

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI



***Leiurus abdullahbayrami* ZEHİRİNİN A549 AKCİĞER KANSER
HÜCRE HATLARINDA HÜCRE CANLILIĞI VE APOPTOZ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Nahide FİDANCIOĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Abdullah ARPACI

İkinci Danışman

Dr. Öğrt. Üyesi Muhittin ÖNDERCİ

Hatay – 2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

***Leiurus abdullahbayrami* ZEHİRİNİN A549 AKCİĞER KANSER
HÜCRE HATLARINDA HÜCRE CANLILIĞI VE APOPTOZ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Nahide FİDANCIOĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Abdullah ARPACI

İkinci Danışman

Dr. Öğrt. Üyesi Muhittin ÖNDERCİ

Hatay - 2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

***Leiurus abdullahbayrami* ZEHİRİNİN A549 AKCİĞER KANSER HÜCRE
HATLARINDA HÜCRE CANLILIĞI VE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Nahide FİDANCIOĞLU

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 23/07/ 2019 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy çokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof. Dr. Abdullah ARPACI

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhittin ÖNDERCİ(2.Danışman)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Menderes Yusuf TERZİ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Fatih DAVRAN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Serdar DOĞAN

Bu tez, Enstitümüz Tıp Biyokimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesi için bilgi ve desteğini esirgemeyen saygı değer danışman hocam, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdullah ARPACI ve yardımcı danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Muhittin ÖNDERCI hocalarıma,

Eğitim hayatı boyunca benden her türlü desteğini esirgemeyerek tecrübe ve bilgisi ile bana her zaman yardımcı olan, değerli abim Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AYHAN'a,

Çalışmalarımda yardımını esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Erhan YENGİL'e,

Çalışmamda, laboratuvarıda ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımını gördüğüm Araş. Gör. İbrahim BOZGEYİK, Araş. Gör. Hasret ECEVİT, Murat Eser AKYÜREK, Merve SAĞLAM, Zeynep ŞAHİN ve Dr. İsmail BENLİ'ye,

Beni sabırla destekleyen eşim Serkan FİDANCIOĞLU' na ve varlıklarıyla mutlu olduğum göz aydınlığı çocuklarım Kasım ve İsmail FİDANCIOĞLU'na,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Annem (merhume) Anzilha AYHAN ve Babam Ahmet AYHAN'a İthafen...

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
KISALTMALAR.....	IX
ÖZET	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre Yaşam Döngüsü.....	3
2.2. Hücre Yaşam Döngüsünün Kontrol Noktaları	4
2.3.Apoptoz.....	6
2.3.1. Apoptozun Tetiklenmesi	8
2.3.2. Apoptozun Düzenlenmesi	12
2.3.2.1. Kaspazlar.....	12
2.3.2.2. Bcl-2 Ailesi	12
2.3.2.3. Anneksin V	13
2.4. Otofaji	14
2.5. Kanser Oluşum Mekanizması	15
2.6. Çalışmada Kullanılan Kanser Hücre Hattı	17
2.7. Leiurus Abdullahbayrami Akrep Türünün Biyolojik Özellikleri.....	18
2.7.1. Akrep Zehirinin Bileşenleri ve Protein İçeriği	20
2.7.2. <i>L. abduhbayrami</i> Zehirin Lethal Dozu	22
2.7.3. Akrep Zehirlerinin Etki Mekanizması.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24

3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller.....	24
3.1.1. Akrep Zehirinin Elde Edilmesi.....	24
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	25
3.2. Çalışmada İzlenen Metod	26
3.2.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı.....	26
3.2.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları.....	27
3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi	27
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing).....	28
3.2.5. Deney Gruplarında Kullanılan Akrep Zehirinin Doz Ayarlama Şekli.....	29
3.2.6. MTT Cell Viability testi (Biotium) (Mosmann, 1983)	30
3.2.7. Real Time PCR.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. Leiurus abdullahbayrami Akrep Zehirinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi...	33
4.2. İstatistiksel Analizler.....	36
4.3. RT-PCR Analizi Sonuçları.....	38
5.TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	54
EKLER.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil-1.1. Ülkemizde tüm yaş grupları ve her iki cinsiyete göre, 2018 yılı Globocan verilerinin kanser insidansı.	1
Şekil-2.1. Hücre Yaşam Döngüsü.....	4
Şekil-2.2. Siklin-Siklin bağımlı kinazların hücre yaşam döngüsü üzerine etkilerinin şematik gösterimi.....	6
Şekil-2.3. Apoptoz Aşamaları.....	7
Şekil-2.4. Apoptoziste ekstrinsik, intrinsik yolak ve otofaji.....	11
Şekil-2.5. Bcl-2 ailesinin apoptozis regülasyon proteinlerinin birbirleriyle etkileşimi..	13
Şekil-2.6. Otofajinin şematik gösterimi	15
Şekil-2.7. Karsinogenez basamakları	16
Şekil-2.8. Kontakt inhibisyonun kültür ortamındaki gösterimi	17
Şekil-2.9. A549 Hücre Dizisi	18
Şekil-2.10. <i>Leiurus abduhbayrami</i> genel görünüşü	20
Şekil-2.11. <i>Leiurus abduhbayrami</i> 'nin genel görünüşü	20
Şekil-2.12. Akrep zehirinin bileşenleri	21
Şekil-2.13. <i>L. Abduhbayrami</i> akrep zehirinin protein profili	22
Şekil-3.1. Çalışmada kullanılan cihazlardan bazıları A: Su banyosu, B: Mikroskop, C:Biyo güvenlik kabini.	26
Şekil-3.2. MTT well plate görüntüsü	30
Şekil-3.3. Ependorf tüplerde kontrol grubu ve zehir ile muamele olmuş A549 hücreleri	32
Şekil-4.1. MTT absorbans değerinin pozitif kontrol, negatif kontrol ve A549 hücre hatlarına uygulanan farklı dozlardaki akrep zehiri ile karşılaştırılması	34
Şekil-4.2. İkili regresyon eğrisi.....	34
Şekil-4.3. Negatif kontrol ve farklı dozlarda akrep zehiri ile 24 saat muamele olmuş A549 hücrelerinin yüzde inhibisyon oranları	35
Şekil-4.4. Tüm guruplarda 12 saat ve 24 saat farklı dozlarda akrep zehiri ile muamele edilen A549 hücre görüntüleri	37

Şekil-4.5. L.A. akrep zehirinin apoptoz ve otofaji mekanizmalarında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması	39
---	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge-2.1. İntrinsik Yolak Proteinleri	9
Çizelge-2.2. Ekstrinsik yolak proteinleri	10
Çizelge-2.3. Fizyolojik etkileri ve terapötik kullanımları ile farklı akrep türlerinden izole edilmiş toksin peptitlerinin gösterilmesi	23
Çizelge-3.1. MTT Well plate ekim dizaynı ve uygulanan zehir dozları	29
Çizelge-3.2. cDNA sentez bileşenleri (HyperScript (GeneAll Cat no: 602-110)	32
Çizelge-3.3. PCR bileşenleri	32
Çizelge-3.4. cDNA reaksiyon koşulları.....	32
Çizelge-4.1. MTT absorbans değerleri	33
Çizelge-4.2. MTT absorbans değerleri ortalaması	33
Çizelge-4.3. A549 hücrelerinin 24 saat akrep zehiri ile muamelesinin değişik dozlarda hücre ölümünün yüzde değerleri	
Çizelge-4.4. A549 hücrelerine 24 saat süre ile uygulanan zehir dozlarının absorbans değerine karşılık gelen değerlerin çizgi grafik ile gösterimi.....	35
Çizelge-4.5. 1 µl -20 ml µl/ml konsantrasyon aralıklarında 'optik dansite' nin ortalama±standart sapma değerleri	36
Çizelge-4.6. L.A. akrep zehiri ile muamele olmuş A549 hücrelerinde gen ekspresyonlarının ACTB (β-aktin) geni ile karşılaştırılması.	39

KISALTMALAR

A549	: Akciğer adenokarsinom hücresi
Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor-1
Bad	: Bcl-2 associated death promoter; Bcl-2 ilişkili ölüm promoteri
Bak	: Bcl-2 antagonist killer; Bcl-2 antagonist öldürücü
Bax	: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	: B-Cell CLL/Lymphoma 2
Bcl-W	: BCL2L2; Bcl-2-like protein 2; Bcl-2 benzeri protein 2
Bcl-xL	: B-Cell lymphoma extra large,
Bid	: BH3 interacting domain death agonist; BH3 ile etkileşen domain ölüm agonisti
Bik	: Bcl-2 interacting killer; Bcl-2 ile etkileşen öldürücü
Bim	: Bcl-2 interacting mediator; Bcl-2 ile etkileşen aracı
Bmf	: Bcl-2 modifying factor; Bcl-2 değiştirici faktör
CAD	: Kaspaz aracılığıyla aktifleşen endonükleaz (caspase-activated endonuclease)
CDK	: Siklin bağımlı kinaz (cyclin dependent kinase)
DD	: Ölüm bölgesi (death domain)
DED	: Ölüm-efektör bölgesini (death-effector domain)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FADD	: Fas-ilişkili ölüm bölgesi (Fas-associated death domain)
FBS	: Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
I	: İnterfaz
IAP	: Inhibitors of apoptosis proteins; apoptoz proteinlerinin inhibitörleri
ICAD	: Inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz inhibitörü
IC₅₀	: Hücrelerin %50'sinin Ölümüne Neden Olan Konsantrasyon
MTT	: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NuMA	: Nükleer/mitotik apparatus protein
p53	: TP53; Tumor Protein p53

PBS	: Fosfat tamponu(Phosphate buffered saline)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	: Sentez (DNA replikasyonu)
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNFr	: TNF reseptörü



ÖZET

***Leiurus abdullahbayrami* Zehirinin A549 Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı ve Apoptoz Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

Akciğer kanseri, dünyadaki en yaygın kanser türünden biridir ve kansere bağlı ölümün önde gelen nedenidir. Bu çalışmada Türkiye’de yaşayan, endemik bir akrep türü olan *Leiurus Abdullahbayrami* zehirinin A549 Akciğer kanser hücre hatlarında apoptotik etkileri araştırıldı.

Doğal ortamlardan toplanan akreplerin zehri, elektriksel uyarım yöntemi ile sağılmıştır. Elde edilen zehir; dilüe edilerek, A549 kanser hücre hattı üzerinde, MTT hücre canlılığı testi ile IC₅₀ dozu belirlendi. IC₅₀ dozunda akrep zehiri 24 saat süre ile A549 hücre hattına uygulandı ve apoptoz açısından sonuçlar değerlendirildi. Tüm deneyler üç tekrarlı yapıldı. Uygulanan dozda akrep zehirin, apoptozun hangi yolağı indüklediğini belirlemek amacıyla Bax, Bcl-2, kaspaz-3 ve atg5 genlerinin ekspresyon kantifikasyonu ACTB geni referans olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edildi. Relatif kantifikasyon “2^{-ΔΔCT} Yöntemi” kullanılarak yapılan hesaplamının sonucuna göre Bax proteini kontrol grubuna kıyasla 3 kat artış gösterdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: A549 hücre hattı, Apoptoz, *Leiurus abdullahbayrami*, Akrep zehiri.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of *Leiurus abdullahbayrami* Venom on Cell Viability and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cell Lines

Lung cancer is one of the most common types of cancer in the world and it is the leading cause of cancer-related death. In this study, the apoptotic effects of venom of scorpion species *Leiurus abdullahbayrami*, endemic to Turkey on A549 lung cancer cell line were investigated.

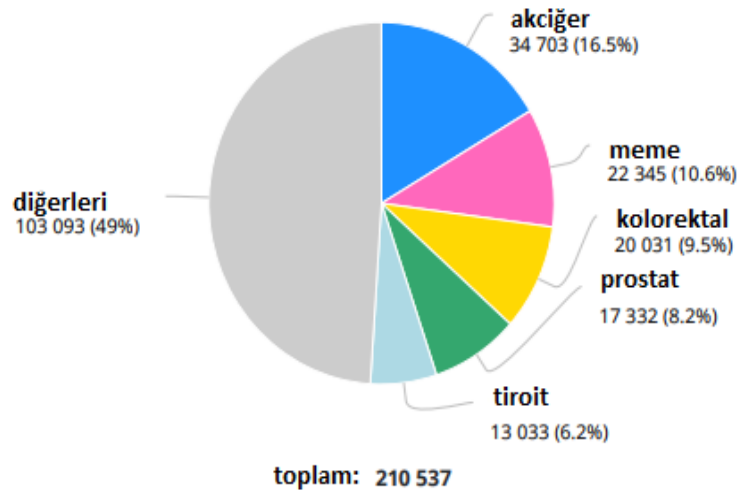
The venom was milked by electrical stimulation method from scorpions collected from natural environments. IC₅₀ dose of venom was determined by MTT cell viability test on A549 cancer cell line. Scorpion venom was administered to the A549 cell line for 24 hours at the concentration of IC₅₀ and apoptotic markers were then evaluated. All experiments were performed in triplicate. Expression of Bax, Bcl-2, caspase-3 and atg5 genes was determined to determine which apoptotic pathway is induced by venom. ACTB gene was used as control gene. Calculation using relative quantification “ $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method”. According to this calculation Bax protein was observed to increase 3-fold compared to the control group.

Key Words: A549 cell line, Apoptosis, *Leiurus abdullahbayrami*, Scorpion venom.

1. GİRİŞ

Kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisiyle hücrelerin kontrolsüz çoğalması şeklinde ortaya çıkan bir rahatsızlıktır. Kanser hücreleri, yapısal farklılıkların yanında, işlevsel farklılıklar da ortaya koymaktadır. Anormal şekilde çoğalmayla başlayan kanserleşmiş hücreler bulundukları yerdeki doku ve organları istila ederken bazen de daha uzaktaki organları da istila ederek bu organların görevlerini yerine getirmesini engellemektedirler (Hanahan ve ark. 2011).

Sık görülmesi ve yüksek ölüm oranlarına sahip olması kanseri önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmiştir. Kanser, ülkemizde ve dünyada sebebi bilinen ölümler sıralamasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelmektedir (Ferlay ve ark. 2014). 2002 yılında ülkemizde kanserin sebep olduğu ölümler tüm ölüm nedenlerinin %12'sini oluşturmaktayken bu oran 2009 yılında %21'e yükselmiştir. Bu oranlara göre 2030 yılına gelindiğinde yıllık 22 milyon yeni vaka ortaya çıkması yani 2008 verilerine göre yeni vakalarda %75 oranında artış olması beklenmektedir (<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.doid=18855>). Ülkemizde bayanlarda en sık görülen kanser türü meme kanseri iken, erkeklerde ise akciğer kanseri diğer kanser türlerine oranla daha sık görülmektedir. 2018 yılı Globacan verilerine göre, ülkemizde tüm yaş gruplarına göre akciğer kanseri %16.5'lik insidans oranı ile ilk sırada yer almaktadır (Globocan, 2018)



Şekil-1.1. Ülkemizde tüm yaş grupları ve her iki cinsiyete göre, 2018 yılı Globocan verilerinin kanser insidansı.

Kanser tedavisinde tümör hücrelerinin yok edilmesi hedeflenirken, hücrenin bulunduğu çevredeki normal dokuya minimum hasar vermeye çalışılmaktadır. Radyoterapi, kemoterapi, ve cerrahi yaklaşımlar kanser tedavisinde kullanılan başlıca yöntemlerdir (Baskar R ve ark. 2012). 1990'dan beri giderek artan insidansa bağlı olarak kanser araştırmaları ve tedavisi yoğunluk kazanmıştır. Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte günümüzde var olan medikal tedavilere ek olarak yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Klasik olarak kabul edilen bu yöntemlere ek olarak aşılar, biyolojik ve farmakolojik hedeflenmiş hormonal ve gen terapiler giderek artan sayıda kullanılmaya başlanmıştır (Fitzmaurice ve ark. 2015). Genlerin bozulması sonucu oluşan kanserleşmiş hücreler bireylerde uygulanan tedavilere de farklı cevap vermektedir. Bunun nedeni her bireyin DNA'sı birbirinden farklı olması, hücresel ve moleküler düzeyde de heterojenlik göstermesidir. Son zamanlarda kanser hücre hatlarına uygulanan bazı bitki ekstratları ve peptid yapılı zehir bileşenleri ile bu hücrelerde biyokimyasal ve moleküler değişiklikler incelenmektedir. Yapılan bu tarz çalışmalarda peptid bileşenlerinin otoimmün, enflamatuvar hastalıklar, nörolojik ve tümoral hastalıklar üzerinde de etkileri olabildiği ortaya konmuştur (Kelle İ. 2006, Gordaliza M. 2007).

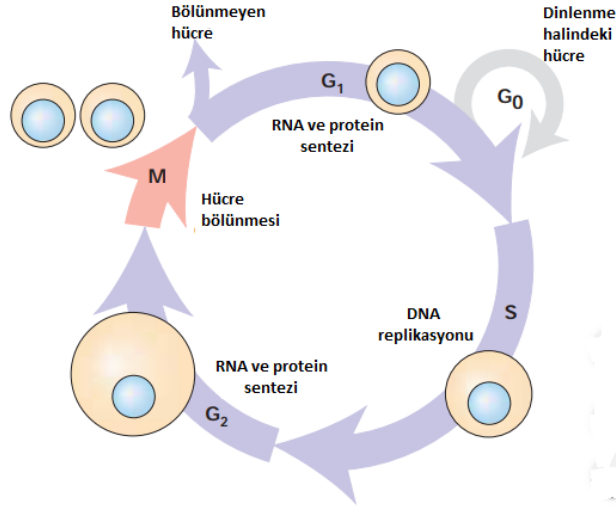
Çalışmamızda, daha önce anti-tümoral aktiviteleri bakımından çalışılmamış olan, ilk olarak Türkiye'de tespit edilen endemik akrep türü *Leiurus abdullahbayrami* zehrinin in-vitro sitotoksitesite testi ile A549 akciğer kanseri hücre hattında apoptoz mekanizmasında görev alan kaspaz-3, Bax, Bcl-2, Atg5 proteinleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Yaşam Döngüsü

Hücre yaşam döngüsünün sorunsuz olarak çalışması, hücre büyümesi ve hücre proliferasyonu için önemlidir (Patron ve ark. 2001). Kanser, hücrelerin hücre yaşam döngüsünün regülasyon ve proliferasyon oranlarını kontrol etme yeteneklerini kayb ettikleri bir hastalıktır. Genetik, kimyasal ve çevresel etmenler kanserin oluşmasına neden olabilir (Williams GM. 2001). Hücrelerin bölünmesini ve çoğalmasını kontrol eden yapılar genlerdir. Genlerin üzerinde oluşan fiziksel ya da kimyasal değişimler sonucu hücrenin işlevi değişebilir. Gende oluşan bir hasara bağlı olarak DNA tamir sistemleri genin işlevini yeniden kazandırmaya çalışır. Fakat her zaman başarı sağlanamaz. Bu durumda genlerin ürünü olan proteinlerin eksik veya hatalı üretilmesi hücresel işlevlerin bozulmasına sebep olur (Corn PG. ve El-Deiry WS. 2002; Jackson M. ve ark. 2018).

Bir hücrenin bölünmesi ile gerçekleşen olaylar zincirine hücre yaşam döngüsü denir. Hücreler belirli bir büyüklüğe ulaştığı zaman bölünür. Hücre büyüdüğü zaman yüzey genişliği ve hacmi artar. Buna bağlı olarak hücre içinde madde iletimi ve çekirdeğin hücreyi yönetimi işi zorlaşır. Çekirdek bölünme emrini verir. Bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerde bölünme G_0 , G_1 , S, G_2 ve M (mitoz) safhaları ile gerçekleşir. G_0 evresi hücrenin istirahat evresi olup bölünme sinyallerinin olmadığı, büyüme ve gelişmenin devam ettiği evredir (Vermeulen ve ark. 2003). G_1 -S- G_2 safhalarına interfaz denir ve bölünme siklusunun %90'ı bu safhada gerçekleşir. Hücreler G_1 fazında RNA'ları ve proteinleri sentezler, S (sentez) fazında DNA sentezi ve kromozom replikasyonu için hazırlanırlar. DNA'nın replikasyonu S fazında tamamlanır. G_2 fazında hücre büyümeye, RNA sentezine ve protein sentezine devam eder. G_2 aşamasından geçtikten sonra hücreler, birkaç aşamaya ayrılan M (mitotik) aşaması olarak da adlandırılan karmaşık mitoz sürecine başlar. Hücre sayısının bölünerek iki katına çıktığı mitoz aşaması kendi içinde de basamaklara ayrılır. Bu basamaklar sırasıyla şöyledir: profaz, metafaz, anafaz ve telofaz. Mitoz bölünmenin son aşaması olan telofazda aynı genetik materyale sahip iki yeni hücre oluşur (Lodish ve ark. 2003).



Şekil-2.1. Hücre Yaşam Döngüsü (Loodish ve ark. 2008)

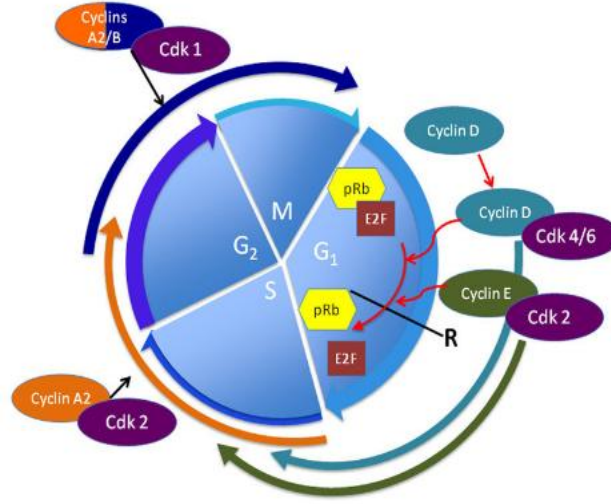
2.2. Hücre Yaşam Döngüsünün Kontrol Noktaları

Hücre döngüsünde bir fazdan diğerine geçiş, düzenli bir şekilde gerçekleşir ve farklı hücresel proteinler tarafından düzenlenir. Genetik materyal tam kopyalanmadan bir fazdan diğerine geçişlerde hücrede hasar meydana gelir. Hücre döngüsünde G₁ -S geçişinde, G₂ -M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. DNA'sı hasar görmüş hücre, buna yanıt olarak DNA onarımı için zaman kazanmak amacı ile hücre kontrol noktaları tarafından bölünmesi durdurulur (Vermeulen ve ark. 2003; Ruijtenberg S ve Heuvel S, 2016). Sınırlama noktası (R point/Restriksiyon noktası) G₁'de geri dönüşü olmayan bir nokta olarak tanımlanır, hangi hücrenin hücre döngüsüne girmeye karar verdiğini takip eder. Deneyler gösteriyor ki sınırlama noktasından önce aç bırakılan hücreler G₀ benzeri bir duruma girerken, R point'den sonra aç kalan hücreler etkilenmez ve bölünme mitoz boyunca devam eder (Pardee, 1974).

Kontrol noktalarındaki düzenlemeyi sağlayan proteinler siklinler, siklin bağımlı kinaz (CDK)'lar ve siklin bağımlı kinaz inhibitör(CDI)'leridir (Ruijtenberg S ve Heuvel S, 2016). Siklin protein seviyeleri hücre döngüsü sırasında artar ve düşer ve bu şekilde CDK'yi periyodik olarak aktive ederek siklin-CDK kompleksi oluşur (Evans ve ark. 1983; Pines J. 1991). Hücre döngüsünün bazı fazlarında sentezlenen siklinler, inaktif durumdaki CDK moleküllerine bağlanarak aktive etmektedirler (Ho A.ve Dowdy SF. 2002; Scriver

ve ark. 2001). Fosfor gen transkripsiyonu ve hücre büyümesinin düzenlenmesine dahil olmaktadır. Aktifleşen proteinkinazlar transkripsiyon faktörlerini fosforilleyen kinazları uyarmaktadır (Onat ve ark. 2006). Şimdiye kadar, dokuz CDK tanımlanmıştır ve bunlardan beşi hücre döngüsü sırasında, G₁ (CDK4, CDK6 ve CDK2), S (CDK2), G₂ ve M (CDK1) sırasında aktiftir (Vermeulen ve ark. 2003). Hücre döngüsünün farklı aşamalarında farklı siklinler gerekir. Siklin proteinleri A, B, C, D, E şeklindedir. Üç D tipi siklin (siklin D1, siklin D2, siklin D3), CDK4'e ve CDK6'ya bağlanır (Qie S ve Diehl JA, 2016).

CDK-siklin D kompleksleri, G₁'e giriş için şarttır. Diğer siklinlerin aksine, siklin D periyodik olarak sentezlenmez, ancak büyüme faktörü stimülasyonu devam ettiği sürece sentezlenir (Qie S ve Diehl JA, 2016). Siklin D sentezinde oluşan bir hata hücreyi S fazına sürükler buna bağlı olarak neoplastik oluşumlar başlar (Weinberg RA. 1995; Kopnin BP. 2000). p16 veya p21 genleri CDK4'ü inhibe ederek hücreyi G₁ fazında duraksatır ve S fazına geçişi engellemiş olur (Macaluso ve ark. 2005). Bir başka siklin, G₁'den S fazına ilerlemeyi düzenlemek için CDK2 ile birleşen siklin E'dir (Ohtsubo ve ark. 1995). G₁/S kontrol noktasında, DNA hasarı ile indüklenen hücre döngüsü durması, p53'e bağlıdır. Genellikle, p53'ün hücresel seviyesi düşüktür ancak DNA hasarı, p53 aktivitesinin hızlı bir şekilde indüklenmesine sebep olur (Hyun SY, Jang YJ, 2015). Artan p53 proteini p21'i aktifleştirerek siklin-CDK komplekslerini baskılayarak hücre döngüsünün G₁ ya da G₂ fazında duraksamasına neden olur (Kopnin BP, 2000; Macaluso ve ark. 2005). p53 proteinine bağlı p53 geninde herhangi bir mutasyon sonucu DNA'sı hasar görmüş hücrelerin bölünmesi aralıksız devam eder. Bu durum da kansere yol açar (Hyun SY, Jang YJ, 2015). G₁ ve G₂ kontrol noktalarında DNA hasarı kontrol edilirken metafaz-anafaz geçişinde kromozomların iğsi iplikçiklerin üzerinde düzenli dağılımı kontrol edilir. Kromozomlar düzgün ve tam dağılımı gerçekleşinceye kadar hücre döngüsü bu aşamada durdurulur (Giacinti C ve Giordano A 2006; Yuan J ve Yankner BA 2000).



Şekil-2.2. Siklin-Siklin bağımlı kinazların hücre yaşam döngüsü üzerine etkilerinin şematik gösterimi (Wolgemuth DJ ve ark. 2013)

2.3.Apoptoz

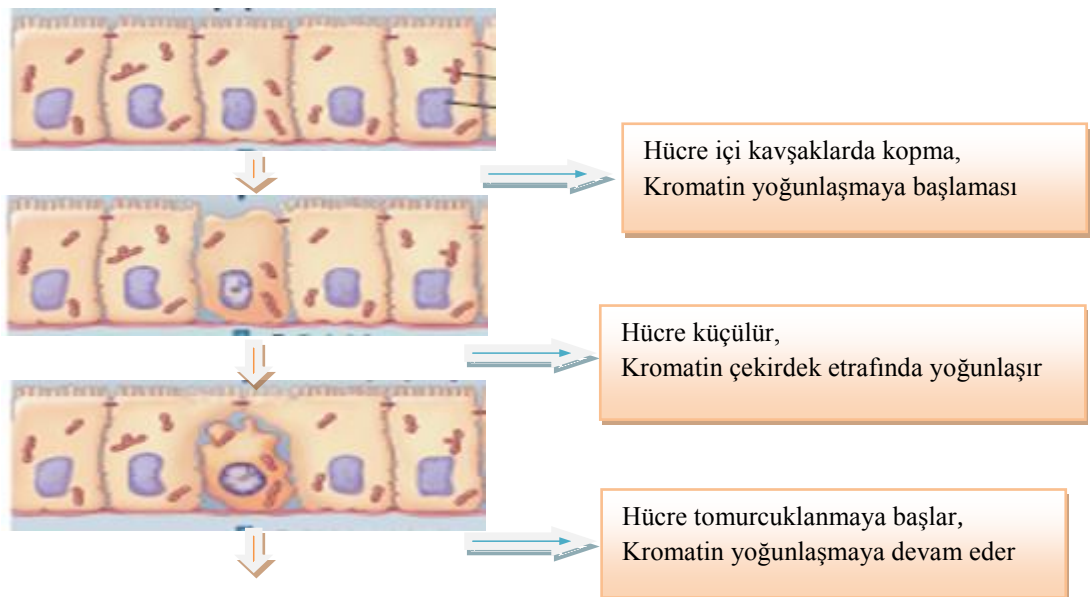
Canlı organizmalarda hücre ölümü iki yolla gerçekleşir. Nekroz, hücre hasarı sonucu hücre ölümü olup inflamatuvar bir süreç ile sonlanır. Apoptoz ise programlı hücre ölümüdür ve inflamatuvar süreç gözlenmez. Normal sağlıklı dokularda hücre dengesini sağlayan en önemli olay programlı hücre ölümü yani apoptozistir. Apoptoz hücrelerin yaşlanması sonucu, homeostatik dengeyi sağlamak amacıyla, fizyolojik bir olay olmakla birlikte bazı savunma olaylarında da rol aldığı gözlenmektedir. Bunlara örnek olarak hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması, immün sistemin yanıtı olarak hücrelerin apoptoza uğraması gösterilir (Norbury CJ ve Hickson ID, 2001). Canlı organizmalarda mitozis ne kadar önemli ise bunun karşısı olan apoptozis de o kadar önem arz etmektedir. Hücreler fizyolojik ve patolojik nedenlerden dolayı apoptozu seçerler. Fizyolojik nedenler; embriyonun gelişimi, doku modellenmesi ve immün hücre seleksiyonu olarak sıralanırken, patolojik nedenler; kronik viral hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, tip-1 diyabet, ateroskleroz, miyokard enfarktüs ve kanser olarak sıralanır (Susan E, 2007).

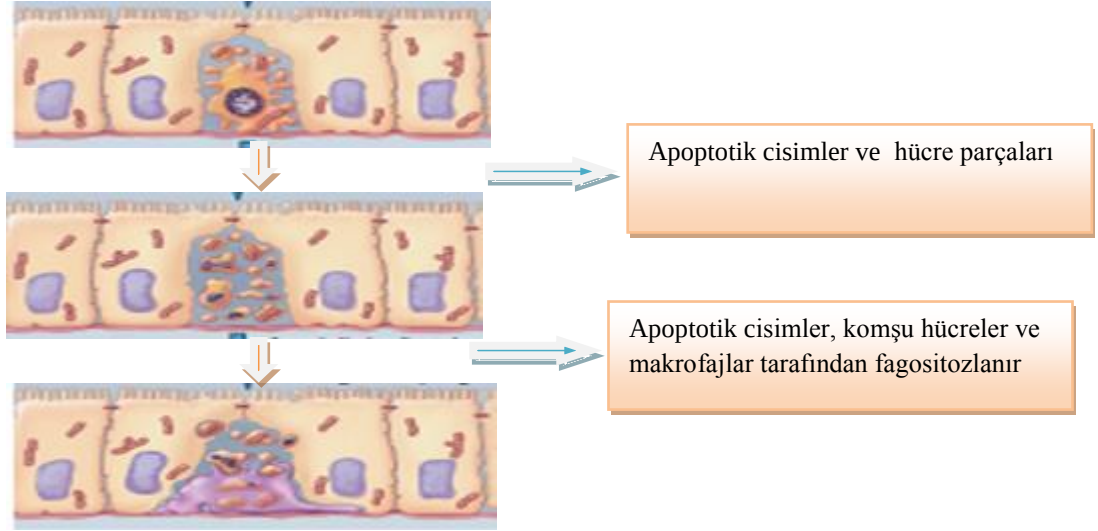
Apoptozis, morfolojik özelliklerdeki değişimlerle karakterize olup bir dizi biyokimyasal olayların hücre içi ve hücre dışı iki temel yolak ile bir çok proteinin görev yaptığı, enerji bağımlı karmaşık bir süreçtir (Susan E. 2007). Hücrelerde apoptozise neden

olan aktivitelere proapoptotik mekanizma denir; hücreleri apoptozdan koruyan aktivitelere antiapoptotik mekanizma denir (Pollard DT ve ark. 2017).

Apoptoz ile hücre ölümü başlıca tetiklenme fazı, uyarılma fazı, işlem fazı ve ortadan kaldırma (defin/gömme) fazlarından oluşur (Utz PJ ve Anderson P, 1998). Apoptoz esnasında hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşarak küçülür, diğer hücrelerle bağlantısını koparır. Sitoplazma yoğunlaşır, hücre büzülür ve hücre zarının düzgün hali bozulur. Organeller bütünlüğünü koruyarak bir araya toplanır. Çekirdekte kromatin yoğunlaşarak piknotik görüntü oluşur. Çekirdek zarında bulunan porlar yok olur ve çekirdek parçalanır. DNA'da kırıklar meydana gelir. Hücre içine kalsiyum girişi artar. Hücre tomurcuklanarak apoptopik cisimcikler şeklinde parçalanır. Hücre içeriği dışına sızmadığından enflamasyon gözlenmez. Son olarak apoptopik cisimcikler makrofajlar tarafından fagosite edilir (Bellamy ve ark. 1995; Ellis ve ark. 1991).

Hücrelerin apoptoza karar vermesi pozitif uyarıların kesilmesi ile ya da negatif uyarıların alınması ile olur. Büyüme faktörü bir pozitif uyarandır. Hücre yüzey reseptörlerine tümör nekroz faktör (TNF), limfotoksin ve fas ligandı (FASL) bağlanması negatif uyarılardır. Ayrıca DNA hasarına neden olan faktörlerde (UV ışınlar, x ışınları, kemoterapi ajanları, serbest radikaller gibi) negatif uyarılardır. Bunların yanı sıra ATP/ADP ve NADH'ın azalması, hipoksi, hücre içi kalsiyum düzeyinin artışında negatif uyarılar arasındadır (Danial ve Korsmeyer, 2004; Baines, 2010).





Şekil-2.3. Apoptoz Aşamaları (Pollard DT. ve ark. 2017)

2.3.1. Apoptozun Tetiklenmesi

Apoptoz, intrinsik (mitokondriyal) yolak ve ekstrinsik yolak olmak üzere iki temel yolak üzerinden gerçekleşir. Hücrede apoptozu tetikleyen sinyaller hücre içi ve hücre dışı sinyallerdir. Hücre içi sinyaller intrinsik yolu tetiklerken, hücre dışı sinyaller de ekstrinsik yolu tetikler. Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre döngüsü bozuklukları, ATP/ADP ve NADPH'nin azalması ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, apoptoz reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (İskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir (Elmore S, 2007).

İntrinsik (Mitokondriyal) Yolak

İntrinsik yolakta, hücreye gelen apoptozu tetikleyen sinyallerin varlığında hücrede, bir proapoptopik protein olan Bid, antiapoptopik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder. Ayrıca bid, Bak ve Bax proteinlerini aktifleştirir. Aktif olan Bak ve Bax proteinleri mitokondrinin dış membranının permeabilitesi bozulmasına neden olarak, elektron transport sisteminin bir bileşeni olan sitokrom-c'nin mitokondriden salınmasına neden olur.

Sitoplazmada serbest bulunan sitokrom-c, kaspaz-9 ve Apaf-1 (Apoptotik preteaz aktive eden faktör) ile birleşerek ‘*apoptozom*’ adı verilen bir kompleks oluşturulur (Zou ve ark. 1999). Bu kompleks de diğer kaspazları aktive ederek hücreyi ölüme götürür. Geçirgenliği bozulmuş olan mitokondri membranından AIF (apoptoz indukleyici faktör), Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G) ve Ca^{++} salınımını uyarır (Smaili ve ark. 2000). AIF, çekirdeğe girer ve çekirdeği parçalara ayırır. Endo-G (Endonukleaz-G) enzimi DNA’nın kırılmasına sebep olur. Smac, kaspaz inhibisyonunu engeller. Hücre içinde artan kalsiyum ise kaspazları aktive ederek hücre iskeletinin yıkılmasına sebep olur (Adams JM ve ark. 2001; Palmer AM ve ark. 2000).

Çizelge-2.1. İntrinsik Yolak Proteinleri (Elmore S. 2007)

Kısaltma	Protein Adı
Smac / DIABLO	Kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü / düşük PI ile doğrudan IAP bağlayıcı protein
HtrA2 / Omi	Yüksek sıcaklık gereksinimi
IAP	Apoptoz Proteinlerinin İnhibitörü
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör
Kaspaz-9	Sisteinil aspartik asit proteaz-9
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
CAD	Kaspazla Aktive Edilen DNaz
Bcl-2	B hücreli lenfoma proteini 2
Bcl-X	BCL2 1 gibi
Bcl-XL	BCL2 ile ilişkili protein, uzun izoform
Bcl-XS	BCL2 ile ilişkili protein, kısa izoform
Bcl-w	BCL2 benzeri 2 protein
BAG	BCL2 ilişkili athanogene
Bcl-10	B hücreli lenfoma proteini 10
BAX	BCL2 ile ilişkili X proteini
BAK	BCL2 antagonist katili 1
BID	BH3 etkileşimli alan ölüm agonisti
BAD	BCL2 hücre ölümünün antagonisti
BIM	BCL2 etkileşimli protein BIM
BIK	BCL2 etkileşimli katil
Blk	Bik benzeri öldürücü protein
Puma	BCL2 bağlayıcı bileşen 3
Noxa	Forbol-12-miristat-13-asetat ile uyarılmış protein 1
14-3-3	Tirozin 3-monooksijenaz / triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon proteini
Aven	Hücre ölümü düzenleyicisi Aven
Myc	Onkojen Myc

EkstrinsikYolak

Komşu hücrelerden gelen sinyaller, ekstrinsik yolağın birincil tetikleyicileridir. Bir öldürücü hücrenin hedef hücre ile doğrudan teması, plazma zarından başlayarak bu yolu başlatan spesifik reseptörleri aktive eder. Ekstrinsik yolun aktivasyonu, sitotoksik T lenfositlerin yabancı (veya yabancı patojenleri barındıran) olarak bilinen hücreleri öldürmek için kullandıkları bir yöntemdir. Bu yol ayrıca bağışıklık sistemindeki hücre popülasyonlarını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılır. Birçok hücrede, ekstrinsik yol, daha sonra hücrenin öldürülmesinden sorumlu olan intrinsik yolu aktive eder (Pollard, DT. ve ark. 2017).

Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolakları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni süper ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini içerir (Locksley ve ark. 2001). TNF reseptörü familyasının üyeleri, sistein bakımından benzer, zengin hücre dışı alanları paylaşır ve “ölüm alanı” olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alana sahiptir (Ashkenazive Dixit, 1998).

Bu ölüm alanı, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına aktarılmasında kritik bir rol oynar. Bugüne kadar, en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri arasında FasL / FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5 tanımlanır (Chicheportiche ve ark. 1997; Ashkenazi ve ark. 1998; Peter ve Kramer, 1998; Suliman ve ark. 2001; Rubio-Moscardo ve ark. 2005).

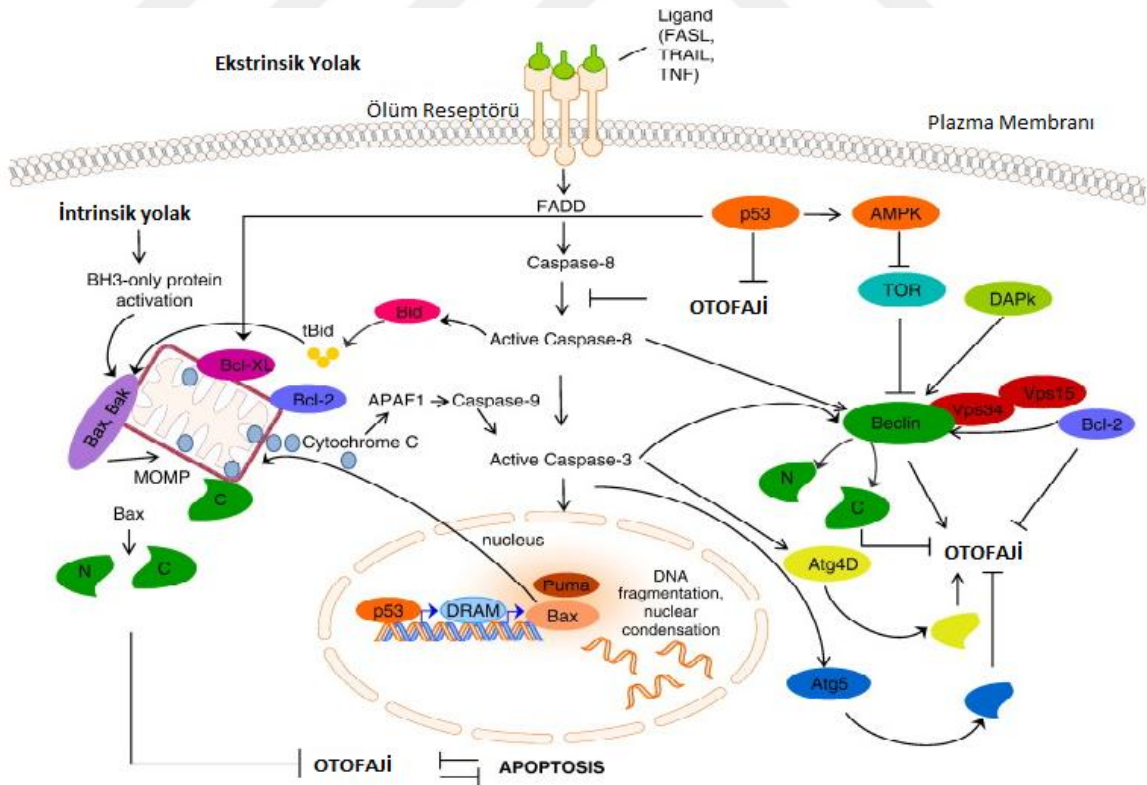
Çizelge-2.2. Ekstrinsik yolak proteinleri (Elmore S. 2007)

Kısaltma	Protein Adı
TNF- α	Tümör nekroz faktörü alfa
TNFR1	Tümör nekroz faktörü reseptörü 1
FasL	Yağ asidi sentetaz ligandı
FasR	Yağ asidi sentetaz reseptörü
Apo3L	Apo3 ligand
DR3	Ölüm reseptörü 3
Apo2L	Apo2 ligand
DR4	Ölüm reseptörü 4
DR5	Ölüm reseptörü 5
FADD	Fas ilişkili ölüm alanı

TRADD	TNF reseptörüne bağlı ölüm alanı
RIP	Reseptör etkileşimli protein
DED	Ölüm efektör alanı
kaspaz-8	Sisteinil aspartik asit proteaz 8
c-FLIP	FLICE inhibe edici protein

Apoptozisin ekstrinsik fazını tanımlayan olayların sırası, en iyi FasL / FasR ve TNF- α / TNFR1 modelleri ile tanımlanır. Bu modellerde, alıcı kümelenmesi ve homolog ile bağlanma vardır. Ligand bağlanması üzerine, ölüm alanlarını sergileyen sitoplazmik adaptör proteinleri kullanılır. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması, adaptör proteini FADD'nin bağlanması ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması ile adaptörün bağlanmasıyla sonuçlanır (Abotaleb M ve ark, 2019).

FADD ve RIP alımı ile protein TRADD (Hsu ve ark. 1995; Wajant, 2002), FADD daha sonra ölüm efektör bölgesinin dimerizasyonu ile prokaspaz-8 ile birleşir. Bu noktada, prokaspaz-8'in otomatik katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan bir ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur (Kischkel ve ark, 1995).



Şekil-2.4. Apoptoziste ekstrinsik, intriksik yolak ve otofaji (Nikoletopoulou ve ark. 2013)

2.3.2. Apoptozun Düzenlenmesi

2.3.2.1. Kaspazlar

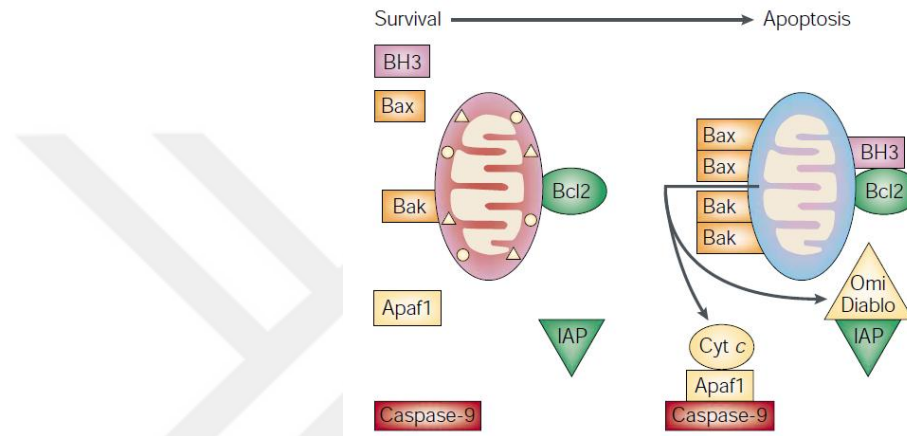
Kaspazlar proteolitik aktiviteye sahip sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kaspazlar proteinleri parçalayabilmektedir; ancak Kaspaz-2, etki alanına bağlanan ve onu sinyalleşme kompleksine alan, ölüm etki alanına sahip RIP bağdaştırıcısı ile komşu amino asitlerin tanınmasını içeren farklı özelliklere sahiptir. Kaspazlar aktive edildiğinde, hücre ölümü ile sonuçlanan geri dönüşü olmayan bir süreç başlar. Bugüne kadar, on kaspaz tanımlanmış ve geniş bir şekilde başlatıcılar (*initiator*) (kaspaz-2, -8, -9, -10), efektörler (*executioner*) (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5) halinde sınıflandırılmıştır (Cohen, 1997; Rai ve ark. 2005). Her iki apoptoz yolunda kaspazlar rol almaktadır (Kroemer ve ark. 2007).

Hücre ölümünde iki sınıf kaspaz rol oynar. Başlatıcı kaspazların uzun prodomainleri vardır. Hücrelerde monomerler olarak var olurlar ve otomatik olarak aktifleşirler. Aktivasyon dimerizasyon ile indüklenir ve proteolitik bölünme gerektirmez. Efektör kaspaz zimojenleri, kısa prodomainlere sahip monomerlerdir. Bu inaktif enzimler otomatik olarak aktive edilemez. Bunun yerine, başlatıcı kaskadlar veya diğer aktif efektör kaskadlar tarafından aktive edilirler. Birçok proteaz gibi, kaspazlar da prokaspazlar olarak bilinen inaktif zimojenler olarak sentezlenir (Pollard, DT. ve ark. 2017). Kaspazlar aktive edildiğinde, proteaz kaskadı başlatılmasına izin vererek sıklıkla diğer prokaspazları aktive edebilir. Bazı prokaspazlar bir araya gelir ve otomatik olarak aktif hale gelebilir. Bir kaspazın diğer kaspazları aktive edebildiği bu proteolitik kaskad, apoptotik sinyal yolunu güçlendirir ve böylece hızlı hücre ölümüne yol açar (Susan E. 2007).

2.3.2.2. Bcl-2 Ailesi

İkinci bir apoptotik regülatör molekül Bcl-2 ailesidir. Bcl-2 proteinleri üç alt gruba ayrılabilir. Bcl-2 koruyucuları, hücreleri apoptoza karşı korur. Bcl-2 katiller, (örneğin, Bax ve Bak) aktif olarak hücreleri öldüren proapoptotik proteinlerdir. Bcl-2 düzenleyicileri (sadece BH3 proteinleri olarak bilinir), koruyuculara müdahale ederek veya katilleri aktive ederek hücre öldürülmesini teşvik eder. Bcl-2 proteinleri; temel olarak hücreler intrinsik

yolu harekete geçiren sinyaller aldıklarında mitokondriden apoptozu aktive edici faktörlerin salınımını düzenler (Pollard, DT. ve ark. 2017). Son yıllarda yapılan araştırmalar, antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin(Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 ve Bfl-1 / A1) mitokondriyal geçirgenliği önlediğini gösterir. Proapoptotik proteinler (Bax, Bak, Bim, Bid, Bad, Bmf, and Puma) mitokondriyal geçirgenliği arttırmaya çalışırlar. Bcl-2 mitokondrinin dış membranında yer alır (Letai, A. 2017).



Şekil-2.5. Bcl-2 ailesinin apoptozis regülasyon proteinlerinin birbirleriyle etkileşimi (Cory S ve Adams JM. 2002)

Hayatta kalma faktörü bir hücre yüzeyi reseptörü proteinine bağlanır, böylece çeşitli hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Bu yolların bazıları, Bad proteinini fosforile eden protein kinazların aktivasyonuna yol açar. Bad, Bcl-2 gibi apoptoz inhibitör proteinlerine bağlanarak ve etkisiz hale getirerek apoptozu teşvik eder. Fosforile edildikten sonra Bad, apoptozu inhibe etmeye etki edebilen bağlı durumdaki Bcl-2 proteinini serbest bırakır. Bu nedenle, hayatta kalma faktörü, Bad'ı fosforlamış ve etkisiz hale getirerek apoptozu bastırır (Raff MC. 1998) .

2.3.2.3. Anneksin V

Anneksin V, güçlü ve spesifik olarak fosfatidilserin kalıntılarıyla etkileşime giren ve apoptozun tespiti için kullanılabilen bir rekombinant fosfatidilserin bağlayıcı proteindir (Arur ve ark. 2003). Normal hücrelerde hücre zarının iç yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin bulunmaktadır. Hücre apoptoza karar verdiği zaman normalde iç

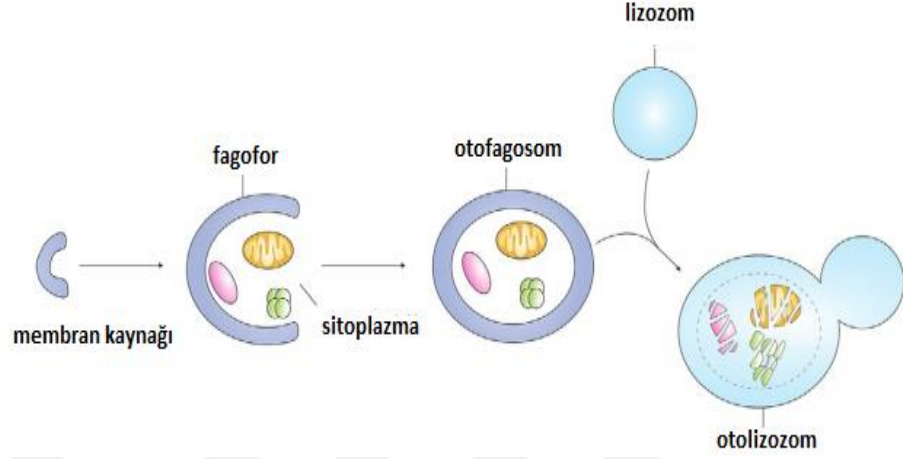
yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne doğru yer değiştirir. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. AnneksinV, hücrenin dış yüzeyine doğru yer değiştirmiş olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. Ayrıca DNA fragmentasyonu sadece anneksin V-pozitif hücrelerinde bulunur. Fosfatidilserin hücre yüzeyinde ekspresyonu, apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından tanınmasında ve uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar. Önemli olarak, çevre dokulara zarar verebilecek enzim hücrelerinden salınmaya yol açabilecek zar hasarından önce gelir (Kopman G ve ark, 1994; Augustine D ve ark, 2019).

2.4. Otofaji

Hücreler, gereksiz, yanlış katlanmış, hasar görmüş ve zararlı proteinleri temizleyen mekanizmalara sahiptir. Otofaji, hasarlı veya gereksiz hücre bileşenlerini temel biyomoleküllere parçalayan ve daha sonra sitozole geri dönüştürülen bir lizozomal degregasyon olayıdır. Bu bakımdan, otofaji sürekli bir degregasyon-rejenerasyon döngüsünde biyomolekül akışını yönlendirir. Otofaji indüksiyonunu takiben, otofagosomlar oluşur. Otofagosom biyosentezi üç aşamada gerçekleşir: vezikül çekirdeklenme, uzama ve olgunlaşmadır. Otofajinin başlatılmasını, otofagosomun uzamasını ve bu işlemin tamamlanmasını kontrol eden otofaji ile ilişkili (Atg) proteinler tarafından gerçekleştirilir ve düzenlenir (Anding ve Baehrecke, 2015). Otofajide, otofagozom veya otofajik vakuol olarak adlandırılan iki veya daha fazla membran yapıları oluşur (Mehrpour ve ark, 2010).

Üç tip otofaji mekanizması vardır; bunlar mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon aracılı otofajidir (Glick D ve ark, 2010). Mikrootofajide küçük parçacıkların membranda oluşan girintiyle lizozom içine alınıp degradasyonunun yapılmasıdır. Makrootofaji ise otofajik hücre ölümünü oluşturan temel yoldur. Daha büyük parçacıkların, organellerin otofagozom içine alınıp daha sonra lizozomlarla birleşerek degradasyon yapılması olayıdır. Şaperon aracılı otofaji: Belli bir peptid sekanslı sitozolik proteinlerin moleküler şaperonlarla kompleks olan Hsp73 tarafından tanınması ve lizozomlara taşınmasıdır. Bu

tip protein degradasyon yolağında veziküler bir trafiğe gerek yoktur (Majeski ve Dice, 2004, Shintani ve Klionsky, 2004, Kroemer ve ark, 2010, Mehrpour et al., 2010).



Şekil-2.6. Otofajinin şematik gösterimi (Anding ve Baehrecke, 2015)

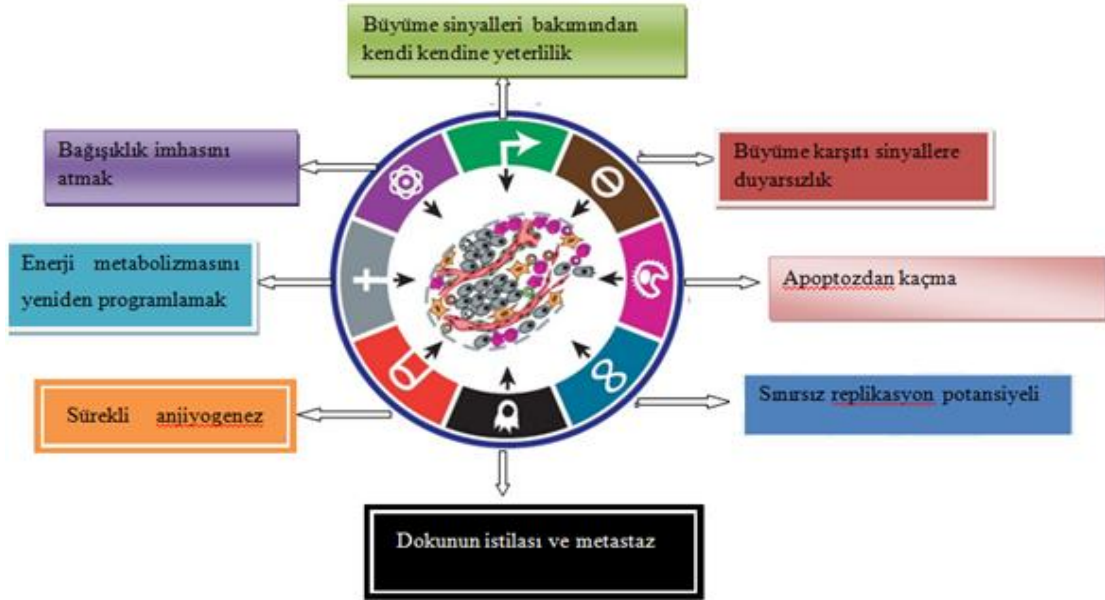
2.5. Kanser Oluşum Mekanizması

Normal hücrelerin kanser hücresine dönüşüm sürecine *karsinogenez* denir. Karsinogenez süreci, normal hücrelerden farklı olarak, sekiz temel hücresel değişiklik ile gerçekleşen çok basamaklı süreçtir. Hücrelerde kansere neden olan değişiklikler sırasıyla şöyledir:

- Büyüme sinyalleri bakımından kendi kendine yeterlilik,
- Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık,
- Apoptozdan kaçma,
- Sınırsız replikasyon potansiyeli,
- Dokunun istilası ve metastaz,
- Sürekli anjiyogenez
- Enerji metabolizmasını yeniden programlamak
- Bağışıklık imhasını atmaktır

Bu özelliklerin edinilme sırası ve malign hastalığa olan katkılarının göreceli dengesi ve önemi, insan kanserleri yelpazesinde farklılıklar göstermektedir. Bu işaretlerin

temelinde, kazanımları hızlandıran ve genetik çeşitliliği üreten, genom dengesizliği vardır (Hanahan ve ark. 2011; Lodish ve ark. 2008).

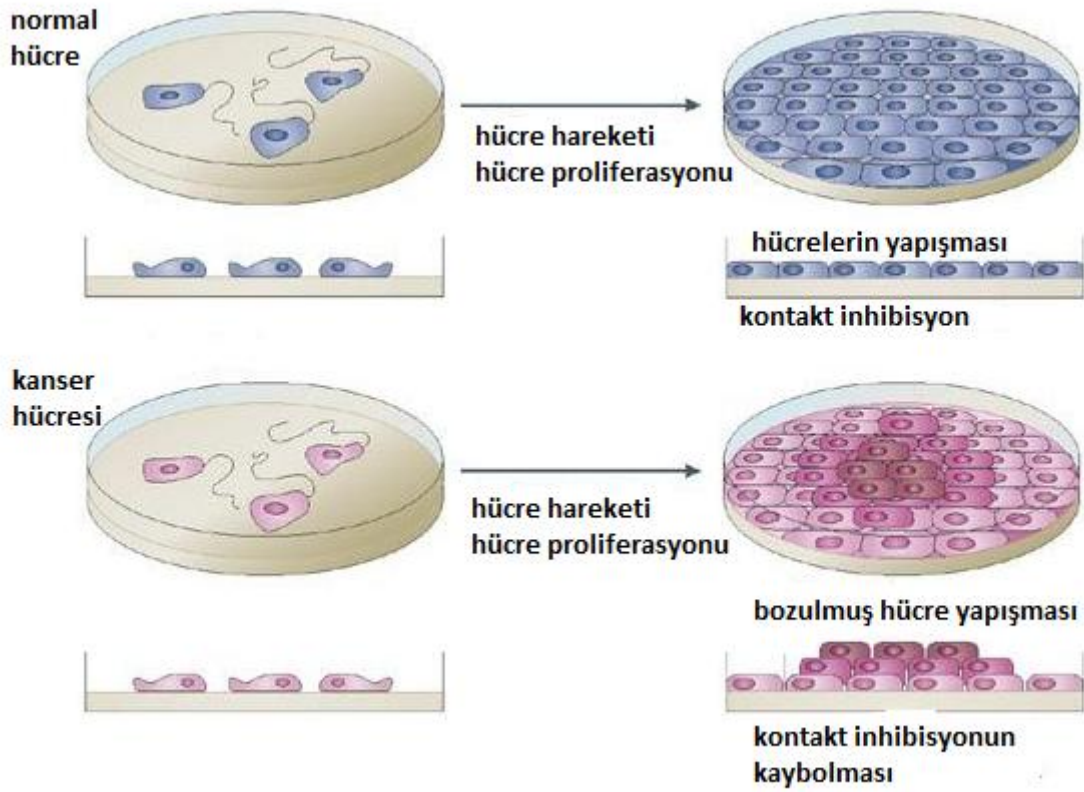


Şekil-2.7. Karsinogenez basamakları (Hanahan ve ark. 2011)

Kanser hücreleri, proliferatif sinyalleme bir dizi alternatif yolla sürdürme kabiliyetine sahiptirler. Büyüme faktörü ligandlarını kendileri üretebilirler, daha sonra soydaş reseptörlerin birlikte ekspresyonu yoluyla cevap verebilirler, böylece otokrin proliferatif stimülasyonuna yol açarlar (DeVita ve ark. 2015).

Normal fibroblastlar, bir komşu hücre ile temas edinceye kadar bir kültür tabağının yüzeyi boyunca göç eder. Daha sonra hücre göçü engellenir ve normal hücreler birbirine yapışarak kültür tabağı yüzeyi üzerinde düzenli bir hücre dizisi oluşturur. Sadece hareket değil, aynı zamanda birçok normal hücrenin çoğalması, hücre-hücre teması tarafından inhibe edilir. Bu durumda canlı organizmada normal dokularda doku zedelenmesinin tamiri sürecinde çoğalan sağlıklı hücreler bu uyarıları algılayarak bölünmelerini durdururlar. Buna *kontakt inhibisyon* denir. Tümör hücreleri temastan sonra hareket etmeye devam eder. Komşularıyla birlikte, bitişik hücreler üzerinde göç ederler ve düzensiz, çok katmanlı şekilde büyürler. Kanser hücreleri, karakteristik olarak bu temas inhibisyonuna karşı duyarsızdır. Tümör hücreleri komşu hücrelerin sıkışmasıyla oluşan dur sinyallerine uymaz ve bölünmelerine devam ederler (kontakt inhibisyonun

kaybolması) (Ribatti D, 2017). 1954'teki "Nature" yazısında Abercrombie ve Heaysman, temas inhibisyonunun, fibroblastları normal şartlar altında büyük ölçüde immobil bir organizma içinde tutmada rol oynayabileceğini öne sürdü. Abercrombie ve Heaysman, sarkom hücreleri ve normal hücreler arasında temas inhibisyonun çok zayıf veya eksik olması gerektiğine karar vermiş ve bütün malign hücrelerin, kontakt inhibisyonunun azalması veya yokluğu ile karakterize olduğunu ileri sürmüştür. "Bir organizma içindeki hücrelerin immobilizasyonu, ancak kötü huylu bir tümör durumunda kırılır" hipotezine varmışlardır (Ribatti D, 2017; Abercrombie M ve Heaysman J, 1954).



Şekil-2.8. Kontakt inhibisyonun kültür ortamındaki gösterimi

(www.nature.com/nrm/journal/v9/n8/box/nrm2457_BX1.html)

2.6. Çalışmada Kullanılan Kanser Hücre Hattı

A549 hücre hattı, 1973 yılında bir pulmoner adenokarsinomdan izole edilmiştir (Giard ve ark. 1973). Akciğer kanserinin küçük hücreli olmayan insan bazal epitelyum

hücreleri kaynaklı bir hücre hattıdır (Hung ve ark. 2009). Hücre kültüründe tek tabakalı olduğu ve yapışarak çoğaldığı gözlenmiştir. Bu hücre dizisi in vitro ortamda çalışılmaya uygundur.



Şekil-2.9. A549 Hücre Dizisi

2.7. *Leiurus Abdullahbayrami* Akrep Türünün Biyolojik Özellikleri

Akrepler, hayvanlar aleminin Arthropoda şubesi, Arachnida sınıfı, Scorpiones takımında yer alan eklem bacaklı canlılardır. Genellikle kendilerini korumak için, insan ve hayvanları sokarak zehirlenme ve ölümlere sebep olmaktadır (Ayhan, 2015). Akrelerin zehirleri, acı bölgesindeki ağrıdan ölüme kadar çeşitli semptomlara sebep olabilen düşük moleküler ağırlıklı peptidlerden oluşan nörotoksik polipeptitler içermektedir. Zehir içeriğindeki toksinler, ilaçlara benzer bir şekilde, etkilerini hücresel reseptörlere bağlanarak gerçekleştirirler. Akrep zehrinden elde edilen bir çeşit toksin olan Klorotoksin, kas hücrelerindeki kanalları bloke ederek iyonların geçişini durdurmaktadır. Esas itibarıyla, doğru dozda uygulanacak istenilen özellikteki toksik bir zehir bileşeni hastalıkları tedavi etmede faydalı olabilir (Lewis ve Garcia, 2003). Akrepler, çöllerde, ormanlık alanlarda, taşlık ve kayalık yerlerde yaşayan, geceleri aktif olan predatör canlılardır (Özkan ve Karaer, 2003).

Hayvan zehirleri, iyonik kanal inhibitörleri olarak görev yapan ve hayati fizyolojik süreçleri hedef alan çeşitli toksinlere, proteinlere ve peptidlere sahiptir. Bal arısı, yaban arısı ve akrepten izole edilen toksin peptidleri, membran bağlanması, büyüme inhibisyonu ve güçlü sitolitik özellikler gösterir. Fizyolojik olarak hayvan toksinleri, çeşitli iyon kanallarını bloke eder ve moleküllerin hücre zarı boyunca hareketini serbestleşmesi yönünde normal bariyeri kırar. Zehir toksinleri spesifik olarak nöronlara, nikotinik asetilkolin reseptörlerine ve nöromusküler eklemlere etki eder. Bir fosfolipaz toksini, motor sinir terminalleri ve kas hücreleri üzerinde ciddi şekilde etki eder. İskelet kaslarına zarar verir ve hücre yenilenmesini engeller. Bunlar aynı zamanda anjiyogenezi inhibe eder ve deney hayvanlarını tümör gelişimine karşı koruyan intrinsik mitokondriyal yoldan melanom hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu indükler. Hayvan zehirlerindeki peptitin net yükündeki bir artış, hedef hücre zarlarının hidrofobikliği, anyonikliği ve akışkanlığı olarak geleneksel kimyasal ilaçlara göre üstünlük gösterirler. Hedef hücre zarı ile biyofiziksel etkileşim yoluyla etki sağlar. Akrep zehiri sitotoksikite sergiler, meme ve kolorektal kanser hücre hatlarında hücre döngüsü durması ve apoptozu indüklediği gözlenmiştir (Upadhyay RK, 2018) .

Leiurus Buthidae familyasına ait başlangıçta monotipik bir cins olarak kabul edilse de daha sonra dört ek tür tanımlanmıştır. Bunlardan Türkiye'de daha önce *Leiurus quinquestriatus* olarak tanımlanan akrep türü yapılan taksonomik çalışmalarla *Leiurus abduallahbayrami* yeni tür olarak tanımlandı (Yağmur ve ark, 2009). 16S rRNA sekansı verileri, *Leiurus* cinsinin Türkiye'de tek bir tür *L. abduallahbayrami* ile temsil edildiğini göstermektedir (Ayhan ve ark, 2018).



Şekil-2.10. *Leiurus abdullahbayrami* genel görünüşü (Dokur M ve ark, 2017)



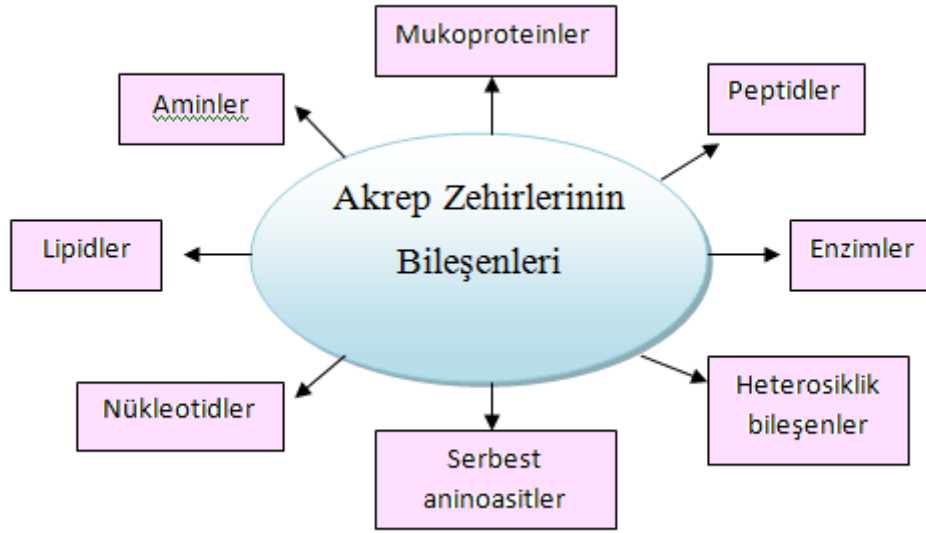
Şekil-2.11. *Leiurus abdullahbayrami*'nin genel görünüşü (Yağmur ve ark., 2009)

2.7.1. Akrep Zehirinin Bileşenleri ve Protein İçeriği

Leiurus abdullahbayrami Türkiye'de halk sağlığı açısından tıbbi önemi olan endemik bir akrep türüdür. Yapılan çalışmalarda *L. abdullahbayrami* akrebinin zehiri hem kısa hem de uzun zincirli nörotoksinler içerdiği belirlenmiştir (Erdeş ve ark, 2014).

Akrep zehirleri, su, tuzlar, enzimler, peptitler, nükleotitler, lipitler, mukopteinler, biyojenik aminler ve diğer bilinmeyen maddeler gibi bileşenleri oldukça karmaşık karışımlardan oluşur (Possani L.D ve ark, 2006). Aynı zamanda nörotoksinler, kardiyotoksinler, nefrotoksinler ve hemotoksinler gibi değişken miktarda farklı toksinler

içerir. Enzimler; yani fosfodiesterazlar, fosfolipazlar, hyaleuronidaz, glukosaminoglikanlar, histamin, serotonin ve triptofan ve sitokin salma maddeleri gibi diğer bazı biyo-kimyasalları içerir (Upadhyay RK, 2018).

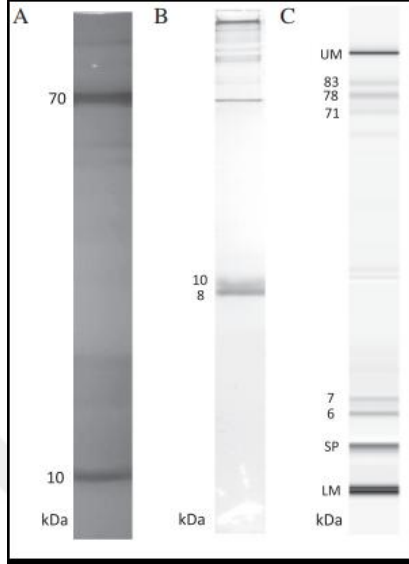


Şekil-2.12. Akrep zehirinin bileşenleri (Ghosh ve ark, 2019)

L. abdullahbayrami ham zehirinin kuru ağırlığının yaklaşık yarısını proteinler oluşturmaktadır. Zehirin protein içeriği, 0.513 mg protein / ml olarak bulunmuştur. Erdeş ve arkadaşları tarafından, *L. Abdullahbayrami* protein içeriği ve elektroforetik analizi Bradford tahlili ile %54 olduğunu belirledi. Aynı cinsin yakın üyesi *L. quinquestriatus*'un zehiri, daha önce yapılan çalışmalarda %65 protein içerdiği tespit edildi. Erdeş ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu çalışmada, zehirin protein profili Şekil-2.13'de gösterilmektedir. *L. abdullahbayrami*'nin peptid kütle profili, peptitlerinin üçte birinin 3-4 kDa aralığında olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, peptidlerin büyük bir kısmı 6.5-7.5 kDa ağırlığında olup, peptidlerinin % 30'u 1-2 kDa aralığındadır. 3 ila 4,4 kDa'ya sahip kısa zincirli nörotoksinler, potasyum veya klorür kanalları üzerinde etki ederken, 6.5 ila 8.5 kDa'ya sahip olan uzun zincirli nörotoksinler ise çoğunlukla sodyum kanallarına etki etmektedir (Erdeş ve ark, 2014).

L. abdullahbayrami türünde protein analizi çalışmaları literatürde mevcut değildir. Fakat farklı akrep zehirlerinden izole edilen bazı peptidler şöyledir: Ctriporin, Klorotoksinler (cltx), Neopladine I ve II, Meucin 24, Meucin 25 ve Hp 1090. Farmasötik

aktiviteye sahip en çok tanınan akrep türü; *Pandinus imperator*, *Chaerilustricostatus*, *Buthus martensii*, *Mesobuthus eupeus*, *Leiurus quinquestriatus*, *Tityus discrepans* ve *Heterometrus bengalensis*'dir (Uzair B ve ark, 2018).



Şekil-2.13. *L. Abdullahbayrami* akrep zehirinin protein profili

(A) Gliscin SDS-PAGE,

(B) Tris SDS-PAGE,

(C) MCE sonuçları(Erdeş ve diğ., 2014).

(microfluidic capillary electrophoresis)

2.7.2. *L. abdullahbayrami* Zehirin Lethal Dozu

Zehrin farelerde deri altı enjeksiyonu sonucu öldürücü dozu, 0.19 mg / kg olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre, *L. abdullahbayrami*'nin Türkiye'de yaşayan akrepler arasında en yüksek toksin etkisine sahip olduğu söylenir (Özkan ve ark, 2011). Akrep zehirlenmeleri vakalarında Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde öne çıkan akrep türü *Androctonus crassicauda*'dır. *Androctonus crassicauda* akrep zehirinin öldürücü dozu 0.40 – 0.50 mg/kg olduğu gösterilmiştir (Özkan Ö ve Filazi A, 2004). Zehir aynı yöntemle çıkarılmış olsa bile, ölümcül doz; cins, tür, cinsiyet, akreplerin coğrafi orijini ve zehrin yapısı ve miktarı gibi birçok faktöre bağlıdır (Krifi MN ve ark, 1998).

L. abdullahbayrami ham zehiri, MCF-7 hücreleri üzerinde proliferatif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, araknid zehirlerinde yüksek konsantrasyonda poliaminlerin yanı sıra potasyum ve kalsiyum iyonları ile açıklanabilir (Erdeş ve ark, 2014).

2.7.3. Akrep Zehirlerinin Etki Mekanizması

Zehirin canlı organizmaya penetre edilmesinden birkaç saniye sonra toksinler, şiddetli bir ağrı ile vücut hücrelerinde ani enflamasyona neden olur ve nöronlarda aksonal iletimin büyük ölçüde inhibe olmasını sağlar. Toksinler ayrıca hücre hacminin ve hücre içi iyonik bileşimin özellikle Na^+ ve K^+ gradyanlarının korunmasında anahtar rol oynayan ATP bağımlı $\text{Na}^+ -\text{K}^+$ ATPaz pompasının etkinliğini de etkiler. Bu pompa aktif olarak, iyonları hücre zarı boyunca taşır ve sinirlerin uyarılmasına yardımcı olur. Potasyum ve klorür kanallarını kısa zincirli peptitler bloke eder, sodyum ve kalsiyum kanallarını uzun zincirli peptidleri bloke eder (Kastin 2006; Smith ve ark. 2012; Petricevich 2010; Possani ve ark, 2000). Kas hücrelerinde fosforilasyon ve defosforilasyon yapar (Upadhyay RK, 2018).

Çizelge-2.3. Fizyolojik etkileri ve terapötik kullanımları ile farklı akrep türlerinden izole edilmiş toksin peptitlerinin gösterilmesi (Upadhyay RK, 2018).

Akrep Türü	Toksin peptidinin adı	Fizyolojik etki	Toksin kategorisi	Terapötik kullanım
<i>Androctonus bicolor</i> (AB),	AahI-AahI'- AahII: Aah zehir toksini	Hücre döngüsü durması ve apoptozu tetikler	Sitotoksiste sergiler	Antikanser özelliği
<i>Leiurus quinquestriatus</i> (LQ)	Lqh	Sitotoksik ve apoptopik etkiler	Kardiyak etkilerin uyarılması	Toksin, membran seviyesinde antikansere etki eder
Akrep zehiri	Chlorotoxin (CTX) peptide	Seçici olarak glioma Cl^- kanal aktivitesini bloke eder	Malign gliomaları hedefler	Sitotoksiste

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

3.1.1. Akrep Zehirinin Elde Edilmesi

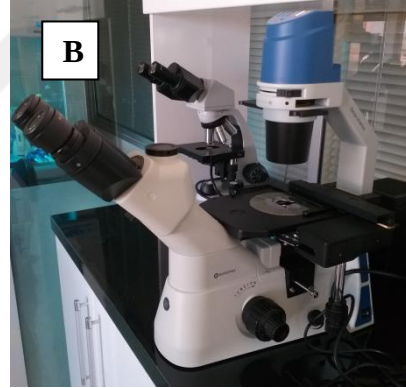
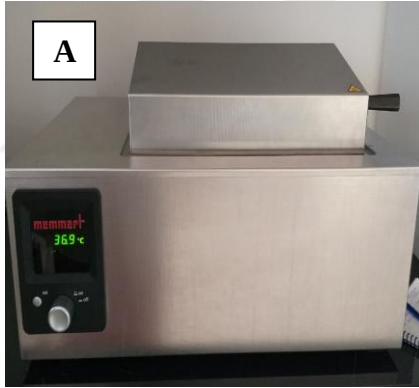
Akrepler Hatay, Reyhanlı ilçesi ve Çakıryiğit mahallesinden (36°15'29.6"N 36°36'30.9"E, 728 m) Mart-Nisan 2019 tarihleri arasında UV ışık altında pens yardımıyla toplanmıştır. Toplanan örneklerden zehir alınabilmesi için canlı olarak laboratuvara getirilmiştir. Ortalama 150-200 mg ağırlığında 10 adet akrep (*Leiurus abdullahbayrami*) oda sıcaklığında (22-24 °C) ve belli bir nem oranında (%50±10), cam kaplarda yaşatılmıştır. Akreplere haftada bir defa canlı besin olarak çekirge verilmiştir. Akreplerden elektriksel uyarım yöntemi ile 20 volt'luk oluşturulan elektrik akımı 2-3 saniye süresince iki pens yardımıyla tutulan akrep kuyruğuna iki elektrot kullanılarak zehirler alınmıştır. Alınan zehirler steril tüplerde -80°C'de deneyler yapılncaya kadar saklanmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Dimetilsülfoksit-d⁶ ((CD₃)₂SO): MTT analizinde kullanıldı. Analitik saflıkta, Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.
- 3MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue): Capricorn firmasından temin edildi.
- Non-essential Tyrpsin-EDTA (%0.25)-Capricorn firmasından temin edildi.
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/ Ham's F-12: Capricorn firmasından temin edildi.
- FBS (Fetal Bovine Serum): Capricorn firmasından temin edildi.
- Dulbecco's PBS: Capricorn firmasından temin edildi.
- RB1, RNW Buffer, SW1 Buffer, RNase-Free su Geneall firmasından temin edildi.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Mini santrifüj (MRC-ECEN-6)
- Euromex oxion inverted (Euromex)
- CO₂ inkübatörü-%5 CO₂ (Nuve)
- Buzdolabı (+4°C ,Arçelik)
- Laboratuar tipi derin dondurucu (-80°C Nuve)
- Vortex (MRC)
- Su banyosu (Mettler)
- Derin dondurucu (-20, Seq)
- Mikro 120 santrifüj (Hettic)
- Proflex pcr system (Applied)
- Class II BGK (Nuair)
- 7500 fast Real time PCR (Applied)





Şekil-3.1. Çalışmada kullanılan cihazlardan bazıları A: Su banyosu, B: Mikroskop, C: Biyogüvenlik kabini.

3.2. Çalışmada İzlenen Metod

3.2.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı

Serumda bulunan enzimlerin inaktivasyonu için FBS (fetal bovine serum) 55°C su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Besiyeri (FBS) ve penisilin/streptomisin 37°C de 15-20 dakika inkübe edildi. Serumun total hacme oranı %10 olarak ayarlandı (www.lgcstandards-atcc.org/geo_country=tr.).

1. 35,2 ml Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Ham's F-12)
2. 4 ml fetal bovine serum (FBS) (%10)
3. 0,4 ml Penisilin-Streptomisin (%1)
4. 0,4 ml L-glutamine (%1)

Maddeleri 50 ml'lik falkona eklendi ve besiyeri homojen bir şekilde karıştırılarak kullanıma hazır hücre kültür medyumunu elde edildi.

3.2.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları

Akciğer kanseri hücre hattı (A549), 3. pasaj olarak kullanıldı. DMEM besi yeri medyumunu içerisinde %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık koşullarındaki etüvde (Nuve; EC-160) 75 cm²'lik flasklarda steril şartlarda 24 saat süre ile inkübe edilerek hücrelerin çoğalması sağlandı.

3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi

Ökaryotik hücreler genelde serum ve dondurma işleminde kullanılan katkı maddesi (FBS) içeren ortamda, sıvı nitrojen içinde -196°C'de saklanır. Donmuş hücreler, maksimum canlılık elde etmek için en kısa zamanda hızlı bir şekilde çözülmelidir (www.lgcstandards-atcc.org/geo_country=tr.). Açılarak uygun şartlardaki etüve (%5 CO₂ ve 37°C) yerleştirilen hücrelerin besiyerleri, saklama koşullarında kullanılan katkı maddesini uzaklaştırmak için 24 saat sonra değiştirildi.

1. Cryo tüp içerisinde dondurulmuş olarak bulunan A549 hücre hattı, 37°C'lik su banyosunda tutuldu ve hızlıca çalkalandı. 1 dakika içinde buzu çözüldü.
2. Buzları çözülmüş olan cryo tüp, %70 etanol içeren beherin içine bırakıldı ve laminar akımlı kabine yerleştirildi.
3. Cryo tüp, etanolün içine girmesi engellenecek şekilde açıldı.
4. Cryo tüpün içi falkona boşaltıldı ve hemen ardından üzerine ısıtılmış 6 ml medyum eklendi.
5. Bir miktar besiyeri ile cryo tüp temizlendi ve falkona aktarıldı.
6. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı .
7. Süpernatant uzaklaştırıldı (Pelletin tüpün dibinden kalkmamasına özen gösterilerek serumun tamamı uzaklaştırmaya çalışıldı).
8. Peletin üzerine 5 ml besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı.
9. 1200 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı.
10. Süpernatantı uzaklaştırıldı.
11. Hücreler etiketlenen flaskın (A549/P3/05.03.2019/ Nahide Fidancıoğlu şeklinde etiketlendi) tabanına pipetlendi.
12. Flask dik konuma getirildi ve besiyeri eklendi (T25 cm²;5ml, T75cm²;12ml).

13. Yatay konuma hafif karıştırıldıktan sonra mikroskopta incelendi ve CO₂ inkübatöre bırakıldı.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing)

Hücreler sıkışık (konfluent) duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur (Ribatti D. 2017; Freshney I. 2015). Bu nedenle hücrelerin pasajlanması gerekir.

1. Komplet hücre kültür ortamı, PBS ve %0,25 tripsin-edta su banyosunda 37°C'ye ısıtıldı.
2. Hücreler CO₂ inkübatöründen alındı ve mikroskopta incelendi.
3. Flask dik konuma getirildi ve hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet değdirilmeden ortam yavaşça çekildi.
4. Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flask alt köşesine 6ml PBS eklendi, yüzey yıkandı ve PBS yavaşça çekildi.
5. Yeni bir pipet ile ortama %25 tripsin-edta eklendi ve flask 2-3 dakika CO₂ inkübatöründe tutuldu (T25;3 ml T75; 5ml)
6. Mikroskopta hücrelerin flask tabanından serbestleşip serbestleşmediği kontrol edildi.
7. Hücreler serbestleşmesi için tabanına birkaç kez vuruldu.
8. Serbestleşen hücreler ile flaska komplet ortam eklendi (eklenen tripsinin 3-4 katı) ve santrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Hücreler 1200 rpm de 5dk santrifüj edildi.
10. Supernatant tüpün tabanında 1 ml kadar bırakılacak şekilde uzaklaştırıldı.
11. Hücre pelletini çözmek için tüpün dibine birkaç defa hafifçe vuruldu.
12. Tüpe 5 ml taze medyum eklenerek pipetaj yapıldı.
13. 1200 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı.
14. Süpernatant uzaklaştırıldı.
15. Hücrenin yoğunluğuna göre besiyeri eklenerek seyreltildi.
16. Hücre yoğunluğuna mikroskop ile bakıldı.
17. Flask üzerine hücre hattı ismi, pasaj numarası, pasaj tarihi yazıldı.

18. Hücre ekildikten sonra üzerine besiyeri eklendi.
19. Hücreler mikroskopta incelendi.
20. Flask CO₂ inkübatörüne yerleştirildi.

3.2.5. Deney Gruplarında Kullanılan Akrep Zehirinin Doz Ayarlama Şekli

Öncelikle 1 µl ham akrep zehiri 1 ml kültür medyumuna ile dilüe edildi. Daha sonra 1/1000 oranında dilüe edilen zehir

- 1/100 oranında yani 1 µl dilüe edilmiş zehir ve 99 µl besi yeri
- 1/10 oranında yani 10 µl dilüe edilmiş zehir ve 90 µl besi yeri
- 1/5 oranında yani 20 µl dilüe edilmiş zehir ve 80 µl besi yeri olacak şekilde 3 doz ayarlandı.

Bu dozların dilüe edilmiş oranları ise şöyledir:

- 1/100000
- 1/10000
- 1/5000 şeklindedir.

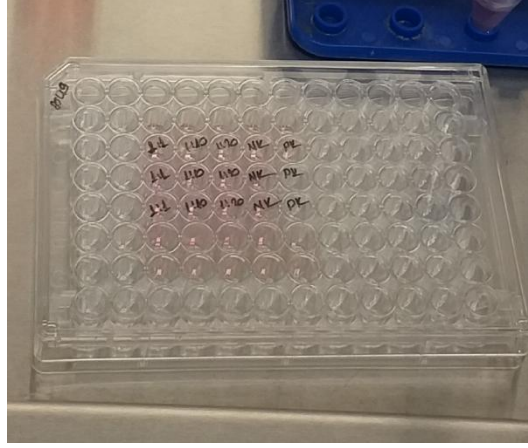
Hazırlanan 3 farklı doz MTT testi için kullanıldı. Negatif kontrol grubuna sadece hücre ve kültür medyumuna eklendi. Pozitif kontrol grubuna ise hücrelerin tam ölümü amacıyla H₂O₂ (hidrojen peroksit) uygulandı. Microsoft Excel programı kullanılarak uygulanan doz ve % hücre yaşam eğrisi belirlendi ve %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı (Fu ve ark, 2004). Bu hesaplama göre akrep zehiri 1/3000 oranında besi yeri ile dilüe edilerek A549 kanser hücre hattına uygulandı.

Çizelge-3.1. MTT Well plate ekim dizaynı ve uygulanan zehir dozları

	1	2	3	4	5
A	BESİYERİ	BESİYERİ	BESİYERİ	BESİYERİ	BESİYERİ
B	A549 1/100 24.SAAT	A549 1/10 24.SAAT	A549 1/5 24.SAAT	A549 NK 24.SAAT	A549 PK 24.SAAT
C	A549 1/100 24.SAAT	A549 1/10 24.SAAT	A549 1/5 24.SAAT	A549 NK 24.SAAT	A549 PK 24.SAAT
D	A549 1/100 24.SAAT	A549 1/10 24.SAAT	A549 1/5 24.SAAT	A549 NK 24.SAAT	A549 PK 24.SAAT
E	BESİYERİ	BESİYERİ	BESİYERİ	BESİYERİ	BESİYERİ

*PK. Pozitif kontrol

*NK. Negatif kontrol



Şekil-3.2. MTT well plate görüntüsü

3.2.6. MTT Cell Viability testi (Biotium) (Mosmann, 1983)

1. 96-well kültür platelerine hücreler ekildi. Genellikle, her bir kuyuya ekilecek olan hücre yoğunluğu 5000-10000 olmasına dikkat edildi. Böylece 48-72 saatte hücreler optimal densiteye ulaştı.
2. 1 µl akrep zehiri 1 ml besiyeri ile 15 ml'lik falkonda dilüe edildi.
3. Her bir kuyudaki kültür medium hacmi 100µl olacak şekilde, medium oranı 10% FBS (Fetal Bovine Serum), %1 penisilin/streptomisin ve %1 antimikotik içerecek şekilde ve akrep zehirinin uygun konsantrasyonlarında ekim yapıldı. 24 saat 37°C'de ve %5 CO₂'de inkübe edildi.
4. MTT solüsyonunda herhangi bir tortu gözlemlendiği taktirde, solüsyon 37°C'de ısıtılarak karıştırıldı. Bu işlem hiçbir tortu görülme-yene kadar devam ettirildi.
5. Her bir kuyudaki 100 µl mediaa 10 µl MTT solüsyonu eklendi. Plate dikkatli birşekilde plate trayinin yüzeyi kullanılarak zemine vuruldu veya orbital shaker kullanılarak plateteki mediumun MTT solüsyonu ile karışması sağlandı.
6. Plate, 37°C'de 4 saat boyunca inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrası 200 µl dimetilsulfoksit (DMSO) mediumun içine eklendi ve pipetleme işlemiyle formazan tuzunun çözülmesi sağlandı. Kuyudaki son hacim 300 µl olmalıdır (standart bir 96-well platete her bir kuyunun hacmi 400 µl'dir.).
8. Spektrofotometrede sinyal absorbansının 570 nm dalga boyunda okuması yapıldı.

Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

3.2.7. Real Time PCR

Hybrid R ile RNA izolasyonu yapıldı. (GeneAll, Cat no:106-101)

1. Hücrenin üzerine 500 µl RiboEx eklendi.
2. Oda ısısında 5 dk inkübe edildi. Bu sırada hücre içeriğinin ortaya çıkması için hücre liziz edilmiş oldu.
3. Üzerine 100 µl kloroform eklendi. Hücrenin açığa çıkan farklı bileşenleri kloroform sayesinde görünür bir faz ayrımı sağlar.
4. 4°C de 12000 rpm’de 15 dk santrifüj yapıldı.
5. En üst fazda RNA içeren sıvı başka bir ependorfa alındı. Alınan sıvının hacmi kadar RB1 Buffer eklendi. Pipetaj yapılan karışım spin kolona aktarıldı. 10000 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
6. Üzerine 500 µl SW1 Buffer eklendi. 10000 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
7. Üzerine 500 µl RNW Buffer eklendi. 10000 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
8. Herhangi bir Wash Buffer kalma ihtimaline karşı 10000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı.
9. RNase-DNase free 1,5ml’lik etiketlenmiş tüplere kolonlar aktarıldı. Üzerine 50 µl RNase-free su eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı.

RNA’dan izole edilen örneklerden cDNA izolasyonu SYBR Green temelli qRT PCR ile protokolüne göre çalışma yapıldı. Kaspaz 3, Bcl-2, Bax, Atg5 genleri ve housekeeping geni ile β aktin genlerinin gen transkripsiyon düzeyleri ‘real time’ PCR (qRT-PCR) yöntemiyle belirlendi. qRT-PCR’da kullanılan karışım aşağıdaki tabloda verilmiştir. REALAMP SYBR GREEN MASTERMIX (HIGH ROX DYE) (Cat no:801-051) kullanıldı. Primerler Atlas Biyoteknoloji firması tarafından NCBI yardımı ile temin edildi.



Şekil-3.3. Ependorf tüplerde kontrol grubu ve zehir ile muamele olmuş A549 hücreleri

Çizelge-3.2. cDNA sentez bileşenleri (HyperScript (GeneAll Cat no: 602-110))

Bileşenler	Miktar
RNA	3 µl (2µg a kadar eklenebilir.)
One step master mix	10 µl
Ddh20	7 µl
TOTAL:20 µl 55°C de 60 dk 85°C de 5 dk inkübe edildi.	

Çizelge-3.3. PCR bileşenleri

PCR BİLEŞENLERİ	Miktar
2X SYBR MASTER MIX	10 µl
F(10pm)	1 µl
R(10pm)	1 µl
ROX	1 µl
Cdna	5 µl
SAF SU	2 µl
TOTAL	20 µl

Çizelge-3.4. cDNA reaksiyon koşulları

PCR KOŞULLARI		
95°C	10 dakika	
95°C	15saniye	x 40
60°C	40 saniye	
95	15 saniye	MELT CURVE
60	1 dakika	
95	15 saniye	

4. BULGULAR

4.1. *Leiurus abdullahbayrami* Akrep Zehirinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Leiurus abdullahbayrami akrep zehirinin 1/100000, 1/10000 ve 1/5000 oranında dilüe edilmiş konsantrasyonları A549 hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirildiğinde; 24 saatlik süre sonunda hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü. En fazla hücre ölümü 1/5000 oranında dilüe edilmiş grupta görüldüğü MTT ile saptandı. Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapıldı. *Leiurus abdullahbayrami* akrep zehiri uygulanan gruplara ait 24 saat inkübasyon süreli MTT sonuçları ve istatistiksel karşılaştırmalar Çizelge-4.1, Çizelge-4.2 ve şekil-4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge-4.1. MTT absorbans değerleri

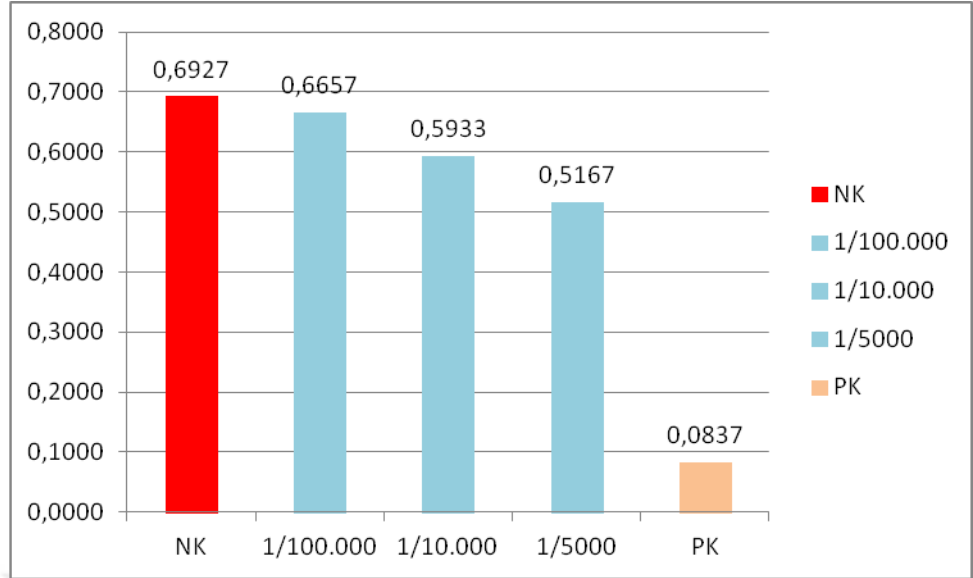
24 SAAT				
B	B	B	B	B
0,0961	0,0203	0,0125	0,0329	0,035
24 SAAT				
01/100000	01/10000	01/5000	NK	PK
0,715	0,576	0,514	0,671	0,107
24 SAAT				
01/100000	01/10000	01/5000	NK	PK
0,666	0,585	0,523	0,73	0,08
24 SAAT				
01/100000	01/10000	01/5000	NK	PK
0,616	0,619	0,513	0,677	0,064
24 SAAT				
B	B	B	B	B
0,0937	0,0778	0,0449	0,0738	0,0338

B: Besi yeri **PK:** Pozitif kontrol **NK:** Negatif kontrol

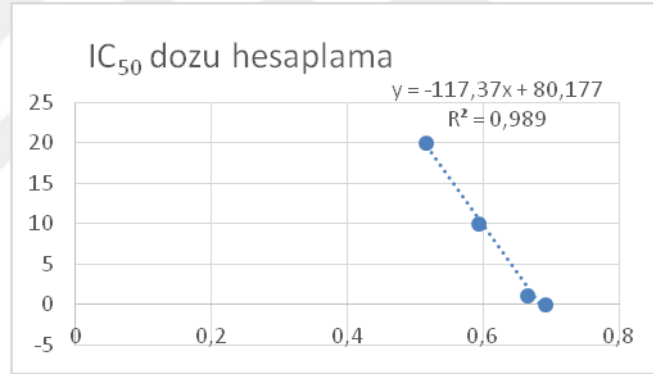
Çizelge-4.2. MTT absorbans değerleri ortalaması

NK	01/100000	01/10000	01/5000	PK
0,6927	0,6657	0,5933	0,5167	0,0837

PK: Pozitif kontrol **NK:** Negatif kontrol



Şekil-4.1. MTT absorbans değerinin pozitif kontrol, negatif kontrol ve A549 hücre hatlarına uygulanan farklı dozlardaki akrep zehiri ile karşılaştırılması



Şekil-4.2: İkili regresyon eğrisi

Hücre canlılığı ile kullanılan akrep zehiri dozu arasında neden-sonuç ilişkisini bulmamıza imkan veren regresyon analizi yöntemi ile ikili regresyon kullanılarak denklem oluşturulmuştur.

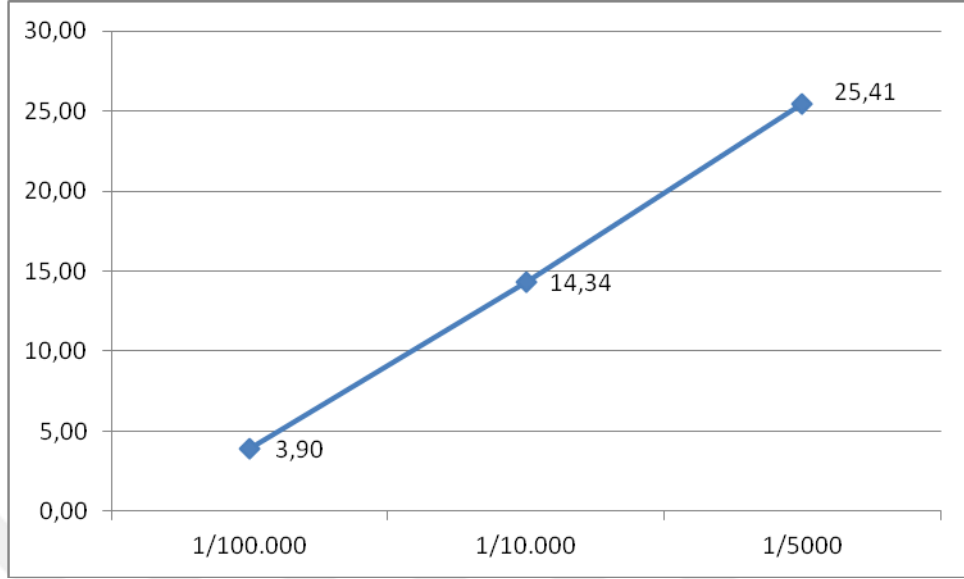
$$y = -117,37x + 80,177$$

$$R^2 = 0,989$$

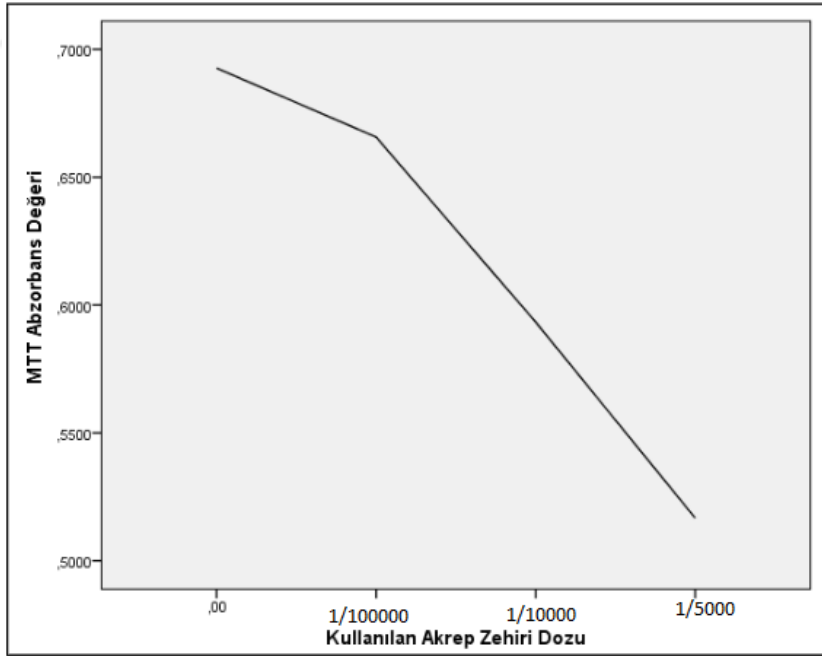
Bu denklemdeki x bağımsız değişkeni hücre canlılığını ifade ederken y bağımlı değişkeni kullanmamız gereken akrep zehiri doz miktarını tahmin etmemizi sağlamaktadır.

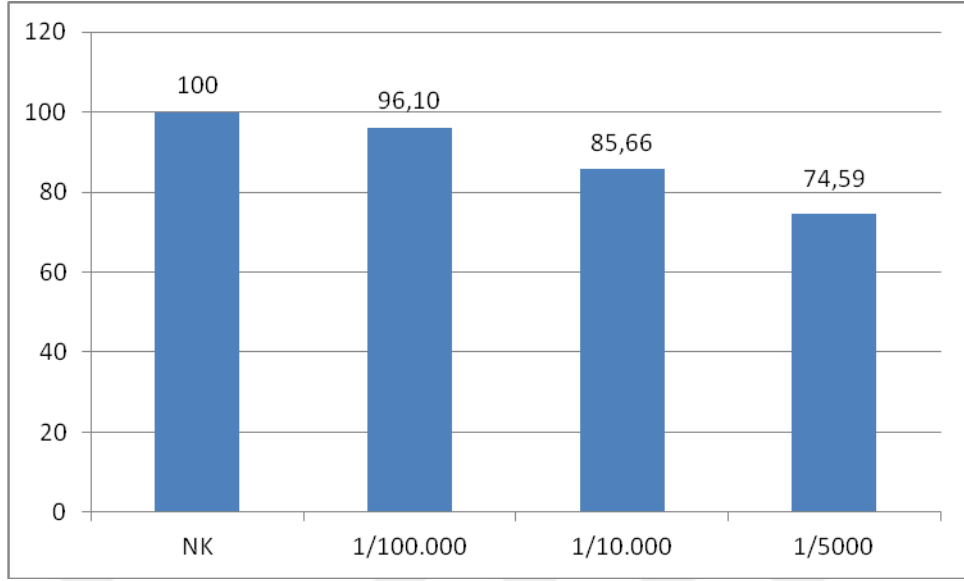
$R^2 = 0,989$ değeri hücre canlılığındaki değişimin kullanılan akrep zehiri doz miktarı ile % 98,9 alakalı olduğunu göstermektedir.

Çizelge-4.3. A549 hücrelerinin 24 saat akrep zehiri ile muamelesinin değişik dozlarda hücre ölümünün yüzde değerleri



Çizelge-4.4. A549 hücrelerine 24 saat süre ile uygulanan zehir dozlarının absorbands değerine karşılık gelen değerin çizgi grafik ile gösterimi





Şekil-4.3. Negatif kontrol ve farklı dozlarda akrep zehiri ile 24 saat muamele olmuş A549 hücrelerinin yüzde inhibisyon oranları

4.2. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın MTT analiz sonuçları SPSS Statistics 22 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında farklılığın olup olmadığı Kruskal-Wallis H Testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki anlamlılığın hangileri arasında olduğunun belirlenmesinde One-Way Anova: Post Hoc Multiple Comparison Test kullanıldı. Her test grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve $p < 0,05$ 'den küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama (ort)±standart sapma olarak ifade edildi ve tüm grafiğer Excel ortamında oluşturuldu.

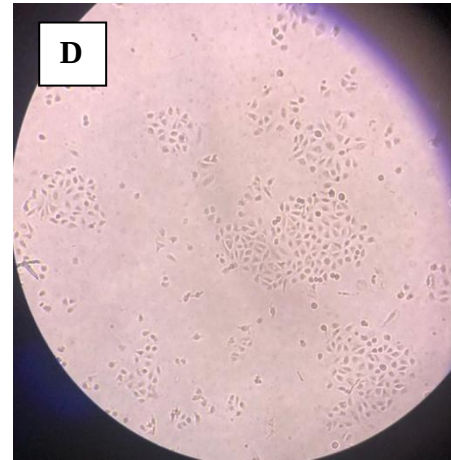
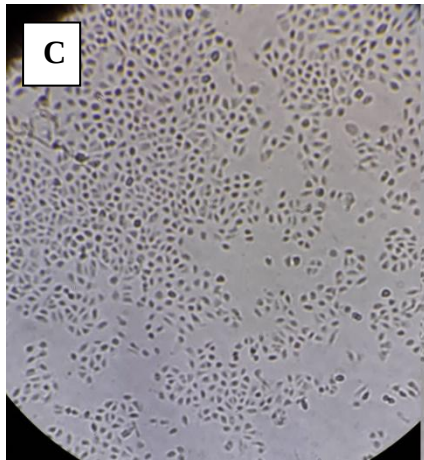
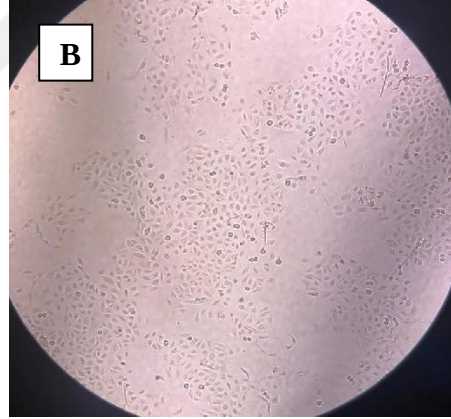
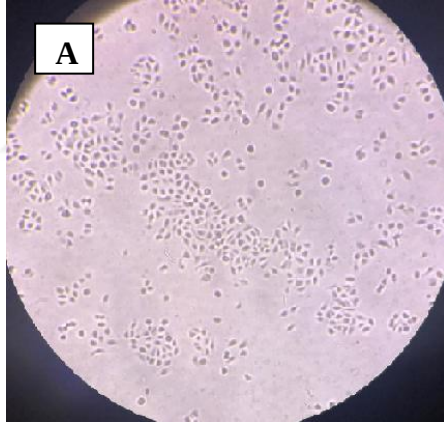
L. abdullahbayrami akrep zehrinin 1/100000, 1/10000, 1/5000 dozlarında A549 hücre canlılığı üzerine etkilerine bakıldığında; 24 saatlik süre sonunda, uygulanan dozlara göre (1/100000, 1/10000, 1/5000) anlamlılık testi uygulanmış, istatistiksel olarak sonuçlar % 95 güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir. Kruskal-Wallis H Testi kullanılarak aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

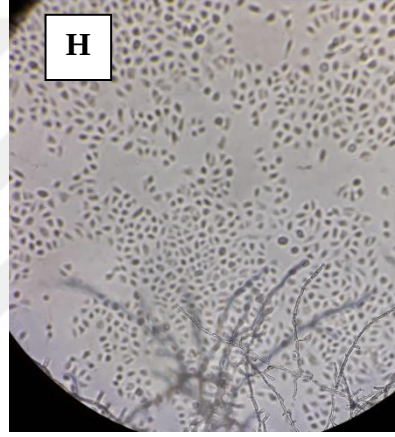
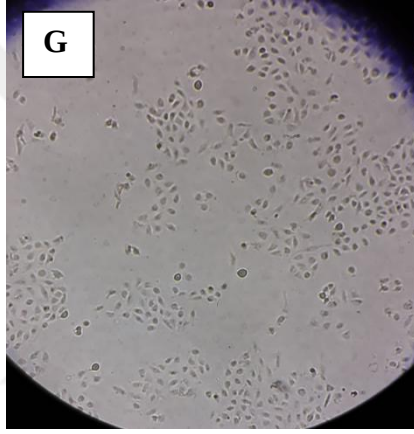
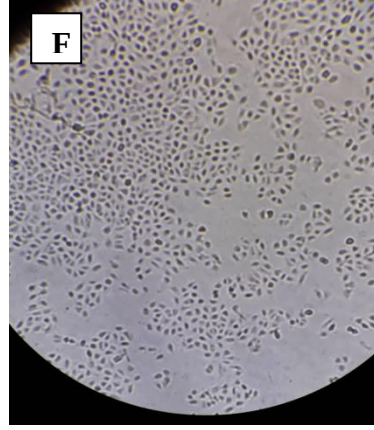
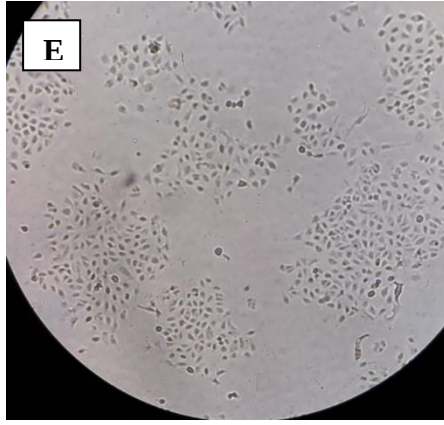
Çizelge 4.5. 1/100000, 1/5000 µl/ml konsantrasyon aralıklarında 'optik dansite' nin ortalama±standart sapma değerleri

Akrep zehiri konsantrasyonu	Ortalama ± Standart sapma
01/100000	0,66567±0,04950
01/10000	0,59333±0,02268
01/5000	0,51667±0,00551
NK (0)	0,69267±0,03247
PK	0,08367±0,02173

$p=0,027 < 0,05$ farklı dozlar uygulandığında çıkan sonuç anlamlı bulunmuştur.

Yaptığımız ön çalışmada 12 ve 24 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda akrep zehiri ile muamele edilmiş A549 kanser hücre hatlarının görüntüsü şekil-4.4'de gösterilmiştir.





Şekil-4.4. Tüm guruplarda 12 saat ve 24 saat farklı dozlarda akrep zehiri ile muamele edilen A549 hücre görüntüleri

- A. 1/100000 µl/ml oranında dilüe edilen zehir (12 saat)
- B. 1/10000 µl/ml oranında dilüe edilen zehir (12 saat)
- C. 1/2500 µl/ml oranında dilüe edilen zehir (12 saat)
- D. 1/1250 µl/ml oranında dilüe edilen zehir (12 saat)
- E. 1/100000 µl/ml oranında dilüe edilen zehir (24 saat)
- F. 1/10000 µl/ml oranında dilüe edilen zehir (24 saat)
- G. 1/2500 µl/ml oranında dilüe edilen zehir (24 saat)
- H. 1/1250 µl/ml oranında dilüe edilen zehir (24 saat)

4.3. RT-PCR Analizi Sonuçları

Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile değerlendirilen Kaspaz-3 geni ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre biraz düşerken; Bax geni ekspresyon düzeyi kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 3 kat arttığı belirlenmiştir. Bcl-2 gen ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Atg5 geni ekspresyon düzeyi ise kontrol grubuna kıyasla düşüş göstermiştir (Çizelge-4.6, Şekil-4.5)

Aktin, tüm hücreler için hücre iskeletini oluşturan ve ekspresyonu hücre içinde değişmeyen bir hücre içi protein olduğundan çalışmada internal kontrol olarak kullanıldı. mRNA seviyelerini ölçmek için RT-PCR kullanılması, numunelerin karşılaştırılmasında payda olarak beta-aktin geninin kullanımına yol açmıştır. Bu genin ekspresyonunun sabit kaldığı kabul edilir, bu nedenle işleme ve sinyal miktar tayinindeki değişimler için normalleşir. Bununla birlikte, beta-aktin ekspresyonunun proliferasyon, aktivasyon ve farklılaşma ile yukarı doğru düzenlendiği belgelenmiştir (Redies C. 2012). Atg5, BCL, BAX ve CASP3 ekspresyonları kantifikasyonu ACTB geni referans olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplaması olan “ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Yöntemi” kullanılmıştır.

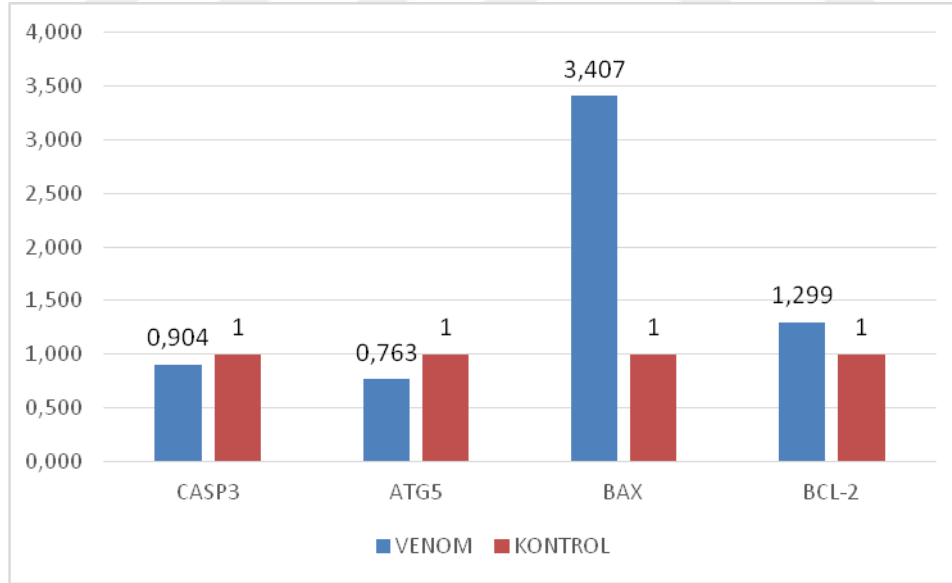
Real time PCR işlemi sonucunda elde edilen değer C_t (threshold cycle) değeridir. PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artışı ifade eder.

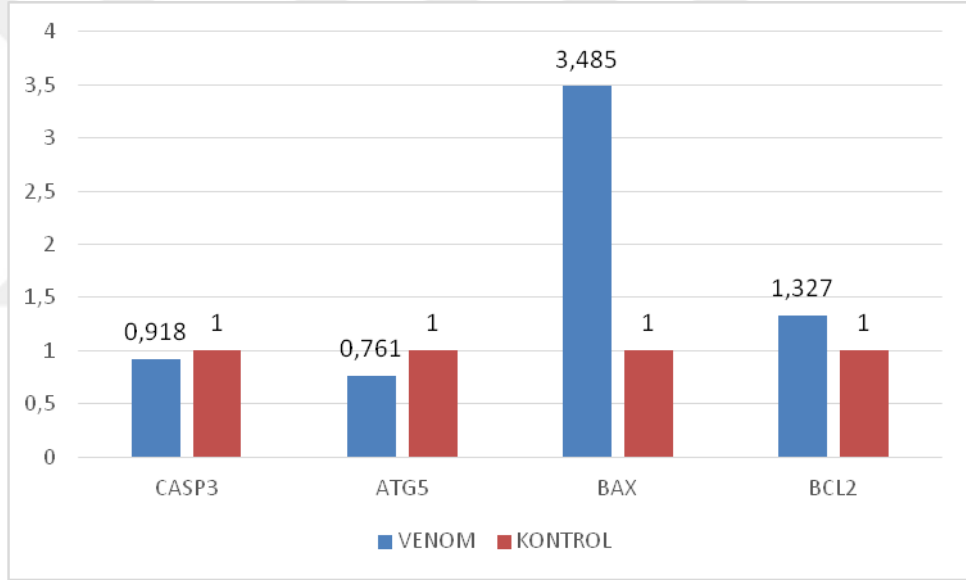
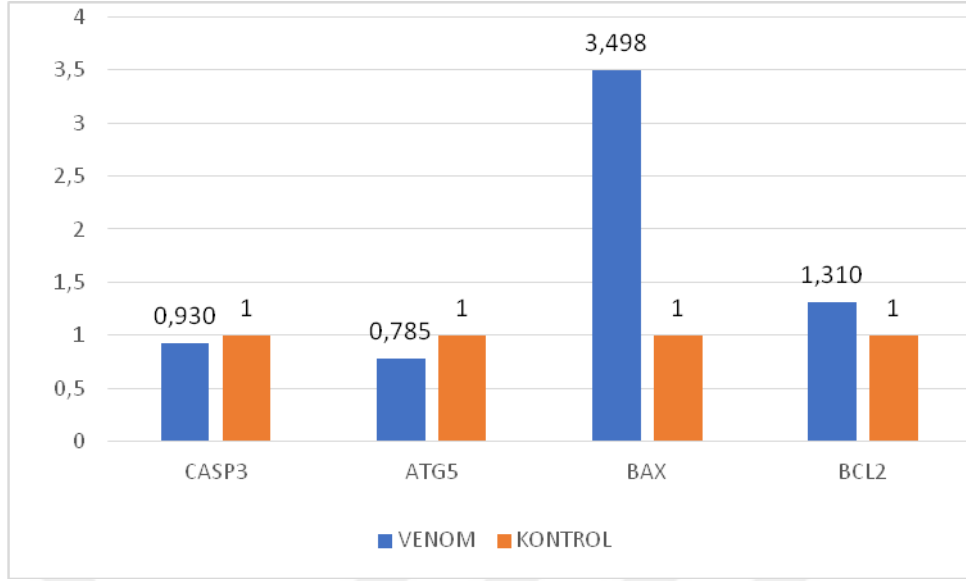
- Her bir örneğe ait, her bir genin C_t değerleri, o örneğin house keeping C_t değerinden çıkartılarak delta siklus eşiği (ΔC_t) değerleri hesaplandı.
- Daha sonra zehir uygulanan deney grubunun ΔC_t değerleri kontrol grubunun C_t değerinden çıkartılarak delta-delta siklus eşiği ($\Delta\Delta C_t$) değerleri hesaplandı.
- Son olarak; her bir genin ne kadar eksprese olduğu hesaplamak için, son değerlerin başlangıca olan oranı alınarak (fold change) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri belirlendi.

Bu çalışma StepOnePlus cihazında 3 tekrarlı yapıldı.

Çizelge-4.6. L.A. akrep zehiri ile muamele olmuş A549 hücrelerinde gen ekspresyonlarının kontrol grubu olan ACTB (β -aktin) geni ile karşılaştırılması.

1. Çalışma	CASP3	ATG5	BAX	BCL-2
Akrep Zehiri	0,904189001	0,762879758	3,407404	1,298967
ACTB geni	1	1	1	1
2.Çalışma	CASP3	ATG5	BAX	BCL2
Akrep Zehiri	0,93002038	0,785238686	3,498046	1,310604224
ACTB geni	1	1	1	1
3. Çalışma	CASP3	ATG5	BAX	BCL2
Akrep Zehiri	0,91821112	0,76157174	3,485987	1,327051267
ACTB geni	1	1	1	1





Şekil-4.5. L.A. akrep zehirinin apoptoz ve otofaji mekanizmalarında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Kanser, tüm gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önde gelen ölüm nedenidir. Cerrahi yaklaşımlar, radyoterapi, kemoterapi, hormon replasman tedavisi ve immünoterapi gibi kanser tedavisinde kullanılan çeşitli tedavi yöntemleri vardır (Baskar R ve ark. 2012). Bu tedavi türleri normal hücreler üzerinde nörotoksisite, hepatotoksisite ve nefrotoksisite gibi çeşitli toksik yan etkilere etkilere neden olabilir (Cagin YF. Ve ark. 2015). Kanser tedavisinde rastlanan dezavantajları azaltmak amacıyla, araştırmacılar şimdi alternatif tedavi stratejilerine yönelmekteler (Baykara O, 2015).

Antik çağlardan beri, bitki ve hayvanlardan elde edilen doğal ürünler dünyadaki hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Gordaliza M. 2007). Akrep zehirleri olumsuz etkileri ile bilinir ve insan için ciddi sağlık sorunlarına neden olur. Zehirler; nörotoksisite, nefrotoksisite, sitotoksisite, solunum durması, dermatit, alerjik reaksiyonlar, kanama ve yaygın intravasküler pıhtılaşmaya neden olabilecek çeşitli toksinler taşır (Veiga A. ve ark. 2009). Bununla birlikte, olumsuz etkilerine rağmen, bu zehirler farmakolojik olarak aktif bileşiklerin zengin bir kaynağıdır. Yılan, arı, akrep, eşekarası, karınca gibi bazı zehirli eklembacaklılar, örümcekler ve tırtıllar; antikanser aktivitesine de sahip farmakolojik olarak aktif moleküller üretir (Heinen TE ve Veiga ABG, 2011). Akrep zehiri, mukopolisakaritler, serbest amino asitler, fosfolipazlar, hiyalüronidazlar, aminler ve nükleotitler gibi çeşitli biyoaktif bileşikler içerir (Ortiz E ve ark. 2015). Peptid bileşene sahip akrep zehirlerinin, sitotoksik yönden doğrudan ve dolaylı fonksiyonları, geniş ölçüde sekonder haberciler yardımıyla, hücre zarlarının iyon kanallarını ve hücre metabolik yolların aktivasyonunu içerir (Moradi M. ve ark. 2018).

Kansere karşı etki edebilecek biyolojik olarak aktif moleküllerin varlığını göz önüne alarak, akrep zehirinin akciğer kanser hücre hattındaki antikanser aktivitesini test etmek amacıyla bu çalışma yapıldı. Bu çalışmada, *Leiurus abdullahbayrami*'den elde edilen akrep zehirinin antikanser özellikleri araştırıldı. *Leiurus abdullahbayrami* türü akrep zehirinin A549 hücre hatlarında sitotoksik etkisine bakıldı. Elde edilen verilere göre MTT sonucunu değerlendirdiğimizde hücrelerin %50'sini öldüren doz belirlendi. IC₅₀ değeri ikili regresyon eğrisi ile tespit edildi (Şekil-4.2). Regresyon eğrisinde $r^2=0.989$ olmakla birlikte; hücre canlılığındaki değişimin, kullanılan akrep zehri doz miktarı ile % 98,9 alakalı olduğunu göstermektedir. Bu hesaplama göre IC₅₀ değeri 36 µl/ml olarak tespit edildi. IC₅₀ dozu A549 hücre hattına uygulanarak 24 saatlik inkübasyon sonrası, hücre

ölüm tipini tayin etmek amacıyla RT-PCR deneyi yapıldı. Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve Atg5 genlerinin ekspresyonlarını belirleyerek hücrenin hangi yolla öldüğü saptandı.

Hücre canlılığı spektrofotometrik analiz ile optik dansite sonuçlarına göre değerlendirildi (Çizelge-4.1). Deneyler 3 tekrarlı yapıldı ve ortalama değer hesaplanarak hücre canlılığına karşılık gelen optik dansite değerleri Çizelge-4.2’de gösterildi. Şekil-4.1’de ve Çizelge-4.4’de MTT absorbans değerinin pozitif kontrol, negatif kontrol ve A549 hücre hatlarına uygulanan farklı dozlardaki akrep zehiri ile karşılaştırılması gösterildi. Şekil-4.1’de ve Çizelge-4.4’de görüldüğü üzere kullanılan akrep zehiri doz miktarı arttıkça hücre ölümünün arttığı saptandı. Çizelge-4.3’te ise negatif kontrol ve pozitif kontrol gruplarının ortalaması hesaplanarak %50 optik dansite değeri gösterildi.

MTT testi ile belirlenen sitotoksosite sonuçlarımıza göre; 24 saatlik süre sonunda A549 hücrelerinde 1/5000, 1/10000 ve 1/100000 $\mu\text{l/ml}$ oranında akrep zehiri dozunun hücre canlılığını sırasıyla %27.5, %15.51 ve % 3.9 ölüm oranı ile hücre canlılığını anlamlı şekilde baskıladığı gözlemlendi (Şekil-4.3). Kruskal Wallis H analizine göre gruplar arası farkın ($p=0,027<0,05$) anlamlı olduğu tespit edildi. Negatif kontrol grubundaki hücreler sadece besiyerine eklenirken, pozitif kontrol grubundaki hücrelerin tam ölümü için ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2) uygulandı.

Çizelge 4.5.’de 1/100000 $\mu\text{l/ml}$, 1/10000 $\mu\text{l/ml}$ ve 1/5000 $\mu\text{l/ml}$ konsantrasyonlarında 'optik dansite' nin ortalama standart sapma değerlerine göre; akrep zehiri doz miktarı arttıkça standart sapma değerinin azaldığı, veri grubundaki değerlerin birbirine yaklaştığı, ortalamadan sapmanın azaldığı ve güvenilirliğin arttığı tespit edilmiştir.

Bax/Bcl-2 oranının değeri nekrotik ya da apoptotik hücre ölümü olduğunu düşündürür (Gracia ve ark. 2013). Hücreye ölüm sinyali geldiği durumlarda Bax sentezi artar ve Bcl-2’nin etkisini nötralize ederek apoptozisi arttırır. Bu çalışmada Bcl-2 ekspresyonu house-keeping geni referansına bağlı olarak Bax ekspresyonuna oranla düşük değerde olması hücrelerde apoptotik ölüm olduğunun göstergesidir. L. A. Akrep zehiri ile indüklenen apoptozdaki artış, Bcl-2’nin düşük regülasyonu ve Bax’ın aktivasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sasi ve arkadaşları, Bcl-2 aşırı ekspresyonunun, B hücreli lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi ilaca dirençli veya apoptotik direnci yüksek kanserlerden sorumlu olduğunu belirtmiştir (Sasi ve ark, 2009). Bcl-2’nin zayıflaması, alternatif hücre ölümü ve ilaç etkinliği modlarını güçlendirmek için bazı klinik ortamlarda

olumlu olabilir. Farklı raporlar, Bcl-2'nin sadece apoptozun değil, aynı zamanda programlanmış nekrozun aracı olduğunu göstermiştir (Poliseno ve diğerleri, 2004; Sasi ve diğerleri, 2009).

Yaptığımız RT-PCR deneyi sonuçlarına göre, şekil-4.5'te ve çizelge-4.6'da gösterildiği gibi, Agt5 geni β -aktin genine kıyasla düşüş göstermiştir. Atg5 geninin aşağı ekspresyonu otofajik hücre ölümü olmadığını gösterir. Buna karşın Bax geninin Bcl-2 ile oranına bakarak hücrenin apoptotik ölümün intrinsik yolağının indüklendiği düşünülmektedir. Kaspaz-3'ün β -aktin genine kıyasla aşağı ekspresyon göstermesi hücrenin apoptoza uğramasını etkilemediğini düşündürülebilir.

L. abdullahbayrami ham zehiri, MCF-7 hücreleri üzerinde proliferatif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Erdeş ve ark, 2014). Bu durum, araknid zehirlerinde yüksek konsantrasyonda poliaminlerin yanı sıra potasyum ve kalsiyum iyonları ile açıklanabilir (Erdeş ve ark, 2014).

Akrepler, yeni antibiyotiklerden potansiyel antikanser terapötiklerine kadar, biyolojik olarak aktif moleküllerin değerli bir kaynağıdır. Zehir bileşenlerinin karakterizasyonu için yeni metodolojilerin ortaya çıkmasıyla, toksinlerle birlikte, akrep zehirlerinde başka pek çok peptidin de bulunduğu ortaya çıktı. Bu peptitlerin birçoğu biyolojik olarak aktiftir ve birçok önemli hastalığın (romatoid artrit, osteoartrit, otoimmün hastalıklar, diyabet, kronik ağrılar gibi) tedavisi için ilaçların geliştirilmesinde değerli araçlar olduğu kanıtlanmıştır (Ortiz E ve ark. 2015, www.drugtargetreview.com).

Das Grupta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, akrep zehirinden izole edilen bengalin (72 kDa) adındaki proteinin neden olduğu hücre ölümünün, otofajik olabilecek apoptozis dışındaki alternatif bir yolla meydana gelebileceğini göstermiştir (Das Gupta ve ark, 2013). Klorotoksin 36 amino asit içeren küçük bir protein olup, normal hücrelerde paralizye yol açar (Dardevet ve ark, 2015), ayrıca bu toksin metastaz istilasını durdurur ve kanser hücrelerinin hareketliliğini kontrol eder (Chen ve ark, 2012). İn vitro koşullar altında, bu peptit, MMP-2'nin (matris metaloproteinaz 2) jelatinaz aktivitesini inhibe ederek glioma istilasındaki bozulmayı göstermiştir (Gomes ve ark, 2010).

Moradi ve arkadaşları 2018 yılında yapmış oldukları sistematik derlemede 1 Ocak 1968 - 1 Ocak 2018 tarihleri arasında yayınlanan, akrep zehirinin kanser tedavisinde in vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda 1.209 çalışma arasından 53 çalışma tespit etmişlerdir.

Bu derlemeye göre, şimdiye kadar, 38 değişik kanser hücre hattının büyümesini engelleyen akrep zehiri ve zehir bileşenlerinin keşfedildiği bulunmuştur (Moradi ve ark, 2018).

Toksinlerin tümörlü bölgelere kontrollü olarak verilmesi için polimerik nano yapılarda akrep zehirini kendi kendine monte etme çabaları göstermiştir. Bu amaçla, akrep zehirinden polipeptit ekstresi (PESV), Rapamisine birleştirilmiştir (Misra SK ve ark, 2014). PESV, hücre döngüsünü başarıyla bloke ettiği ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre çizgisi A549'un hücre proliferasyonunu esas olarak HIF-1 alfa, VEGF (vascular endothelial growth factor- vasküler endotel büyüme faktörü) ekspresyonunu azaltarak ve PTEN (Protein tirozin fosfotaz ve tensin homoloğu) ekspresyonunu artırarak doğrudan anjiyogenezi inhibe ettiği saptanmıştır (Sui WW ve ark, 2014). Seçici olarak kanser dokusunu hedefleme umut verici bir stratejidir. Benzer şekilde toksinlerin platin türevlerine (Cisplatin) konjugasyonu, kanser hücrelerinde sitotoksisiteyi arttırdığı belirtilmiştir (Ning YN ve ark, 2012).

Küba'da rastlanan endemik akrep türü olan *Rhopalurus junceus*, geleneksel tıpta kanser tedavisi için kullanılmıştır. Küba'nın devlete ait ilaç şirketi Labiofam, güvenlik testleri gerçekleştirdi ve zehirin insanlara zararsız olduğunu buldu. Araştırmalarda kullanılan hücre hatları, epitelial hücre hatları (Hela, SiHa, Hep-2, NCI-H292, A549, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HT-29) ve hematopoietik kanserlerden (U937, K562) hücre hatlarıdır (Gracia ve ark. 2013). Hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda akrep zehiri (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 ve 1 mg/ml) ile muamele edilmiştir. MTT analizinin sonuçlarına göre, yalnızca epitelial kanser hücreleri, uygulanan akrep zehiri konsantrasyona bağlı olarak 0.6-1 mg/ml arasında değişen miktarlarda IC₅₀ ile önemli hücre canlılığı azalması gösterdi. Normal veya hematopoietik tümör hücreleri üzerinde etkisi olmadığı kaydedilmiştir. Akrep zehirinin, kromatin yoğunlaşması, p53 ve Bax mRNA'nın ekspresyonu, Bcl-2 mRNA'nın aşağı ekspresyonu ve kaspaz 3, 8, 9'un aşırı ekspresyonu üzerinde kanıtlandığı gibi daha az hassas tümör hücrelerinde (Hela) apoptozisini indüklediği gösterilmiştir. A549 hücreleri, akrep zehiri ile muamele olduğunda, etidyum bromür floresan boyaları ve apoptozla ilişkili genlerin azalmış ekspresyonu ile nekrozu indüklediği kanıtlanmıştır (Gracia ve ark. 2013). *Rhopalurus junceus* zehiri hakkında kapsamlı araştırmalar; analjezik, antienflamatuar ve antitümör ajan olabileceği sonucuna varmıştır (Podnar 2015). Bu araştırmayı desteklemek için, Vidatox 30CH adlı bir ilaç,

Labiofam tarafından kanser hücrelerinin yayılmasının azaldığını bildiren, kanser hastaları arasındaki yaşam beklentisini artıran ve hastalar üzerinde ihmal edilebilecek yan etkileri olduğunu bildiren bir formül edinmiştir (Podnar 2015).

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, zehirli peptidlerin toksisitesini gidermek için çaba gösterilmeli ve hedeflenen ilaç toksinle konjuge olmalıdır. Ayrıca, zehir peptitlerin antikanser özelliği, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi geliştirerek arttırılabilir. Zehirli toksin peptitlerinin ultra-küçük lipid nano parçacıkta kapsüllenmesiyle ürünler elde edilebilir (Moradi M. ve ark. 2018).



6. SONUÇ

Leiurus abdullahbayarami akrep zehirinin A549 akciğer kanser hücre hatlarında hücre canlılığı ve apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanan çalışmamızda; 1/100000, 1/10000 ve 1/5000 µl/ml oranlarında dilüe edilmiş zehir kullanıldı. Hücre canlılığı deneyinden elde edilen sonuçlara göre RT-PCR ile hücrede Kaspaz-3, Bcl-2, Bax ve Atg5 genlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi.

Leiurus abdullahbayarami akrep zehirinin apoptozu uyardığı en etkili doz 36 µl/ml, en etkili süre ise 24 saat olarak saptandı.

A549 hücrelerinde akrep zehirinin 36 µl/ml konsantrasyonunda ve 24 saat muamelesi ile Bax ekspresyonunun arttığı saptandı.

A549 hücrelerinde akrep zehirinin 36 µl/ml konsantrasyonunda ve 24 saat muamelesi ile Bcl-2 ekspresyonunun yükseldiği fakat apoptozu durduramadığı saptandı.

A549 hücrelerinde akrep zehirinin 36 µl/ml konsantrasyonunda ve 24 saat muamelesi ile Kaspaz-3'ün aşağı ekspresyonu saptandı.

A549 hücrelerinde akrep zehirinin 36 µl/ml konsantrasyonunda ve 24 saat muamelesi ile Atg5 ekspresyonunun azaldığı saptandı.

A549 hücrelerinde akrep zehirinin apoptozu intrinsik yolak aracılığıyla uyardığı belirlendi. Akrep zehiri ile muamele olmuş A549 hücrelerinde, Bax geninin ekspresyonunun artışı ve Bcl-2 geninin Bax genine kıyasla daha düşük seviyedeki artışı hücrelerin intrinsik yoldan apoptozu ugradığını düşündürdü.

Bu çalışmada bütçenin yetersiz olması ve zaman yönünden kısıtlı olması, çalışmayı yaparken karşımıza çıkan dezavantajlardır. Elimizde farklı iki türe ait akrep zehiri mevcut olsaydı aynı kanser hattına farklı iki akrep zehiri aynı dozda ve aynı şartlarda uygulanarak apoptoz yönünden farklılıklarına bakılabilirdi. Ayrıca çalışmamız bütçe yönünden desteklendiği takdirde yapılacak çalışmalarda kanserde önemli rol alan p53 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirilebilir. Apoptozda rol alan Kaspaz-8, Kaspaz-9 gen ekspresyonlarına bakılarak akrep zehirinin etkisi detaylandırılır. Gelecekte *L.*

abdullahbayrami zehirinin protein analizi yapılarak hangi proteinin apoptoz üzerine daha çok etkisi tespit edilir ve buna göre izole proteinden ürün eldesi edilebilir.

Öneriler; *L. abdullahbayrami* zehirinin in-vitro ortamda farklı kanser hücre hatlarında apoptozu indükleyen gen ekspresyonları yönünden incelenmesi, deneylerin in-vivo deneysel ortamlarda genişletilmesi terapötik etkisi yönünden daha iyi anlaşılabilmesi için yararlı olacaktır. Akrep zehirindeki peptidlerin kapsamlı karakterizasyonu, biyolojik potansiyeli tanımlamak için gereklidir. Zehirli peptidin etkili bir şekilde verilmesi için stratejilerin geliştirilmesi, antikanser terapötik etkileri hızlandırabilir.



KAYNAKLAR

1. **Abotaleb M, Samuel SM, Varghese E, Varghese S, Kubatka P, Liskova A, Büsselberg D.** Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers (Basel)* **2019** Jan; 11(1): 28.
2. **Adams JM, Cory S.** Life or death decions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci* **2001**;26:61-6.
3. **Anding, Al., Baehrecke, E. H. (2015)** Autophagy İn Cell Life And Cell Death. *Apoptosis And Development*. Volume 114, Pages 67–91.
4. **Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, Han DK.** Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* **2003**;4:587–98.
5. **Ashkenazi A and Salvesen G.**Regulated Cell Death: SignalingandMechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**. 30:337–56
6. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Deathreceptors: signaling and modulation. *Science* **1998**;281:1305–8.
7. **Augustine D, Rao RS, Anbu J, Chidambara Murthy KN.** *In vitro* cytotoxic and apoptotic induction effect of earthworm coelomic fluid of *Eudrilus eugeniae*, *Eisenia foetida*, and *Perionyx excavatus* on human oral squamous cell carcinoma-9 cell line. *Toxicol Rep.* **2019** Apr 19;6:347-357.
8. **Ayhan H., Atay E., Çarhan A., Yağmur E.A., Özkan Ö. ve Çelebi B. (2018).** Phylogenetic relationships among the *Leiurus abdullahbayrami* (Scorpiones: Buthidae) populations in Turkey inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Biharean Biologist* 12(2): 65-69.
9. **Ayhan, H. (2015):** Türkiye’de bulunan *Leiurus abdullahbayrami* Yağmur, Koç & Kunt **2009** (Scorpiones: Buthidae) Popülasyonlarının Genotiplendirilmesi Ve Varyasyonlarının Belirlenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Hatay, 156 s.
10. **Baines CP.** Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol* **2010**; 1: 156.
11. **Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW.** Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int JMed Sci.* **2012**;9: 193-199.
12. **Baykara O.** Horizons in Cancer Research vol.57. Current Therapies and Latest Developments in Cancer Treatment, s.105-156, **2015**. Editor: Watanabe, Hiroto S. Nova Science Publishers, New York, ABD. ISBN: 978-1-63482-498-9
13. **Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ andWyllie AH.** Cell death in healthanddisease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminar in Cancer Biol.* 6: 3-16, **1995**.
14. **Cagin YF, Erdogan MA, Sahin N, et al.** Protective effects of apocynin on cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Arch Med Res.* 2015;46:517-526.
15. **Chen Y, Cao L, Zhong M, Zhang Y, Han C, Li Q, Yang J, Zhou D, Shi W, He B, Liu F, Yu J, Sun Y, Cao Y, Li Y, Li W, Guo D, Cao Z, Yan H (2012)** Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. *PLoS ONE* 7(4):e34947
16. **Cohen GM.** Caspases: theexecutioners of apoptosis. *Biochem J* **1997**;326(Pt 1):1–16.
17. **Corn PG., El-Deiry WS. (2002).** Derangement of growth and differentiation control in onkogenesis. *Bioessays* 1: 83-90.
18. **Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL.** TWEAK, a newsecretedligand in the tumornecrosisfactorfamilythatweaklyinducesapoptosis. *J BiolChem* **1997**;272:32401–10.
19. **Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: criticalcontrolpoints. *Cell* **2004**; 116: 205-19.
20. **Dardevet L, Rani D, Abd El Aziz T, Bazin I, Sabatier JM, Fadl M, Brambilla E, De Waard M (2015)** Chlorotoxin: a helpful natural scorpion peptide to diagnose glioma and fight tumor invasion. *Toxins (Basel)* 7(4):1079–1101
21. **DeVita, Hellman, and Rosenberg's.** *Cancer: Principles&Practice of Oncology (Cancer: Principles&Practice, 2015*
22. **Dokur M, Dogan M, Yagmur EA.** Scorpion-related cardiomyopathy and acute pulmonary edema in a child who is stung by *Leiurus abdullahbayrami*. *Turk J Emerg Med.* **2017** Mar 18;17(3):104-108.
23. **Ellis, RE, Yuan, J andHorvitz, HR.** Mechanismsandfunctions of celldeath. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663-698, 1991
24. **Erdeş, E., Doğan, T.S., Coşar, İ., Danışman, T., Kunt, K.B., Şeker, T., Yücel, M., Özen, C.** Characterization of *Leiurus abdullahbayrami* (Scorpiones: Buthidae) venom: peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* **2014**, 20(1):48.

25. **Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983)** Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin egg that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33,
26. **Freshney I.** *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5. Baskı. New Jersey, John Wiley and Sons, **2005**.
27. **Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.** GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; **2013**. Erişim Adresi: <http://globocan.iarc.fr>.
28. **Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C ve ark.** The Global Burden of Cancer **2013**. *JAMA Oncol.* 2015;1(4):505-27.
29. **Fu, Y.J., Chai, B.F., Wang, W., Zhi, H., Yin, L.T., Liang, A.H., 2004.** Expression and purification of the BmK Mm2 neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch and its biological activity test. *Protein Expr. Purif.* 38, 45–50.
30. **Giacinti C, Giordano A.** RB and cell cycle progression. *Oncogene* **2006**; 25: 5220-7.
31. **Giard, D. J. et al.** In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417–1423 (**1973**)
32. **Ghosh, A., et al., 2019.** Scorpion venom-toxins that aid in drug development: a review. *International journal of peptide research and therapeutics*, 25 (1), 27–37.
33. **Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod,** Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, **2010**. 221(1): p. 3-12.
34. **Globocan 2018,** Turkey. International Agency for Research on Cancer. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>
35. **Gomes A, Bhattacharya P, Mishra R, Biswas AK, Dasgupta SC, Giri B (2010)** Anticancer potential of animal venom and toxins. *Indian J Exp Biol* 48(2):93–103
36. **Gordaliza M.** Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol.* **2007**;9:767-776.
37. **Garcia DA, Diaz LM, Herrera YF, Sanchez HR, Lorenzo YC, Llanes DM, Garlobo YR ve Castro.**
In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *J Venom Res*, **2013**, Vol 4, 5-12
38. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**;4:144(5):646-74.
39. **Heinen TE, da Veiga ABG.** Arthropod venoms and cancer. *Toxicon.* **2011**;57:497-511.
40. **Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NFκB activation. *Cell* **1995**;81:495–504.
41. **Ho A. Dowdy SF. (2002)** Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development* 1: 47-52
42. **Hung JY, Hsu YL, Li CT, et al.** 6-Shogaol, an active constituent of the tary ginger, induces autophagy by inhibiting the AKT/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Journal of Agricultural And Food Chemistry* **2009**;57(20): 9809-9816.
43. **Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB.** The genetic basis of disease. *Essays Biochem.* **2018** Dec 2;62(5):643-723.
44. **Kastin AJ (2006)** Handbook of biologically active peptides, Chapter 51, 1st edn. Academic Press, Boston, p 339
45. **Kelle, İ.** ‘Terapötik Potansiyeli Sahip Venom Peptidleri’ *Dicle Tıp Dergisi*, **2006** Cilt:33, Sayı:2, (113-126) Dicle
46. **Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME.** Cytotoxicity dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **1995**;14:5579–88.
47. **Kopnin BP. (2000).** Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 1: 2-27.
48. **Kopman G, Reutelingsperger C P, Kuijten G A, Keehnen R M, Pals S T, van Oers N H (1994):** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.*, 84: 1415–1420.
49. **Krifi MN, Marrakchi N, El Ayebe M, Dellagi K.** Effect of some variables on the *in vivo* determination of scorpion and viper venom toxicities. *Biologicals.* **1998**;26(4):277-88.
50. **Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* **2007**;87:99-163.
51. **Letai, A.** Apoptosis and Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2017**. 1:15.1–15.20

52. **Hyun SY, Jang YJ.** p53 activates G₁ checkpoint following DNA damage by doxorubicin during transient mitotic arrest. *Oncotarget*. **2015** Mar 10; 6(7): 4804–4815.
53. **Lewis, R.J., Garcia, M.L.** “Therapeutic potential of venom peptides.” *Natural Review of Drug Discovery*, vol. 2, no. 10, pp. 790–802, **2003**.
54. **Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploeg H, Matsudaira P.** *Molecular Cell Biology*. **2003** 5th Edition s854
55. **Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploeg H, Matsudaira P.** *Molecular Cell Biology*. 6th. Edititon. *W.H.FreemanandCompany*, New York,USA.**2008**. s 1107-1108
56. **Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ.** The TNF and TNF receptorsuperfamilies: integratingmammalianbiology. *Cell* **2001**;104:487–501.
57. **Macaluso M, Montanari M, Cinti C, Giordano A.** Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin Oncol*. **2005** Oct;32(5):452-7
58. **Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. (2010).** Overview Of Macroautophagy Regulation İn Mammalian Cells. *Cell Research* 20:748-762.
59. **Misra SK, Ye M, Kim S, Pan D.** Highly efficient anti-cancer therapy using scorpion 'NanoVenin'. *Chem Commun (Camb)*, **2014**; 50(87): 13220-3.
60. **Moradi M, Solgi R, Vazirianzadeh B, Hamid Tanzadehpanah H, Saidijam M.** Scorpion Venom and Its Components as New Pharmaceutical Approach to Cancer Treatment, a Systematic Rewiev. *IJPSR*, **2018**; Vol. 9(7): 2604-2615.
61. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **1983** Dec 16;65(1-2):55-63.
62. **Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N.** Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta. Molecular Cell Research*, **2013**.
63. **Ning YN, Zhang WD, Wu LC.** Study on the mechanism of polypeptide extract from scorpion venom to promote the restraint of cyclophosphamide on Lewis lung cancer. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, **2012**; 32(4): 537-42.
64. **Norbury CJ, Hickson ID.** Cellular responsesto DNA damage. *AnnuRevPharmacolToxicol*41:367–401, **2001**.
65. **Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M (1995)** Human cyclin E, a nuclear protein essentialforthe G1-to-S phasetransition. *Mol. Cell Biol*. 15, 2612.
66. **Onat T. Emerk K. Sözmen EY. (2006).** İnsan Biyokimyası. İkinci Baskı Ankara: Palme yayıncılık s 596.
67. **Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD.** Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*. **2015**;93:125-135.
68. **Özkan, Ö., Karaer K.Z. (2003):** Türkiye Akrepleri. *Türk Hij Den Biyol Derg.* Cilt 60, No 2, S : 55 – 62.
69. **Özcan, Ö., ve Filazi, A. (2004).** *Androctanus crassicauda* (Oliver, 1807) türü akreplerden değişik yöntemlerle elde edilen venomların farelerde akut LD50 miktarlarının belirlenmesi. *Türkiye patoloji dergisi* 28 (1): 50–53.
70. **Ozkan, O., Yagmur, E.A., Ark, M. (2011).** A newly described scorpion species, *Leiurus abduallahbayrami* (Scorpion: Buthidae), and the lethal potency and in vivo effects of its venom. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 17(4). 414-421.
71. **Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK.** Apoptosis: a basicphysiologicprocess in woundhealing.*Int J LowExtremWounds* **2005**;4:138–44.
72. **Palmer AM.** Greengrass PM. Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives*, **2000**; Vol. 13, No.6, 378-384.
73. **Pardee AB (1974)** A restrictionpointforcontrol of normal animalcellproliferation. *Proc. NatlAcad. Sci. USA* 71, 1286.
74. **Patron, M.** Dowsett, M. Smith, L. “Studies of apoptosis in breast cancer” *BMJ*.,322,1528-15325 (**2001**).
75. **Pavlopoulou A, Spandidos DA, Michalopoulos I.** Human cancerdatabases (review). *OncolRep*. **2015** Jan;33(1):3-18.
76. **Peter ME, Krammer PH.** Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* **1998**;10:545–51.
77. **Petricevich VL (2010)** Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators Inflamm* **2010**:903295
78. **Pines J (1991)** Cyclins: wheelswithinwheels. *Cell GrowthDiffer.* 2, 305

79. **Podnar O (2015)** Blue scorpion venom drug—Vidatox—a proven help against many types of carcinoma
80. **Pollard, DT, Earnshaw CW, Lippincott J.** Cell Biology, Third Edition **2017**; s 797-814
81. **Poliseno L, Bianchi L, Citti L et al. 2004.** Bcl2-low-expressing MCF7 cells undergo necrosis rather than apoptosis upon staurosporine treatment. *Biochem J*, 379, 823–332.
82. **Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B (2000)** Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 82(9–10):861–868
83. **Possani, L.D.** Rodriguez de la Vega, R.C., **2006.** Handbook of biologically active peptides. In: Kastin, A.J. (Ed.), Scorpion Venom Peptides. In: Kastin, A.J. (Ed.), The Handbook of Biologically Active Peptides. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 339–354.
84. **Qie S, Diehl JA.** Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)*. **2016** Dec;94(12):1313-1326.
85. **Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, MartinezJI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA.** Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in Bcelllymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* **2005**;106:3214–22.
86. **Redies, C.** Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Development Genes and Evolution*. (2012) Volume 222, Issue 6, pp 369–376.
87. **Ribatti D.** A revisited concept: Contactinhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Experimental cell research*. **2017**;359(1):17–9.
88. **Ruijtenberg S, van den Heuvel S.** Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle*. **2016**;15(2):196-212
89. **Sasi N, Hwang M, Jaboin J et al. 2009.** Regulated cell death pathways: New twists in modulation of BCL2 family function. *Mol Cancer Ther*, 8, 1421–1429.
90. **Scriver CR.** Beaudet AL, Sly WS., Valle D. (2001). The Metabolic&Molecular Bases of Inherited Disease. Mc Graw-Hill; 613-74.
91. **Smaili S, Hsu Y et al.** Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J. BioenerandBiomem*. **2000**; 32(1):35-46.
92. **Smith JJ, Jones A, Alewood PF (2012)** Mass landscapes of seven scorpion species: the first analyses of Australian species with 1,5-DAN matrix. *J Venom Res* 3:7–14
93. **Sui WW, Zhang WD, Wu LC, Zhang YY, Wang ZP, Wang ZX, Jia Q.** Study on the mechanism of polypeptide extract from scorpion venom on inhibition of angiogenesis of H 22 hepatoma. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, **2014**; 34(5): 581-6.
94. **Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK.** Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* **2001**;20:2122–33.
95. **Susan Elmore.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *ToxicolPathol*. 35(4):495-516, 2007
96. TÜİK. “Ölüm Nedeni İstatistikleri, **2014**”. Erişim Adresi: <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855> Erişim Tarihi: **16.01.2017**.
97. **Upadhyay RK .** Use of animal venom peptides/toxins in cancer therapeutics. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Volume 7, Issue 11, 596-652, **2018**.
98. **Utz PJ, Anderson P.** Posttranslational protein modifications, apoptosis and the bypass of tolerance to autoantigens. *Arthritis Rheum* 41:1152-1160, **1998**.
99. **Uzair B, Bint-E-Irshad S, Khan BA, Azad B, Mahmood T, Rehman MU, Braga VA.** Scorpion Venom Peptides as a Potential Source for Human Drug Candidates. *Protein Pept Lett*. **2018**;25(7):702-708.
100. **Veiga A, Berger M, Guimaraes J.** Lonomia obliqua venom: pharmaco-toxicological effects and biotechnological perspectives. In: De Lima ME, ed. *Animal Toxins: The State of the Art Perspectives on Health and Biotechnology*. 1st ed. Belo Horizonte, Brazil: Editora UFMG; **2009**:371-390.
101. **Vermeulen K, Berneman ZN, vanBockstaele DR.** Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* **2003**; 36: 165-75.
102. **Vermeulen K, VanBockstaele DR, Berneman Z N.** The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **2003**; 36: 131-49.
103. **Wajant H.** The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **2002**;296:1635–6.
104. **Weinberg RA. (1995).** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323–30.

105. **Williams GM. (2001).** Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*; 14:166 (1-2):3-10
106. **www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr.** ATCC Human Induced Pluripotent Stem Cell Culture. (in partnership with lgc standarts).
107. **www.drugtargetreview.com**
108. **Yağmur, EA., Koç, H., Kunt, KB. (2009).** Description of a newspecies of *Leiurus*Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Buthidae) fromSoutheasternTurkey. *Euscorpius*85:1-19.
109. **Yagmur EA, Koç H, Kunt KB.** Description of a new species of *Leiurus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Buthidae) from Southeastern Turkey. *Euscorpius*. **2009**;85(85):1-20.
110. **Yuan J, Yankner BA.** Apoptosis in thenervoussystem. *Nature* **2000**; 407: 802- 9.
111. **Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. 1999.** An APAF-1·cytochrome c multimericcomplex is a functionalapoptosomethatactivates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274:11549–56



ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Hatay/İskenderun'da doğdu. İlk ve orta eğitimini İskenderun'da tamamladı. Lise eğitimini Konya'da tamamladı. 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2007 yılında mezun oldu. 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.





T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü



Sayı : 21264211-288.04[Biyçeşitlilik
Araştırma İzinleri]-E.518740
Konu : Araştırma İzinleri (Hüseyin AYHAN)

13.02.2019

Sn. Dr. Öğretim Üyesi Hüseyin AYHAN
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi'nden Dr. Öğretim Üyesi Hüseyin AYHAN tarafından yürütülecek olan "Türkiye'de Bulunan Leiurus abdullahbayrami Yağmur, Koç, Kunt 2009 (Scorpiones: Buthidae) zehirleri ve Popülasyonlarının DNA Çeşitliliği" başlıklı proje kapsamında araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde temsil edici yeterlilikte miktarın aşılması ve bu örneklerin yurtdışına çıkarılmaması,
- Toplanacak birey miktarının çalışma sahasındaki popülasyona zarar vermeyecek şekilde yapılması,
- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlerin yanı sıra ekosistem bütünlüğüne de zarar vermeyecek şekilde yapılması, zarar belirtisi halinde derhal araştırmanın sonlandırılması,
- Araziden toplanan türlerin ticarete konu edilmemesi,
- Arazi çalışmalarının yapılacağı İl Şube / Milli Park Müdürlüğüne süreç ve sonuç hakkında mutlak suretle bilgi verilmesi,
- Araştırma sırasında elde edilen fotoğraf, video vb. dijital verinin kurumumuzun ayrı bir izni olmaksızın medya vb. organlarda yayımlanmaması, bilimsel maksatlar haricinde yayın yapılmaması,
- Arazi çalışmalarının 2873 sayılı Milli Parklar Kanunu kapsamında yer alan sınırlar dahilinde kalması durumunda Sahaya ait Uzun Devreli Gelişme Planı hükümlerine uygun hareket edilmesi,
- Söz konusu çalışmaların 2873 sayılı Milli Parklar Kanunu kapsamında yer alan sınırlar dahilinde kalması durumunda çalışmanın süreç ve sonucu hakkında mutlak suretle ilgili Milli Park Müdürlüğüne bilgi verilmesi,
- Arazi çalışmalarının 2873 sayılı Milli Parklar Kanunu kapsamında yer alan sınırlar dahilinde olması durumunda bu kısımlarda çalışma yapılırken Bölge Müdürlüğümüzden bir mihmandar eşliğinde araziye çıkılmasının sağlanması,
- Arazi çalışmalarının yapılacağı yerin il merkezlerinde Valiliğe, ilçelerde ise Kaymakamlığa bilgi verilmesi,

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Beştepe Mah. Alparslan Türkeş Cad. No:71 Yenimahalle/ANKARA
Telefon: (0312) 207 50 00
Kp: gthb.genelevrak@gthb.ha01.kep.tr

Bilgi için: Emrah SOLAK
Tarım ve Orman Uzmanı



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü



Sayı : 21264211-288.04[Biyçeşitlilik
Araştırma İzinleri]-E.518740
Konu : Araştırma İzinleri (Hüseyin AYHAN)

13.02.2019

- Araştırma sonuç raporunun basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze gönderilmesi,
şartıyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüştür.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

 e-imzalıdır
Hasan KANCA
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı V.

Ek : Rapor Genel Tanım Bilgileri (2 sayfa)

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Beştepe Mah. Alparslan Türkeş Cad. No:71 Yenimahalle/ANKARA
Telefon: (0312) 207 50 00
Kep: gthb.genelevak@gthb.hsgb1.kep.tr

Bilgi için: Emrah SOLAK
Tarım ve Orman Uzmanı



T.C. ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI
DOĞA KORUMA VE MİLLÎ PARKLAR GENEL MÜDÜRLÜĞÜ



ARAŞTIRMA İZİNLERİ BİLGİ SİSTEMİ

Araştırma Adı: Türkiye'de Bulunan Lelurus abdullahbayrami Yağmur, Koç, Kunt 2009 (Scorpiones: Buthidae) zehirleri ve Popülasyonlarının DNA Çeşitliliği

Araştırma Türü: Kara Avcılığı Kanunu Kapsamında Olmayan Fauna Elemanları

Araştırma İçerik Durumu: Araştırma için Araziye Çıkılacak ve Örnek Toplanacak

YERLİ ARAŞTIRMACI BİLGİLERİ

No	Adı	Soyadı	TC Kimlik No	Mecleği	Unvanı	Çalıştığı Kurum	Adres	Telefon No	E-Posta
1	HÜSEYİN	AYHAN	31699645586	Akademisyen	Dr. Öğr. Üyesi	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi GETAT Merkezli Ayvalı Mah. Takdir Cd. 150 Sk. No:5 Etilik 06010	3129062382	drhayhan@gmail.com

ARAŞTIRMACI BİLGİLERİ

No	Adı	Soyadı	TC Kimlik No	Mecleği	Unvanı	Çalıştığı Kurum	Adres	Telefon No	E-Posta
1	HÜSEYİN	AYHAN	31699645586	Akademisyen	Dr. Öğr. Üyesi	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi GETAT Merkezli Ayvalı Mah. Takdir Cd. 150 Sk. No:5 Etilik 06010	3129062382	drhayhan@gmail.com
2	NAHİDE	FİDANCIOĞLU	31693645704	Fizyoterapist	Yüksek Lisans Öğrencisi	Mustafa Kemal Üniversitesi	Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Sökmen Kampüsü Enstitü Binası Giriş Kat Serinyol /HATAY	5377957411	nayhan83@gmail.com

YABANCI ARAŞTIRMACI BİLGİLERİ

No	Adı	Soyadı	Pasaport No	Ülke Adı	Mecleği	Unvanı	Çalıştığı Kurum	Adres	Telefon No	E-Posta	Faks No	Diğer Kurum Bilgileri
----	-----	--------	-------------	----------	---------	--------	-----------------	-------	------------	---------	---------	-----------------------

ARAŞTIRMA TANIM BİLGİLERİ

No	Başvuran TC Kimlik No	Araştırma Kadrosunda Yabancı Araştırmacı Varolma Durumu	Yürütücü Kurum Adı	Destekleyen Kurum Adı	Araştırma Projesinin Süresi	Başvuru Tarihi	Araştırma Başlangıç Tarihi	Araştırma Bitiş Tarihi	Tahmini Evrak Gönderme Tarihi
	131699645586	Hayır	Hüseyin Ayhan	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	12 Ay	1/31/2019	1/31/2019	12/31/2019	2/21/2019

ARAŞTIRMA DİĞER BİLGİLERİ

No	Araştırma Amacı	Araştırma Yöntemi	Toplanacak Materyallerin Yurtdışına Çıkarılma Durumu	Gözlem Bilgileri	Teknoloji Transferi Varolma Durumu	Deneyisel Çalışma Yapılıp Yapılmayacağı Durumu	Korunan Alan Adı	Tahmini Evrak Verme Tarihi
1	Ülkemize endemik akrep türü olan Lelurus abduhbayrami türünün zehirlerinin kanser hücre hatlarında etkisinin incelenmesi ve moleküler filogenetik çalışmanın yapılması	Gece ışık olmayan ortamda UV lamba ile akrepler toplanacaktır. Daha sonra canlı olarak laboratuvara getirilerek zehirleri elektrostimülasyon yöntemi ile sağlanacaktır. Daha sonra moleküler filogenetik analizleri yapılacaktır.	Yurtdışına çıkarılmayacak	Akrepler doğada fotoğraflandırılabilmektedir.	Hayır	Hayır	NEMRUT DAĞI,	2/21/2019

ARAŞTIRMA YAPILACAK ALAN BİLGİLERİ

No	Çalışma Alanı Adı	İl Adı	İlçe Adı	Mevkii Adı
1	G.Antep	GAZİANTEP	ŞAHİNBEY	37°05'46.5"N 37°16'51.3"E
2	Hatay	HATAY	REYHANLI	36°15'42"N, 36°36'22"E
3	Kilis	KİLİS	MERKEZ	36°44'02"N, 37°15'19"E
4	Ş.Urfa	ŞANLIURFA	HARRAN	36°52'36"N, 39°22'18"E
5	Adıyaman	ADİYAMAN	KAHTA	37°56'49"N, 38°44'47"E
6	Mardin	MARDİN	MERKEZ	37°18'23"N, 40°46'28"E

DOĞADAN TOPLANACAK TÜR BİLGİLERİ

No	Türkçe Adı	Latince Adı	Birey Sayısı/Miktarı	Örnek
1	Lelurus abduhbayrami	Lelurus abduhbayrami	10	10

DOĞADAN ALINACAK NUMUNE BİLGİLERİ

No	Numune Adı	Sayısı/Miktarı
1	Lelurus abduhbayrami	10

AYRINTILI ÇALIŞMA PROGRAMI BİLGİLERİ

No	Çalışma Alanı	Kalınacak Gün Sayısı	Çalışma Yılı	Çalışma Ayları	Çalışma Haftası
1	Hatay, Kilis, G.Antep, Ş.Urfa, Adıyaman, Mardin	7	2019	Nisan, Mayıs, Haziran	1 Hafta