



Mesobuthus Gibbosus (Scorpiones: Buthidae) Akrep Ham Zehrinin Kansere Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik ve Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması

Investigation of Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Mesobuthus gibbosus (Scorpiones: Buthidae) Crude Scorpion Venom on Cancer Cell Lines

Nazife YİĞİT KAYHAN^{1*}, İlky ÇORAK ÖCAL², Onur BÜYÜKKARTAL³

¹ Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale, Türkiye

² Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çankırı, Türkiye

³ Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

Geliş Tarihi (Received): 28.03.2022

Kabul Tarihi (Accepted): 13.09.2022

Yayın Tarihi (Published): 28.04.2023

Öz

Amaç: Akrep zehirleri, çeşitli kimyasal maddelerin oluşturduğu oldukça kompleks heterojen karışımlardır. Bu çalışmada, Mesobuthus gibbosus (Brullé, 1832) (Scorpiones: Buthidae) akrebinin ham zehrinin kanser hücreleri üzerine sitotoksik ve antiproliferatif etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler: M. gibbosus'dan sağılan ham zehrin sitotoksik etkileri MCF-7 meme kanseri ve A549 akciğer karsinomu ve normal fare fibroblast (L929) hücreleri üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkileri çalışılmış ve elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Sitotoksitesiyi belirlemek için MTT testi, apoptoz ve nekroz indeksini belirlemek için ikili boyama metodu ve xCELLigence gerçek zamanlı analiz sistemi ile hücre proliferasyonunun analizi in vitro koşullarda yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmada, akrep ham zehrinin MCF-7 ve A549 kanserli hücrelerin üzerine sitotoksik etki sonuçları ayrı ayrı L929 fibroblast hücre sonuçları ile Mann Whitney U testi kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Bunun sonucunda L929 hücrelerinin % canlılık değeri A-549'un değerine çok yakın iken MCF-7 hücrelerinin % canlılık değeri L929'un değerine göre daha yüksek olmasına rağmen araştırmadaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu hücrelerin proliferasyon grafikleri incelendiğinde ise en yüksek dozda zehrin MCF-7 ve L929 hücrelerinin proliferasyonunun bir miktar azalttığı ancak A549 hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediği gözlemlenmiştir.

Sonuç: M. gibbosus akrep ham zehrinin MCF-7 ve A549 kanserli hücreleri üzerine apoptotik ve antiproliferatif etkileri bir miktar gözlemlenmiştir. Ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Anahtar Kelimeler: Akrep Zehri, Mesobuthus gibbosus, Kansere, Hücre Proliferasyonu, Sitotoksitesiyi

&

Abstract

Objective: Scorpion venoms are a highly complex mixture of various chemicals with surprising biological effects. In this study, the cytotoxic and anti-proliferative effects of Mesobuthus gibbosus (Brullé, 1832) (Scorpiones: Buthidae) scorpion crude venom on cancer cell lines were investigated.

Materials and Methods: The cytotoxic and anti-proliferative effects of crude venom milked from M. gibbosus on MCF-7 breast cancer and A549 lung carcinoma, and normal mouse fibroblast (L929) cells were studied and the obtained data were evaluated. The MTT test to determine cytotoxicity, the double staining method to determine the apoptosis and necrosis index, and the analysis of cell proliferation with the xCELLigence real-time analysis system were performed in vitro.

Results: In the study, the results of cytotoxic effects of scorpion crude venom on between MCF-7 and A549 cancer cells and L929 fibroblast cell were analyzed statistically by using Mann Whitely U test separately. As a result, although the % viability value of L929 cells was very close to the value of A-549, the % viability value of MCF-7 cells was higher than the value of L929, but the difference in the study was not statistically significant. When the proliferation graphs of these cells were examined, it was observed that the highest dose of venom slightly reduced the proliferation of MCF-7 and L929 cells, but did not affect the proliferation of A549 cells.

Conclusion: The apoptotic and antiproliferative effects of M. gibbosus scorpion crude venom on MCF-7 and A549 cancer cells were observed to some extent. However, these results are not statistically significant.

Keywords: Scorpion Venom, Mesobuthus gibbosus, Cancer, Cell Proliferation, Cytotoxic

Atıf/Cite as: Yiğit Kayhan, N., Çorak Öcal, İ. & Büyükkartal, O. (2023). Mesobuthus gibbosus (Scorpiones: Buthidae) Akrep Ham Zehrinin Kansere Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik ve Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması. Abant Tıp Dergisi, 12 (1) , 19-31 . DOI: 10.47493/abantmedj.1094466

Copyright © Published by Bolu Abant İzzet Baysal University, Since 2023 – Bolu

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author): Prof. Dr. Nazife Yiğit Kayhan, e-mail: naz_yigit2@hotmail.com

Giriş

Tüm dünya genelinde bakıldığında 21. yüzyılın en temel sağlık problemleri arasında kanser üst sıralarda yer almaktadır (1). Şu anda dünya çapında ölüm sebepleri arasında kardiyovasküler hastalıklar ilk sıradadır. Dünya Sağlık Örgütüne bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumunun yayınladığı veriler incelendiğinde önümüzdeki on yıl içinde kanserin ölüm sebeplerinde birinci sıraya yerleşeceği ön görülmektedir (2,3).

Kanser, bireyin kendi vücut hücrelerinin kontrolsüz ve zamansız olarak aşırı çoğalmalarına, bu anormal hücrelerin bağışıklık sisteminin gözetiminden kaçmalarına, bunların sonucu olarak da başlangıcından daha uzakta bulunan dokuları dahi istila ederek yayılmalarına yol açan çok kademeli ve karmaşık değişiklikler bütünüdür. Oluşan bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar (4).

Kanser, tüm dünyada önemini korurken kanser ile mücadele etmek ve kanser hastalarını da tedavi etmek için yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin arayışı devam etmektedir. Günümüzde kanser hastalarını tedavisinde klasik kemoterapi ilaçları kullanılmaktadır. Bu kemoterapötiklerin çoğunun hedefi kanserli hücrelerde DNA sentezini dolayısıyla replikasyonunu engelleyerek hücrelerin çoğalmasını durmaya yöneliktir. Tedavi protokollerinde kemoterapötiklerle birlikte radyoterapi ve cerrahi yöntemler de kullanılabilir. Mevcut tüm bu yöntemler tek tek ya da kombinasyonlar şeklinde dahi uygulansa bile kanserli hücreler üzerinde spesifik etkili gösterdiğini söylemek çok zordur. Çünkü klasik tedavi yöntemleri kanserli hücrelerinin yanında sağlıklı hücreleri de etkileyebilmektedir. Bunun yanında kemoterapötiklerin çok ciddi yan etkileri de bulunmaktadır. Tüm bu olumsuzlukları giderebilmek için araştırmacılar kanser tedavisinde yeni ve çok daha spesifik etkili alternatif yöntemler ve kemoterapötikler arayışı içindedir (4). Son yıllarda bu amaçla araştırmalar, kimyasal olmayan yani canlılardan elde edilen biyolojik ajanlara yönelmiştir. Bunun içinde en çok araştırılan kaynaklar çok farklı biyotoksinleri içeren hayvan zehirleri olmuştur. Yılan, akrep ve örümcek zehirlerinden, elde edilecek biyotoksinlerin kanser teşhis ve tedavisinde kullanılmasına yönelik araştırmalar yapılmaktadır.

Fosil kayıtlarına göre akreplerin dünya üzerindeki varlığı 430 milyon yıl öncesine dayanmaktadır. Akreplerin geçmişten günümüze kadar vücutları çok az değişikliğe uğramıştır. Bu nedenle akrepler yaşayan fosiller olarak tanımlanmaktadır. Bunu da akrepler sıra dışı özelliklere sahip olmalarına borçludurlar. Dış iskeletlerinin kütikülasında yüksek oranda metal bulunması, iyonize radyasyona karşı dirençli olmaları, çeşitli biyoaktif maddelere sahip zehirlerinin olması akreplerin evrimsel başarısını göstermektedir (5). Günümüze kadar dünya yüzeyinde 2.659 akrep türü tespit edilmiştir (6). Akreplerin zehir bezleri telson olarak adlandırılan metosomanın son segmentinde iğnenin hemen önünde yerleşmiştir. Akrep zehirleri, yüksek seviyeden biyoaktif özelliklere sahip toksinlerin kompleks bir karışımıdır. Akrepler bu toksinler avlanma ve savunma için kullandıkları için doğrudan avlarının kas ve sinir hücrelerini etkileyecek niteliktedir. Bu nedenle akrep zehir toksinleri kas ve sinir hücre membranlarındaki iyon kanallarını hedef almakta ve bu kanallarla uyum sağlayan küçük polipeptidler ve proteinler içermektedir (7).

Akrep zehir peptitleri kanser hücrelerine spesifik olarak bağlanabilme özelliğine sahip toksinleri de içerebilmektedir. Aslında akrep zehir bileşeninde bulunan çeşitli toksinler farmakolojik yönleri en çok araştırılan ve insanlar üzerinde önemli etkilere sahip zehirlerdir (5,7,8). Akrep zehirlerinin içerdiği toksinler; α -toksinler ve β -toksinler olarak kategorize edilebilir. Spesifik olarak, α -toksinler, voltaj kapılı Na^+ kanallarının inaktivasyonunun geciktirilmesinden sorumlu iken, β -toksinler daha fazla negatif potansiyele sahip bu kanalların açılmasından sorumludur (8). Akrep zehir toksinleri organizmalar (hücreler ve dokular) üzerine zehirlilik etkilerine göre de tanımlanırlar. Akrep zehirleri her ne kadar insanda zehirlenmeye sebep olsalar da aynı zamanda bu toksinler kontrollü kullanılarak yeni ve spesifik etkili ilaçların keşfedilmesi ve geliştirilmesi için önemli bir potansiyel kaynak olarak görülmektedir (9,10).

Bu nedenle başta kanserle mücadelede olmak üzere bazı hastalıkların tedavisi için akrep toksinlerin kullanımı yeni ve oldukça umut verici yaklaşımlardan biridir. Akrep zehirlerinde bulunan anti-kanser peptitler (AKP'ler) temel olarak 50'nin altında amino asite sahip küçük peptitlerdir. Bu peptitler, çoğunlukla alfa-sarmal ikincil yapıya sahip hidrofobik polipeptidlerdir. AKP'ler, kanser hücrelerine karşı seçici yapısal ve morfolojik özellik gösterebilirler (9).

Yapılan çalışmalar, akrep zehir bileşimindeki peptidlerin sitolitik, sitotoksik aktivitelerinin bulunduğu, ayrıca zehir bileşiminde bulunan bazı peptidlerin de vücudun bağışıklık sistemini güçlendirmek suretiyle etki gösterdiğini göstermiştir (10). Bu verilerden yola çıkarak bu çalışmada ülkemizde yaygın bir akrep türü olan Mesobuthus gibbosus (Brulle, 1832)'dan elde edilen ham zehri MCF-7 meme kanseri ve A549 akciğer karsinomu olmak üzere insan kanser hücreleri ve normal fare fibroblast (L929) hücreleri üzerine değişik konsantrasyonlarda uygulayarak sitotoksik etkileri ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. M. gibbosus zehrinin sitotoksik, apoptotik ve antiproliferatif etkileri gösterilmeye çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Arazi Çalışması, Akreplerin Toplanması ve Tür Teşhisi

Bu çalışmada kullanılan M. gibbosus türü akrepler 2016 yılında Yozgat'ın Merkez İlçesine bağlı Sarınoğren köyünde yapılan çeşitli arazi çalışmaları sonucunda, tepelik kesimde taşların altından toplanmıştır. Toplamda 14 akrep toplanarak canlı olarak laboratuvara getirilmiştir. Akrepler, doğal ortamlarına uygun olarak laboratuvarda hazırlanan ortamlarda ayrı ayrı kavanozlara yerleştirilmiş ve zehir eldesi için bakımları yapılmıştır.

Genital ve morfolojik karakterler kullanılarak akreplerin tür teşhisi Prof.Dr. Tarık Danışman (K.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından yapılmıştır. Çalışmada kullanılan akrepler, laboratuvarda kültürü yapılan canlı yem (un kurdu) ile beslenmiş ve haftada bir bakımları yapılmıştır. Zehir sağım işlemi yapılmadan bir hafta önce akrepler zehir miktarları azalması diye beslenmemiştir. Akreplerin telsonuna zehir sağım işleminde elektrik akımı uygulandığı için telsonun bakımı oksijenli su ile yapılmıştır. Bu şekilde bakımı yapılan akrepler yaşatılmış ve 15 gün sonra tekrar zehir sağımı için kullanılmıştır. Bu işlemler zehir miktarı deneyler için yeterli olana kadar devam etmiştir.

Elektriksel Uyarı Yöntemiyle Akrep Ham Zehrinin Sağılması ve Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, M. gibbosus akrep zehri elektriksel uyarı (15-20 V) yöntemi (11) kullanılarak hazırladığımız özel düzenek (Şekil 1) ile canlı akreplerden elde edilmiştir. Elde edilen akrep zehri -20 °C'de derin dondurucuda saklandı. Hücre uygulamalarında kullanılmak üzere toplanan zehir steril suda çözülerek +4 °C'de 15 bin devirde 15 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında zehir toksinlerini içeren süpernatant kısmı başka bir tüpe aktarıldı. Zehir toksinlerinin çoğunluğu protein ve polipeptit olduğu için elde edilen örnek içerisinde bulunan protein konsantrasyonu standart bir yöntem olan Bradford Coomassie Blue yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (12). Bunun için konsantrasyonu bilinen standart referans protein olarak Bovine Serum Albümin'in (BSA) çözeltileri kullanılmıştır. Sırasıyla her bir tüpe 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 mg/ml BSA çözeltileri ve zehir örneğinden 2,4 ml; 0,6 ml Bradford ayırıcı konularak ve 280 nm'de Spactamax Plus marka spektrofotometre cihazıyla absorbansları belirlendi. Referans BSA çözeltilerinin absorbans sonuçlarıyla bir kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak absorbans ölçtüğümüz zehir örneğinin toplam protein konsantrasyonu 0,338 mg/ml olarak hesaplandı. Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere her bir test için azalan şekilde dilüsyon oranlarına sahip zehir örneği (0,0112 mg/ml, 0,0056 mg/ml, 0,0028 mg/ml, 0,0014 mg/ml, 0,0007 mg/ml, 0,0003 mg/ml) kullanıldı.



Şekil 1. *M. gibbosus* akrelerinden zehir sağımı için hazırladığımız düzenek. Elektrotların iletkenliğini artırmak için petri kabı içindeki tuzlu su ile ıslatılmış, akreleri hareketsiz tutmak için petri kabının kenarında çentik açılarak kuyruk dışarıda bırakılmış, pens ile kuyruk tutularak elektrik akımı verilmiş ve çıkan zehir pipet ile toplanmıştır.

Hücre Kültürü

Çalışmada, Kırıkkale Üniversitesi bünyesinde bulunan Bilimsel ve Teknolojik Uygulamalar ve Araştırmalar Merkezi (KÜBTUAM) Hücre Kültür Koleksiyonuna ait A549 insan akciğer kanser hücre serisi (ATCC® CCL-185), MCF-7 insan meme kanseri (ATCC® HTB-22) ve normal fibroblast L929 hücre hattı kullanıldı. Hücrelerin üretildiği besiyeri DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) içeren şişelere, L-glutamin, %10 FCS ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) ilave edilerek hazırlandı ve hücrelerin yerleştirildiği şişeler 37°C'de %5 CO₂ ile ortamında CO₂ inkübatöründe 48 saat süreyle inkübe edildi. Hücreleri toplamak için, hücre kültür mediyumu boşaltıldı ve hücreler tripsin-EDTA (şişe başına 0,5 ml) ile muamele edildi ve hücreler şişe yüzeyinden kaldırıldı. Hücreler daha sonra 15 ml'lik Eppendorf tüplerine aktarıldı ve 3 dakika 1.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernetant boşaltıldı ve hücreler deneysel çalışmalarımızda kullanıldı. Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar (DMEM, FBS, Trypsin/EDTA solüsyonu, Penicillin/Streptomycin) Biochrom (Merck, Germany)'den ve bunların dışındaki hücre kültürü malzemeleri Greiner (Austria)'den temin edilmiştir.

Sitotoksikite Testi (MTT)

Zehrin hücreler üzerine sitotoksik etkisini belirlemek için standart 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi ISO 10993-5 standartlarına uygun bir şekilde gerçekleştirildi (13). Bunun için L929 fibroblast, A549 ve MCF-7 kanser hücreleri besiyeri içeren doksan altı kuyucuğa sahip mikropalakaların her bir kuyucuğa beş bin hücre konuldu. Daha sonra hücreleri içeren mikropalaka yirmi dört saat inkübasyona bırakıldı. Daha önce konsantrasyonları 0,0112 mg/ml, 0,0056 mg/ml, 0,0028 mg/ml, 0,0014 mg/ml, 0,0007 mg/ml, 0,0003 mg/ml olarak ayarlanmış zehir örnekleri hücreler üzerine uygulanarak tekrar inkübe edildi. Çalışmada tüm testler her konsantrasyon için iki tekrarlı olarak yapıldı. Ayrıca çalışmada negatif kontrol grubu olarak sadece besiyeri ortamı kullanılarak denem yapıldı. İnkübasyonu tamamlanan hücrelerin her birinin kuyucuğundaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 50 µl MTT çözeltisi konuldu. İnkübatörde 37 °C'de iki saat inkübasyondan sonra tüm kuyucuklara 100 µl izopropanol

konularak çalkalandı. Bu şekilde hazırlanan mikropkala ELISA plaka okuyusu (ELISA Microplate Reader, BioTek, USA) kullanılarak 570 nm'de absorbanı ölçüldü. Elde edilen absorban değerleri kontrol grupları baz alınarak % hücre canlılıklarını hesaplamada kullanıldı. Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı ve veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi.

İstatistik Analiz

Çalışmadaki normal ve kanserli hücrelerin test sonuçlarının % canlılık değerlerinin dağılımlarının normalliğine Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldığında sırasıyla L929 ile A-549, MCF-7 için sırasıyla $p=0,019$, $p=0,09$ ve $p=0,011$ olduğu görülmüştür. Bu veriye göre üç hücrenin % canlılık anlamlılık değerleri $p<0,05$ in altında olduğu için gruplar normal dağılım göstermemektedir. Bu nedenle Mann Whitney U testi L929, A-549 ve MCF-7 hücrelerinin % canlılık değerlerinin farklarını ortaya koymak için kullanılmıştır.

Apoptozun ve Nekroz Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmada, hücrelerin apoptoz ve nekroz indeksleri ikili boyama metodu kullanılarak belirlendi. Bu metotta Ribonükleaz A (Sigma R-500), Hoechst (33342) ve Propidium iodide boyama kullanıldı ve çekirdeği boyama özelliklerine göre apoptoz ve nekroz gösterilmeye çalışıldı. Ribonükleaz A RNA'yı parçalar, Hoechst (33342) boyama ise apoptotik hücreleri belirler. Propidium iodide ise DNA'yı ve RNA'yı kırmızıya boyayarak ikincil olarak nekrozu belirler. Bu yöntemlerden yararlanarak MCF-7, A549 ve L929 fibroblast hücreleri mikropklalara her bir kuyucuğa beş bin hücre olacak şekilde konuldu. Uygun besiyerinde hücreleri içeren mikropkala inkübatörde yirmi dört saat süreyle inkübe edildi. Sonra sırasıyla her bir kuyucuğa konsantrasyonu 0,0112 mg/ml, 0,0056 mg/ml, 0,0028 mg/ml, 0,0014 mg/ml, 0,0007 mg/ml, 0,0003 mg/ml olan zehir örnekleri uygulandı. Bu şekilde tekrar inkübatöre tabi tutuldu ve kuyucuklardaki besi ortamı atıldı ve her bir kuyucuğa 50 μ l double staining çalışma solüsyonundan ilave edildi. Mikropkala hiç ışık almayacak şekilde kapatılıp ve tekrar on beş dakika inkübe edildi. Daha sonra mikropkladaki hücreler floresan mikroskopun (Leica, Germany) DAPI filtresi kullanılarak incelendi. Bu şekilde mikroskopta apoptoz özellikleri gösteren hücreler belirlendi. Nekroza uğramış hücreleri belirlemek için FITC kullanıldı ve hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı.

Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Hücre proliferasyonunu belirlemek için xCELLingence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanıldı. Bu cihaz elektronik mikropklalar kullanarak empedans ölçümü yapan mikroelektronik biyosensör sistemidir. Bu sayede hücre proliferasyonunun ve morfolojisinin değişimini işaretçi kullanmadan saptamakta ve fizyolojik temas gerektirmeksizin gerçek zamanlı otomatik ölçümler yapabilmektedir. Yüksek hassaslık ve doğrulukta görüntüleme yapabilmek için tercih edilen bir sistemdir (14). Bu çalışmada xCELLingence gerçek zamanlı analiz sistemi, akrep zehri uygulanan hücrelerin proliferasyonunu belirlemede kullanıldı. Denesi yapılacak olan üç hücreden her kuyucuğa beş bin hücre olacak şekilde altın kaplı e-mikropklalara ekim yapıldı. E-mikropkala inkübatörde 20 saat süreyle inkübe edilirken gerçek zamanlı hücre analiz sistemine (RTCA-SP Instrument (Roche, Germany)) bağlı olarak takip edildi. Süre sonunda her kuyucuğa hücreler üzerine sırasıyla 0,0112 mg/ml, 0,0056 mg/ml, 0,0028 mg/ml, 0,0014 mg/ml, 0,0007 mg/ml, 0,0003 mg/ml konsantrasyona sahip zehir örnekleri ilave edildi. Sistem her beş dakika ara ile kuyucuklardaki empedans ölçtü ve ölçümler doksan altı saat süre ile kaydedildi. Süre bitiminde ölçüm değerleri kullanılarak zaman bağı olarak hücrelerin proliferasyonunu gösteren eğriler çizildi.

Bulgular

MTT Testi Sonuçları

Farklı konsantrasyonlardaki zehir örneği iki kanser ve de normal fibroblast hücre hattına uygulandıktan sonra her bir hücrenin % canlılık oranları ELISA plaka okuyucusundan elde edilen absorban değerlerine göre hesaplanmış ve tüm sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Elde edilen veriler ile Mann Whitney U testi

kullanılarak L929, A-549 ve MCF-7 hücrelerinin zehirden etkilenmelerinin farklarını ortaya koymak için kullanılmıştır. Mann Whitney U testinde iki bağımsız örneklem olan L929 ve A-549 için yapılan analiz sonucunda, L929 ($x=68,15$, $ss=40,54$) ve A-549 ($x=68,44$, $ss=27,86$) hücre grupları arasında canlılık yüzdesi olarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($Z=-0,384$, $p>0,05$). Hatta bu iki hücrenin % canlılık ortalamalarına bakıldığında bu iki hücrenin % canlılığı birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Aynı şekilde L929 ($x=68,15$, $ss=40,54$) ve MCF-7 ($x=77,43$, $ss=27,85$) hücre gruplarının % canlılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($Z=-0,128$, $p>0,05$). Fakat bu iki hücrenin % canlılık ortalamalarına bakıldığında MCF-7'nin % canlılık ortalamasının L929 hücresinin % canlılık değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 2). Bu sonuçlara göre, L929 hücrelerinin % canlılık değeri A-549'un değerine çok yakın iken MCF-7 hücrelerinin % canlılık değeri L929'un değerine göre daha yüksek olmasına rağmen araştırmadaki fark, istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Apoptotik Nekrotik İndeks Sonuçları

Bu çalışmada, apoptotik ve nekrotik indeksin hesaplanması double staining yöntemi kullanılmıştır. İkili boyama sayesinde mikropalakardaki hücrelerden apoptotik hücreler mikroskobun DAPI filtresinde parlak mavi renkte, nekrotik hücreler ise, FITC filtresinde kırmızı renkte görüntülendi. Farklı konsantrasyonlarda MCF-7 meme kanser hücrelerine uygulanan zehrin örneklerine ait apoptotik nekrotik indeks sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında; en fazla dilüsyon oranına sahip konsantrasyon olan 0,0003 mg/ml zehir uygulanan hücrelerde apoptotik indeks $4,0 \pm 1,4$, nekrotik indeks ise $2,0 \pm 0,7$ olarak hesaplandı. Uygulanan zehir konsantrasyonu arttıkça apoptotik ve nekrotik indekste arttığı açıkça görülmektedir (Tablo 3). MCF-7 hücrelerinin tipik apoptotik ve nekrotik görüntüleri Şekil 2'de gösterildi.

Tablo 1.

Hücrelerin % canlılık değerleri. % hücre canlılık değerleri ortalama absorbans değerlerini gösterir. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi.

Konsantrasyon (<i>M. gibbosus</i> zehri)	MCF-7 Hücrelerinin % Canlılık	A549 Hücrelerinin % Canlılık	L929 Hücrelerinin % Canlılık
0,0112 mg/ml	20,0 \pm 1	33,0 \pm 0,7	9,0 \pm 0,5
0,0056 mg/ml	49,4 \pm 0,7	25,5 \pm 1,5	19,5 \pm 0,2
0,0028 mg/ml	87,9 \pm 0,8	78,2 \pm 0,5	53,3 \pm 1,5
0,0014 mg/ml	91,3 \pm 1	79,4 \pm 1	96,8 \pm 0,7
0,0007 mg/ml	94,5 \pm 1,4	80,0 \pm 0,5	97,4 \pm 0,8
0,0003 mg/ml	98,9 \pm 2	83,0 \pm 0,6	101,1 \pm 2
Kontrol	100 \pm 0,1	100 \pm 0,1	100 \pm 0,1

Tablo 2

Kontrol olarak kullanılan zehir uygulanmış L929 (kansersiz olmayan hücre) zehir uygulanmış MCF-7 ve A-549 (kansersiz hücreler) % canlılık değerleri parametrik olmayan Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılması

L929 ile A-549 karşılaştırılması						
Gruplar	N	Sıra Ortalaması	Sıralar Toplamı	U	Z	p
L929 (Normal)	7	7,93	55,50	21,500	-,384	,701
A-549 Kansersiz	7	7,07	49,50			

L929 ile MCF-7 karşılaştırılması						
Gruplar	N	Sıra Ortalaması	Sıralar Toplamı	U	Z	p
L929 (Normal)	7	7,64	53,50	23,500	-,128	,898
MCF-7 Kansersiz	7	7,36	51,50			

Tablo 3

Farklı konsantrasyonlarda zehir uygulanmış MCF-7 hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks değerleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi.

Konsantrasyon (<i>M. gibbosus</i> zehri)	%apoptoz	%nekroz
0,0112 mg/ml	12 \pm 1	35 \pm 1
0,0056 mg/ml	12 \pm 0,5	23 \pm 0,5
0,0028 mg/ml	8 \pm 0,7	11 \pm 0,5
0,0014 mg/ml	7 \pm 1,5	8 \pm 0,6
0,0007 mg/ml	5 \pm 1	4 \pm 0,5
0,0003 mg/ml	4 \pm 1,4	2 \pm 0,7
Kontrol	2 \pm 0,5	0 \pm 0

Tablo 4

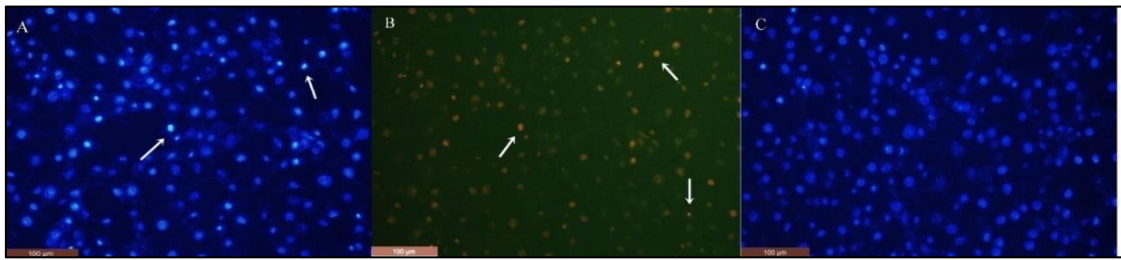
Farklı konsantrasyonlarda zehir uygulanmış L929 Fibroblast hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks oranları. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi.

<i>M. gibbosus</i> ham zehri Konsantrasyon	%Apoptoz	%Nekroz
0,0112 mg/ml	23 \pm 0,5	45 \pm 1
0,0056 mg/ml	18 \pm 0,7	37 \pm 0,5
0,0028 mg/ml	15 \pm 1	24 \pm 0,5
0,0014 mg/ml	11 \pm 2	15 \pm 1
0,0007 mg/ml	9 \pm 1	13 \pm 0,5
0,0003 mg/ml	6 \pm 0,7	5 \pm 1
Kontrol	1 \pm 0,5	0 \pm 0

Tablo 5

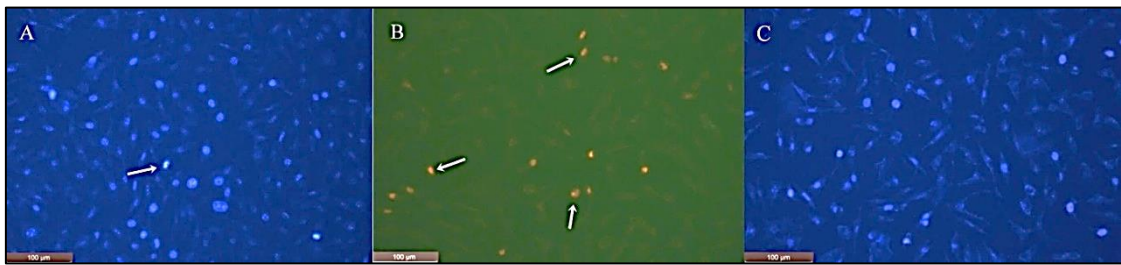
Farklı konsantrasyonlarda zehir uygulanmış A549 hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks değerleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi.

<i>M. gibbosus</i> ham zehri Konsantrasyon	%apoptoz	%nekroz
0,0112 mg/ml	15 \pm 0,4	25 \pm 1
0,0056 mg/ml	12 \pm 1	23 \pm 0,5
0,0028 mg/ml	8 \pm 0,6	17 \pm 0,5
0,0014 mg/ml	7 \pm 2	14 \pm 0,6
0,0007 mg/ml	6 \pm 1	13 \pm 1
0,0003 mg/ml	5 \pm 0,8	10 \pm 1
Kontrol	3 \pm 0,7	0 \pm 0



Şekil 2. İkili boyama ile MCF-7 hücrelerinde apoptoz ve nekrozun gösterilmesi. a) 0,0112 mg/ml oranında *M. gibbosus* ham zehri uygulanan MCF-7 hücreleri. Hoechst 33342 DAPI filtresinde görüntülendi. Apoptotik hücreler okla gösterildi. b) 0,0112 mg/ml oranında *M. gibbosus* ham zehri MCF-7 hücreleri. Propodium iodide FITC filtresinde görüntülendi. Nekrotik hücreler okla gösterildi. c) Kontrol grubu hücreleri.

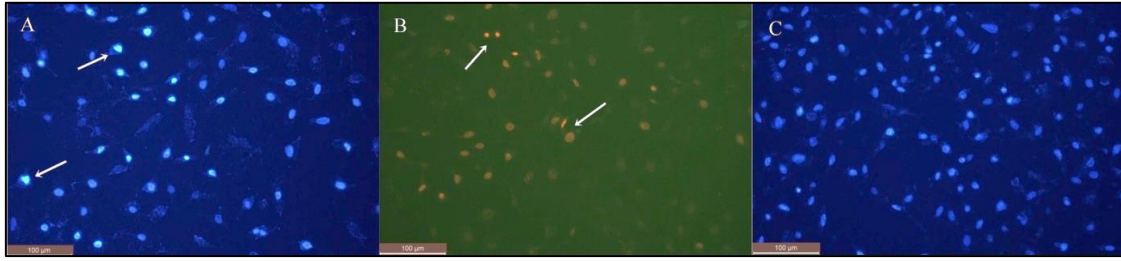
Kanserli olmayan hücre hattı L929 fibroblast hücrelerine *M. gibbosus* zehri uygulandığında yüksek konsantrasyonlarda (0,0112 mg/ml ve 0,0056 mg/ml) apoptotik indeksin yüksek olduğu görülmüştür. MCF-7 kanser hücre hattı ile karşılaştırıldığında normal hücrelere de aynı şekilde toksik olduğu görüldü. L929 fibroblast hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks oranları Tablo 4'te verildi. Apoptoz nekroz görüntüleri Şekil 3'te gösterildi.



Şekil 3. İkili boyama ile L929 fibroblast hücrelerinde apoptoz ve nekrozun gösterilmesi. a) 0,0003 mg/ml oranında *M. gibbosus* ham zehri uygulanan L929 hücreleri. Hoechst 33342 DAPI filtresinde görüntülendi. Apoptotik hücreler okla gösterildi. b) 0,0014 mg/ml oranında *M. gibbosus* ham zehri L929 hücreleri. Propodium iodide FITC filtresinde görüntülendi. Nekrotik hücreler okla gösterildi. c) Kontrol grubu hücreleri.

Diğer bir kanserli hücre hattı olan A549 kanser hücrelerine uygulanan zehir örneklerine ait apoptotik nekrotik indeks sonuçlarına bakıldığında; A549 hücrelerinde en yüksek konsantrasyonda (0,0112 mg/ml) apoptotik indeks %15 \pm 0,4'tür. A549 hücrelerine ait apoptotik nekrotik indeks oranları Tablo 5'te verildi.

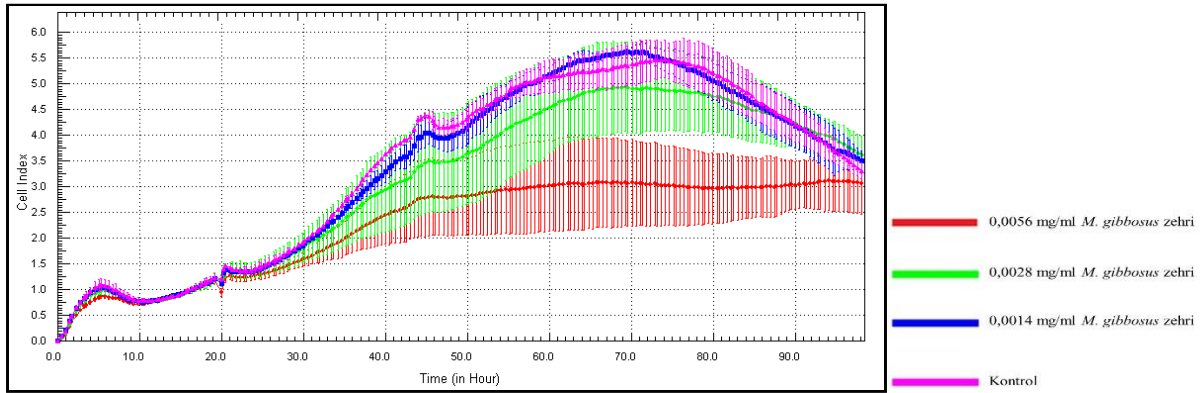
Tablodan da kolaylıkla anlaşılacağı üzere zehir konsantrasyon oranları düştükçe % apoptoz ve nekroz oranlarının düştüğü görülmektedir. A549 hücrelerinin apoptik ve nekrotik görüntüleri Şekil 4'te gösterildi.



Şekil 4. İkili boyama ile A549 hücrelerinde apoptoz ve nekrozun gösterilmesi. Apoptotik hücreler okla gösterildi. a) 0,0028 mg/ml oranında *M. gibbosus* ham zehri uygulanan A549 hücreleri. Apoptotik hücreler okla gösterildi. Hoechst 33342 DAPI filtresinde görüntülendi. b) 0,0112 mg/ml oranında *M. gibbosus* ham zehri A549 hücreleri. Propodium iodide FITC filtresinde görüntülendi. Nekrotik hücreler okla gösterildi. c) Kontrol grubu hücreleri.

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonu Sonuçları

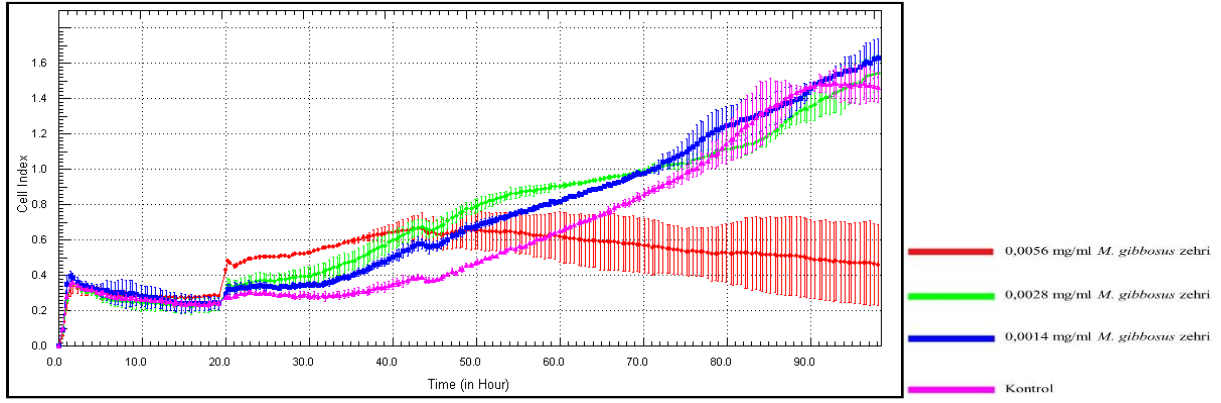
xCELLigence sistemi kullanılarak üç farklı hücre hattı üzerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki zehir örneğinin bu hücrelerin proliferasyonu yani çoğalması üzerine etkileri incelendi. Zehir uygulaması hücrelere 20. saatte yapıldıktan sonra MCF-7, L929 ve A549 hücrelerinin proliferasyonu takip edildi. MCF-7 hücrelerine, zehrin 0,0028 mg/ml ve 0,0014 mg/ml konsantrasyonlarının uygulandığı hücre proliferasyonu 72. saate kadar devam etti. *M. gibbosus* ham zehri örneklerinin 0,0056 mg/ml konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerde de proliferasyon 60. saatten itibaren durdu (Şekil 5). En yüksek zehir konsantrasyonunda hücre çoğalmasının inhibisyonu daha kısa sürede olmuş, zehir konsantrasyonu azaldıkça zehrin hücre çoğalmasının engellenme süresinin uzadığı anlaşıldı. Kontrol grubu hücrelerindeki hücre proliferasyonu 76. saatten itibaren durdu.



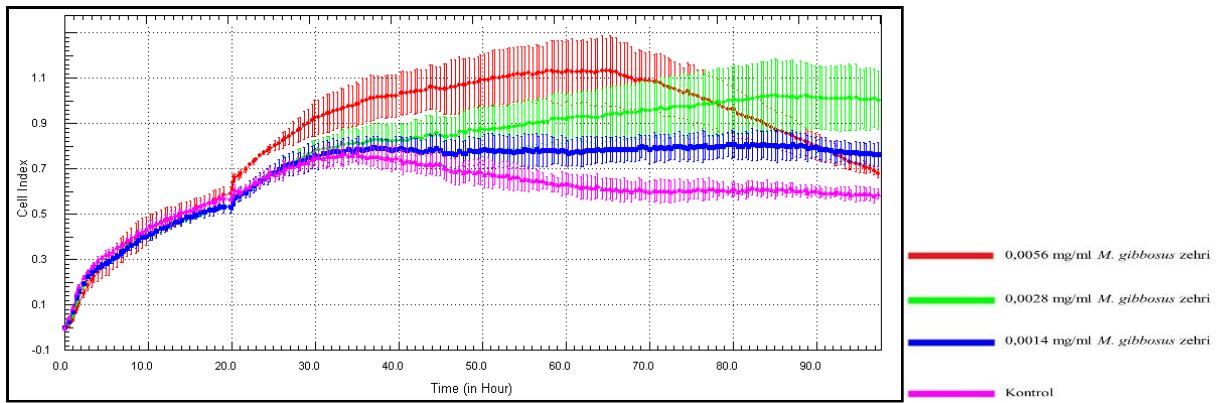
Şekil 5. MCF-7 hücrelerine ait proliferasyon grafiği. MCF-7 hücrelerine 20. saatte *M. gibbosus* ham zehri örnekleri (0,0056; 0,0028 mg/ml ve 0,0014 mg/ml) uygulanmıştır. Kontroller sadece besi ortamı içerir.

L929 normal fare fibroblast hücrelerine en yüksek zehir konsantrasyonu olan 0,0056 mg/ml oranında zehri örneği uygulandığında bu hücrelerin 40. saate kadar çoğalıp, bu saatten sonra çoğalmanın inhibe edildiği gözlemlendi. L929 hücresine ait proliferasyon grafiği Şekil 6'da verilmiştir.

İkinci bir kanser türü olan A549 küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerine de zehir uygulaması yapıldıktan sonra hücrelerin proliferasyonunun devam ettiği Şekil 7'de kolaylıkla görülmektedir. Aslında farklı konsantrasyon ve kontrol grubundaki hücrelerin çoğalma eğrileri birbirine çok benzer şekildedir (Şekil 7).



Şekil 6. L929 fibroblast hücrelerine ait proliferasyon grafiği. L929 hücrelerine 20. saatte *M. gibbosus* ham zehri örnekleri (0,0056; 0,0028 mg/ml ve 0,0014 mg/ml) uygulanmıştır. Kontroller sadece besi ortamı içerir.



Şekil 7. A549 hücrelerine ait proliferasyon grafiği. A549 hücrelerine 20. saatte *M. gibbosus* ham zehri örnekleri (0,0056; 0,0028 mg/ml ve 0,0014 mg/ml) uygulanmıştır. Kontroller sadece besi ortamı içerir.

Tartışma

Zehirli hayvanlar içinde yılanlardan sonra en çok dikkat grup akrelerdir. Akreler gerek avlanma gerekse düşmanlarından korunmak için ürettikleri zehirleri kullanmaktadır. Yapılan çalışmalar, her bir akrebin salgıladığı zehrin içerisinde yüze yakın farklı peptit bulunduğunu göstermiştir. Aslında birçok farklı akrep türünün zehirleri ve içeriği konusunda çok fazla net bilgi bulunmamaktadır. Çünkü tüm akrelerin tamamının zehir içeriği çalışılmamıştır. Çalışmaya konu olan ülkemizde sarı akrep olarak bilinen ve oldukça da yaygın olarak bulunan *M. gibbosus*'un zehrin bileşimi çalışılmış ve zehirde bulunan bileşenlerin moleküler, biyokimyasal ve elektrofizyolojik karakterizasyonu çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmıştır (15, 16). Yaygın bulunan bir akrep türü olması sebebiyle iyi çalışılmış bir türdür. Farklı çalışmalarda gen ekspresyonu ve toksinlerin genomik organizasyonunun kataloğu oluşturulmuş (17).

Farklı akrep türleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, akrelerin zehrinden izole edilen bazı peptitlerin farklı kanser türü hücreleri üzerine etkili olduğu yani akrep zehir toksinlerinin bazılarının antikanser özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmaların birinde, *Leiurus quinquestratus* zehrinden 36 aminoasitten oluşan bir peptit saflaştırılmış ve bu toksin klorotoksin olarak adlandırılmıştır. Klorotoksin ile yapılan çalışmalar, bu toksinin glioma kanser tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmalar akrep zehrinden izole edilen klorotoksinin (CLTx) glioma hücrelerini spesifik olarak tanıdığını ve glioma hücrelerine spesifik olan bir klor iyon kanalını eksprese ettiğini gösterilmiştir (18-21).

Farklı bir akrep türü olan *Buthus martensii* Karsch'ın zehri çalışılmış ve bu akrebin zehrinden izole edilen toksin BmK AGAP olarak adlandırılmıştır. Bu toksinin sinir hücrelerinin zerinde bulunan sodyum

kanalına özgü bir toksin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca BmK AGAP toksinin apoptozisi uyarmak suretiyle kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellediği belirtilmiştir (22). Ayrıca başka bir çalışmada da BmK toksinin insan embriyonik böbrek hücreleri ve fare miyoblast hücreleri üzerinde apoptotik ve nekrotik etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (23).

Mesobuthus cinsine dahil olan farklı akreplerin zehirleri incelendiğinde bu cinse ait akreplerin hemen hepsinde klorotoksin gen ailesine dahil toksinlerin bulunabileceği ifade edilmiştir (17). Yukarıda da belirtildiği gibi klorotoksin glioma hücrelerine duyarlı bir toksindir. Klorotoksin glioma hücrelerine olan bu hassasiyeti belirlendikten sonra bu toksinin gliomanın teşhis ve tedavisi için özel bir belirleyici olarak kullanılabilmesi fikri oluşmuştur (22, 24). Başka bir çalışmada klorotoksin noninvasif tarama aracı olarak kolon, özefagal, servikal, akciğer ve cilt kanserinin belirlenmesinde kullanılabilmesi ileri sürülmüştür (10).

Akrep zehirlerinden sadece toksin peptitler değil daha büyük proteinler, enzimlerde izole edilmiştir. Bunlardan birisi Buthus martensi'nin zehrinden izole edilen BmHYA1 olarak adlandırılan hyaluronidaz enzimidir. İnsan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinin çok fazla miktarda hyaluron içerdiği bilinen agresif bir kanser hücresidir. Bu nedenle BmHYA1'in bu agresif meme kanseri hücrelerini azaltabileceği ve anti-kanser etki gösterdiği görülmüştür. Burada hareketle bu akrep zehir bileşeninin yan etkisi daha az yeni threapötiklerin oluşturulmasında kullanılabilmesi düşünülmektedir (10, 25).

Başka bir akrep türü olan Tityus discrepans akrebinin zehrinden neopladin I ve neopladin II olarak adlandırılan iki yeni farklı peptit tanımlanmıştır. İzole edilen bu yeni peptit toksinlerin insan meme kanseri türü olan SKBR3 hücrelerine etkili olabileceği düşünülmüş ve neopladin I ve II'nin kanser hücrelerinde nekroza yol açmadan oldukça etkili apoptotik özelliğe sahip oldukları belirtilmiştir (26). Farklı bir çalışmada Heterometrus bengalensis adlı akrep türünün zehir içeriğinde, U937 ve K562 insan lösemi hücre hatlarını etkileyecek ve bu kanser hücrelerine apoptojenik etki göstererek apoptozu uyarması sonucunda hücre proliferasyonunu engellediğini göstermişlerdir (27).

Bahsedilen tüm bu çalışmalar ışığında çalışmamızda M. gibbosus'un ham zehrinin sonuçlarına bakıldığında MCF-7 meme kanseri hücre hattında akrep zehrinin apoptozu uyarak kanser hücrelerinin çoğalmasını yavaşlattığı görülmüştür. Ancak M. gibbosus'un ham zehrinin benzer etkiyi A549 akciğer karsinomu hücreleri üzerinde göstermediği yani akciğer kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltmadığı görülmüştür. Yukarıda da belirtildiği gibi Mesobuthus cinsine dahil olan akreplerin hemen hepsinde klorotoksin gen ailesine dahil toksinlerin bulunabileceği ifade edilmiştir (17). Çalışmamızda kullandığımız akrep türü M. gibbosus'un da Mesobuthus cinsine dahil olduğu hatırlanacak olursa bu türün zehrinde de klorotoksin bulunma ihtimalini ve dolayısıyla meme kanser hücrelerine etkisinin olabileceğini desteklemektedir.

Başka bir çalışmada M. gibbosus'un zehrinden jelatinolitik ve sitotoksik etkiye sahip proteazlar tanımlanmıştır. Bu enzimleri içeren zehrinde insan akciğer adenokarsinoma (A549) hücre hatlarına uygulandığında kanser hücrelerinin sayısını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (28). Ancak çalışmamızda, M. gibbosus'un ham zehrinin A549 kanser hücrelerine uygulayıp hücre çoğalmasını takip ettiğimizde bu zehrin akciğer kanser hücrelerinin çoğalmasını çok fazla azaltmadığını gördük.

Zargan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, Odontobuthus doriae akrebinin zehirde bulunan toksinlerin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine etkisini göstermiştir. Bu çalışmaya göre, akrep zehrinde bulunan bazı toksinlerin apoptozu uyardığı ve bu sayede kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurduğunu belirtmiştir. O. doriae akrep zehir bileşenlerinin, mitokondri depolarizasyon yoluyla apoptozu uyardığı meme kanseri hücrelerinin popülasyonunu azalttığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde O. doriae zehrinin nöroblastoma hücrelerinde DNA sentezini dolayısıyla replikasyonu inhibe ettiği hücreleri S-fazında durduğu ve bu yolla hücreleri apoptoza yönlendirdiğini belirtmişlerdir (29).

Sonuçlar

Çalışmamızda, farklı konsantrasyonlarda *M. gibbosus* zehri in vitro ortamda MCF-7 meme kanseri hücre hattında denediğimizde gerçek zamanlı elektronik algılama sistemiyle hücrelerin doza ve zamana bağlı olarak hücre çoğalmasını inhibe ettiğini gözlemledik. Ancak hücrelerin hangi yol ya da mekanizma ile proliferasyonun azaldığını belirleyemedik. Ancak mevcut literatür bilgisi ışığında zehir bileşimindeki klorotoksin benzeri toksinlerin hücrelerde apoptozu indüklediği ve bunun sonucunda da hücre proliferasyonunun azaldığı düşünülmüştür.

Etik Kurul Onayı: Hücre hattı çalışması olduğu için etik kurul onayı alınmamıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Hücre hattı çalışması yapılmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Teşekkür: Çalışmamızda, istatistiksel analizleri yaparak verdiği katkı ve destek için Dr. Müzeyyen Özhavzalı'ya (Kırıkkale Üniversitesi, Fatma Şenses Sosyal Bilimler Meslek Yüksekokulu) teşekkür ederiz.

Kaynakça

1. Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Türkiye Onkoloji Hizmetleri Yeniden Yapılanma Programı 2010-2023. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı. 2010.
2. Tuncer M. Globalleşen Kanser ve Türkiye. 2008. www.nukte.org.
3. Brawley OW. A brief history of the American cancer society extramural research program. *CA Cancer J Clin* 2013; 63(1): 9-10.
4. Baskar R, Lee KA, Yeo R. Cancer and radiation therapy:current advances and future directions. *Int J Medical Sci* 2012; 9(3): 193-199.
5. Santibáñez-López CE, Possani LD. Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution. *Toxicon*. 2015; 107: 317-326.
6. Rein JO. <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/> 2022.
7. Ma Y, He Y, Zhao R, Wu Y, Li W, Cao Z. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *J Proteomics* 2012; 75(5): 1563-1576.
8. Rodríguez de la Vega RC, Schwartz EF, Possani LD. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 2010; 56(7): 1155-1161.
9. Almaaytah A, Tarazi S, Mhaidat N, Al-Balas Q, Mukattash TL. Mauriporin, a novel cationic α -helical peptide with selective cytotoxic activity against prostate cancer cell lines from the venom of the scorpion *Androctonus mauritanicus*. *Int J Pept Res Ther* 2013; 19(4): 281-293.
10. Nabi G, Ahmad N, Ullah S, Khan S. Therapeutic Applications of Scorpion Venom in Cancer: Mini Review. *J Biol Life Sci* 2015; 6(1): 57.
11. Özkan Ö, Filazi A. The determination of acute lethal dose-50 (LD50) levels of venom in mice, obtained by different methods from scorpions, *Androctonus crassicauda* (Oliver 1807) *Acta Parasitol Turcica* 2004; 28:50-3.
12. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
13. Romijn JC, Verkoelen CF, Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. *The Prostate* 1988; 12: 99-110.

14. Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth CP, O'Carroll SJ, Mez ED, Angel CE, Graham ES. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors* 2015; 5(2):199-222.
15. Ucar G, Tas C, Tümer A. Monoamine oxidase inhibitory activities of the scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Buthidae) venom peptides. *Toxicon* 2005; 45(1): 43-52.
16. Ucar G, Tas C. Cholinesterase inhibitory activities of the scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Buthidae) venom peptides. *FABAD J Pharm Sci* 2003; 28(1): 61-70.
17. Diego-García, E, Caliskan F, Tytgat J. The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. *BMC Genomics* 2014; 15(1): 1-16.
18. Feng L, Gao R, Gopalakrishnakone P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008; 148(3), 250-257.
19. Kesavan K, Ratliff J, Johnson EW, Dahlberg W, Asara JM, Misra P, ... & Jacoby DB. Annexin A2 is a molecular target for TM601, a peptide with tumor-targeting and anti-angiogenic effects. *J Biol Chem* 2010; 285(7): 4366-4374.
20. Veiseh M, Gabikian P, Bahrami SB, Veiseh O, Zhang M, Hackman, RC, ... & Olson JM. Tumor paint: α -chlorotoxin: Cy5. 5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Res* 2007; 67(14): 6882-6888.
21. Heinen TE, da Veiga ABG. Arthropod venoms and cancer. *Toxicon* 2011; 57(4): 497-511.
22. Wang WX, Ji YH. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. *J Neuro-Oncol* 2005; 73(1): 1-7.
23. Omran MAA. Cytotoxic and apoptotic effects of scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom on 293T and C2C12 eukaryotic cell lines. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2003; 9(2): 255-276.
24. Fu YJ, Yin LT, Liang AH, Zhang CF, Wang W, Chai BF, ... & Fan X.J. Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas. *Neurosci Lett* 2007; 412(1): 62-67.
25. Sariego J. Breast cancer in the young patient. *Am Surg* 2010; 76(12): 1397-1400.
26. D'Suze G, Rosales A, Salazar V, Sevcik C. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon* 2010; 56(8): 1497-1505.
27. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon* 2015; 93: 125-135.
28. Incesu Z, Caliskan F, Zeytinoglu H. (2005). Cytotoxic and gelatinolytic activities of *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832) venom. *Rev CENIC Cienc Biol* 38.
29. Zargan J, Umar S, Sajad M, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7). *Toxicol In Vitro* 2011; 25(8): 1748-1756.