Free Radical Biology and Medicine 2021; 165:88-99.
245. Harper AE. Some recent developments in the study of amino acid metabolism. Proceedings of the Nutrition Society 1983.
246. Laidlaw SA, Kopple JD. Newer concepts of the indispensable amino acids. The American journal of clinical nutrition 1987; 46(4):593-605.
247. Chipponi JX, Bleier JC, Santi MT, Rudman D. Deficiencies of essential and conditionally essential nutrients. The American journal of clinical nutrition 1982; 35(5):1112-1116.
248. Banos G, Daniel PM, Moorhouse SR, Pratt OE. The influx of amino acids into the brain of the rat in vivo: the essential compared with some non-essential amino acids. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences 1973; 183(1070):59-70.
249. Hassani O, Mansuelle P, Cestèle S, Bourdeaux M, Rochat H, Sampieri F. Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII

- (Ts γ) from the scorpion *Tityus serrulatus*. *European journal of biochemistry* 1999; 260(1):76-86.
250. Abe T, Hariya Y, Kawai N, Miwa A. Comparative study of amino acid composition in an extract from hornet venom sacs: High content of neuroactive amino acids in *Vespa*. *Toxicon* 1989; 27(6):683-688.
 251. Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Functional genomics* 2002; 155-171.
 252. Gopalakrishnakone P, Cheah J, Gwee MCE. Black scorpion (*Heterometrus longimanus*) as a laboratory animal: maintenance of a colony of scorpion for milking of venom for research, using a restraining device. *Laboratory animals* 1995; 29(4):456-458.
 253. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal* 2001; 359(1):35-45.
 254. Caliskan F, García BI, Coronas FI, Batista CV, Zamudio FZ, Possani LD. Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. *Toxicon* 2006; 48(1):12-22.
 255. Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2016; 1863(10):2422-2435.
 256. Cagin YF, Erdogan MA, Sahin N, Parlakpınar H, Atayan Y, Polat A, et al. Protective effects of apocynin on cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Archives of medical research* 2015; 46(7):517-526.
 257. Andreotti N, Jouirou B, Mouhat S, Mouhat L, Sabatier JM. Therapeutic value of peptides from animal venoms 2010.
 258. Ahluwalia S, Shah N. Animal venom for treating breast cancer. *Int J Pharm Pharm Sci* 2010; 6(9):24-30.
 259. Gupta SD, Debnath A, Saha A, Giri B, Tripathi G, Vedasiromoni JR, et al. Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leukemia research* 2007; 31(6):817-825.

260. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 2010; 48(6):749-762.
261. Zhao Q, Huo XC, Sun FD, Dong RQ. Polyphenol-rich extract of *Salvia chinensis* exhibits anticancer activity in different cancer cell lines, and induces cell cycle arrest at the G0/G1-phase, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential in pancreatic cancer cells. *Molecular medicine reports* 2015; 12(4):4843-4850.
262. Gao R, Zhang Y, Gopalakrishnakone P. Purification and N-terminal sequence of a serine proteinase-like protein (BMK-CBP) from the venom of the Chinese scorpion (*Buthus martensii* Karsch). *Toxicon*, 52(2) 2008; 348-353.
263. Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. *Experimental and molecular pathology* 2011; 91(1):447-454.
264. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research* 2010; 44(5):479-496.
265. Al-Asmari AK, Riyasdeen A, Abbasmanthiri R, Arshaduddin M, Al-Harthi FA. Scorpion (*Androctonus bicolor*) venom exhibits cytotoxicity and induces cell cycle arrest and apoptosis in breast and colorectal cancer cell lines. *Indian journal of pharmacology* 2016; 48(5):537.
266. Díaz-García A, Morier-Díaz L, Frión-Herrera Y, Rodríguez-Sánchez H, Caballero-Lorenzo Y, Mendoza-Llanes D, et al. In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *Journal of venom research* 2013; 4, 5.
267. Gupta SD, Debnath A, Saha A, Giri B, Tripathi G, Vedasiromoni JR, et al. Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leukemia research* 2007; 31(6):817-825.
268. Abdel-Rahman MA, Omran MAA, Abdel-Nabi IM, Nassier OA, Schemerhorn BJ. Neurotoxic and cytotoxic effects of venom from different populations of the Egyptian *Scorpio maurus palmatus*. *Toxicon* 2010; 55(2-3):298-306.

269. Ye XQ, Li Q, Wang GH, Sun FF, Huang GJ, Bian XW, et al. Mitochondrial and energy metabolism- related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *International journal of cancer* 2011; 129(4):820-831.

