

Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücre Hattında *Androctonus crassicauda* Ham Zehrinin Sitotoksik Aktivitesi, Apoptotik Etkileri ve DNA Etkileşim Çalışmaları

Büşra Nur Sabah¹, Hatice Mergen², Şahin Toprak³, Leyla Açık^{*1}

¹Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye

²Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06800, Ankara, Türkiye

³Harran Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 63290, Şanlıurfa, Türkiye

Öne Çıkanlar

- *Androctonus crassicauda* zehri üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir.
- Zehir, mitokondriyal membran potansiyelini azaltmış ve DNA hasarına yol açmıştır.
- Bulgular, akrep zehrinin olası antikanser ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Makale Bilgileri

Geliş: 03/10/2025

Kabul: 26/12/2025

Anahtar Kelimeler

Akrep zehri,
Apoptozis,
Biyotoksin,
Kanser,
Hücre ölümü

Öz

Yapılan çalışmalar birçok biyoaktif içeriğe sahip akrep zehrinin kanser tedavi etme potansiyeli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *Androctonus crassicauda* akrep zehrinin etkileri MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerine sitotoksik etkisi MTT yöntemiyle, apoptotik etkileri *in vitro* olarak belirlenmiştir. Mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikler floresan boyama ile belirlenmiş ve apoptozla ilişkili genlerin (CASP3, CDKN1A, TP53, NOXA, PUMA, BCL2, BCL2L1 ve BAX) ifade düzeyleri RT-qPCR ile tespit edilmiştir. Bunun yanında, akrep zehrinin DNA'ya etki potansiyeli pBR322 plazmit DNA'sı kullanılarak incelenmiştir. Ham akrep zehrinin konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir ($p < 0,0001$). Zehir uygulamasından 24 saat sonra mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir azalma gözlemlenmiştir. CASP3 geninin ekspresyon seviyesinde 4,7 kat azalış ($p = 0,0320$), PUMA'da 12,5 kat artış ($p = 0,0238$), CDKN1A 12 kat azalış ($p = 0,0337$) ve pro-apoptotik BAX geninde 2,33 kat anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p = 0,0445$). Ayrıca zehrin konsantrasyon bağımlı olarak DNA'da çift zincir kırıklarına neden olduğu belirlenmiştir.

Cytotoxic Activity, Apoptotic Effects, and DNA Interaction Studies of *Androctonus crassicauda* Crude Venom in Triple Negative Breast Cancer Cell Line

Highlights

- *Androctonus crassicauda* venom showed cytotoxic effects in triple-negative breast cancer cells.
- The venom reduced mitochondrial membrane potential and induced DNA damage.
- Findings suggest its potential as a candidate anticancer agent.

Article Info

Received: 03/10/2025

Accepted: 26/12/2025

Keywords

Scorpion venom,
Apoptosis,
Biotoxin,
Cancer,
Cell death

Abstract

Studies have shown that scorpion venom, which contains many bioactive compounds, has the potential to treat cancer. Therefore, the cytotoxic effects of *Androctonus crassicauda* scorpion venom on MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells were determined using the MTT method, and its apoptotic effects were determined *in vitro*. Changes in mitochondrial membrane potential were determined by fluorescent staining, and the expression levels of apoptosis-related genes (CASP3, CDKN1A, TP53, NOXA, PUMA, BCL2, BCL2L1, and BAX) were determined by RT-qPCR. In addition, the potential effect of scorpion venom on DNA was investigated using pBR322 plasmid DNA. Crude scorpion venom was shown to significantly reduce cell viability in a concentration-dependent manner ($p < 0.0001$). A significant decrease in mitochondrial membrane potential was observed 24 hours after venom application. A 4.7-fold decrease in the expression level of the CASP3 gene ($p = 0.0320$), a 12.5-fold increase in PUMA ($p = 0.0238$), a 12-fold decrease in CDKN1A ($p = 0.0337$), and a 2.33-fold significant increase in the pro-apoptotic BAX gene ($p = 0.0445$) were observed. It was also determined that the venom causes concentration-dependent double-strand breaks in DNA.

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde yaygın görülen başlıca sağlık sorunlarından biri olup, aynı zamanda en önemli mortalite nedenlerinden biridir. Yeni kanser vakalarının sayısının 2050 yılına kadar yaklaşık 35 milyona çıkmasının beklendiği tahmin edilmektedir [1]. Kanser tedavi yöntemleri kemoterapi, radyoterapi, cerrahi, immünoterapi ve hormonal tedaviyi kapsamaktadır [2]. Kanserın artan insidansı ve ölümcül bir hastalık olması, tedavi yaklaşımlarında hedefe yönelik araştırmaların yapılmasını teşvik etmiştir. Kemoterapi, bu araşışlara bir çözüm olarak tümörün büyümesini baskıladığı için uzun süredir tercih edilen başlıca yaklaşımlardan birisi olmuştur [3]. Ancak kemoterapinin sağlıklı hücrelere zarar verme ve ilaca dirençli tümör hücresi gelişimi riskini artırma gibi yan etkileri de vardır. Alternatif olarak, antikanser ilaçlarla kemoterapi yerine biyoterapi yöntemleri denenmektedir [4]. İstatistiklere göre meme kanseri, akciğer ve kolorektal kanserlerin ardından en sık görülen üçüncü kanser türü olarak bildirilmektedir. Meme kanserinin prognozuna bakıldığında hastalığın moleküler alt tiplerine göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu alt tipler, gen ekspresyon profillerinin analiz edilmesiyle tanımlanmıştır. Alt tiplerin açıklanması, hastalığın tedavi stratejilerini şekillenmesinde önemli bir rol oynamış ve tümöre özgü tedavi yaklaşımlarının olması gerektiğini vurgulamıştır [5]. Üçlü negatif meme kanseri, diğer meme kanseri türlerine kıyasla daha yüksek proliferasyona sahiptir ve metastaz yeteneği yüksektir. Luminal A, B ve HER2 ile zenginleştirilmiş alt tiplere sahip bireyler hedefli tedaviye cevap verirken, üçlü negatif meme kanseri olanlarda olumlu bir prognoz daha azdır. Bu kanser türünde endokrin reseptörlerinin bulunmaması nedeniyle endokrin tedavi etkisizdir ve uygulanamaz [6]. Bu nedenle yeni tedavi stratejileri bulmak önemlidir. Apoptoz mekanizmasının düzgün çalışmaması hücre birikimine yol açar ve sonuç olarak tümör gelişimine sebep olur. Bu mekanizmanın bozulmasının nedenleri arasında proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerde dengesizlik, kaspaz aktivitesinde azalma veya ölüm reseptörü sinyallemesinde bozukluk yer alabilir [7]. Akrep zehrinin veya yapısında bulunan ve hücre çoğalmasını engelleyen peptitlerin etki mekanizması göz önüne alındığında, apoptozisin indüklendiği, G0/G1 fazında duraklama olduğu ve DNA sentezinin inhibisyonunun gözlemlendiği bildirilmektedir. Çoğu durumda kanser hücre hatlarında gözlemlenen proliferasyonun azalması, apoptotik yolların uyarılmasına bağlanmaktadır [8, 9].

Akrep zehirleri, meme kanseri başta olmak üzere diğer kanser türlerinin tedavisinde de potansiyel terapötik ajanlar olarak değerlendirilmeye başlanmıştır [10]. Akrep zehri bileşenleri, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitelerine ek olarak, hücre yüzeylerindeki iyon kanalları ve spesifik reseptörler ile etkileşime girerek sinyal yollarını etkilemekte ve tümör baskılayıcı bir aktivite göstermektedir [11]. Proteomik ve transkriptomik çalışmalar sonucunda, her akrep türünün zehrinin 1 ila 9 kDa arasında değişen 100'den fazla peptit içerdiği ortaya konmuştur [12]. Akrepler tarafından üretilen zehir, farklı iyon kanalları üzerinde etki ederek zar proteinlerinin etkileşime girmesine neden olan bol miktarda peptit toksini içerir [13]. Bu peptit toksinleri, potasyum, sodyum, klorür ve kalsiyum iyonlarına ait kanal zar proteinlerini hedef alarak onlarla yüksek özgüllükte etkileşim gösterir [14]. *A. crassicauda* (Olivier, 1807), Buthidae familyasının bir üyesi olan kara akrep dünya çapında en tehlikeli 25 akrepten biri olarak kabul edilen bir türdür [15]. Çok zehirli olan bu akrep zehri ölümcüldür. Türkiye'de, sarı akrepten sonra en toksik tür olarak kabul edilmekte olup, ev içi akrep sokmalarının büyük çoğunluğundan bu tür sorumludur [16].

Kansere karşı moleküllere yönelik araşış hâlen devam etmektedir; bu nedenle kimyasal maddelerin sentezlenmesinin yanı sıra hayvansal kaynaklar, yeni antikanser bileşiklerin bulunmasında alternatif bir seçenek oluşturmaktadır. Arı, akrep, karınca, örümcek ve tırtıl gibi bazı zehirli hayvanlar farmakolojik olarak aktif moleküller üretmekte ve tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Zehir ve onun peptitleri, antikanser ilaçların geliştirilmesinde yeni bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Özellikle akrep zehri; peptitler, serbest aminler, nükleotidler, lipitler ve biyolojik olarak aktif bileşikler içermesi nedeniyle araştırmacılar tarafından güçlü bir doğal kanser tedavisi kaynağı olarak görülmektedir [17].

Bu çalışmanın amacı güney doğu bölgemizde bulunan akrep türü *A. crassicauda*'nın ham zehrinin, agresif bir meme kanseri olan MDA-MB-231 hücreleri üzerinde antikanser potansiyelini belirlemektir [18].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada *A. crassicauda* akrep zehrinin üçlü negatif meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231) üzerindeki biyolojik etkileri incelenmiştir. Hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkiler MTT yöntemi ile belirlenmiş, apoptotik etkiler *in vitro* koşullarda floresan boyama ve mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimler üzerinden değerlendirilmiştir. Apoptozla ilişkili genlerin (*CASP3* (Kaspaz-3), *CDKN1A* (siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A), *TP53* (tümör proteini p53), *NOXA* (forbol-12-miristat-13-asetat kaynaklı protein 1), *PUMA* (BCL2 bağlayıcı bileşen 3), *BCL2* (BCL2 apoptoz düzenleyicisi), *BCL2L1* (Bcl-2 benzeri 1 (Bcl-xL)) ve *BAX* (BCL2 ile ilişkili X)) ekspresyon düzeyleri RT-qPCR ile analiz edilmiştir. Ayrıca, zehrin DNA üzerindeki potansiyel etkileri pBR322 plazmid DNA'sı kullanılarak incelenmiş ve DNA hasarı agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir.

2.1. Reaktifler

Roswell Park Memorial Institute 1640 Ortamı ve Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı, GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) firmasından satın alındı. Fetal sığır serumu (FBS) ve TRIzol reaktifi sırasıyla Sigma-Aldrich (ABD) ve VWR Life Science (ABD) firmalarından temin edildi. 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) reaktifi, diğer kimyasallar ve reaktiflerle birlikte Sigma (St Louis, MO) firmasından temin edildi. Apoptoz/Nekroz Analiz Kiti ve JC-1 boyası (Mitokondriyal Membran Potansiyeli Probu) sırasıyla Abcam (İngiltere) ve Invitrogen (ABD) firmalarından temin edildi. RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti ThermoFisher Scientific'ten (ABD) ve Sybr Green qPCR ana karışımı Amplicon'dan (DK) satın alındı.

2.2. Akrep Zehrinin Hazırlanması

Zehir, Harran Üniversitesi Akrep Biyoekolojik ve Moleküler Genetik Araştırma Grubu laboratuvarındaki araştırmacılar tarafından canlı akreplerden elde edildi. Zehir, 12-16 volt aralığında akım uygulanarak elektriksel uyarım kullanılarak çıkarıldı. Çıkarılan zehir liyofilize edildi ve sonraki kullanıma kadar -20°C'de saklandı. Liyofilize edilen zehir, iki kez damıtılmış suyla seyreltildi ve seyreltilmiş ham zehir, +4°C'de 15 dakika boyunca 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz, deneylerde kullanıldı. Protein konsantrasyonu, 280 nm absorbansta spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sterilizasyon 0,22 µm membran filtrasyon ile sağlandı.

2.3. Hücre Kültürü ve Uygulamaları

Vero (böbrek epiteli) ve MDA-MB-231 (insan meme kanseri) hücreleri, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Uygulama ve Araştırma Merkezi Hücre Kültürü koleksiyonundan temin edildi. Hücreler, sırasıyla DMEM (L-glutamin içeren) ve RPMI-1640 (L-glutamin içeren) besiyeri kullanılarak 25 cm²'lik plastik şişelerde kültürlendi. Kültür besiyeri, ısı ile aktifleştirilmiş %10 FBS (Fetal Sığır Serum), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeriyordu. Hücreler, %5 CO₂ ile nemlendirilmiş atmosferde 37°C'de inkübe edildi. Hücre pasajı, %80-90 konfluansa ulaştığında gerçekleştirildi. 10 µL hücre konsantrasyonu örneği ½ oranında seyreltilmiş tripan mavisi ile boyandı ve hücre sayımı, mikroskop altında bir hemositometre kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler, steril 96 kuyulu ve 24 kuyulu plakalara toplandı. Bir gecelik inkübasyonun ardından, besiyeri aspire edildi ve her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlarda akrep zehri içeren taze bir besiyeri eklendi.

2.4. Sitotoksite Analizi

Akrep ham zehrinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi, kolorimetrik MTT testi ile değerlendirildi. Hücreler, kuyu başına 100 µL olacak şekilde, 1,5x10⁴ hücre/kuyu yoğunluğunda 96 kuyucuklu bir plakaya ekildi ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler, besiyerinde çözünmüş farklı konsantrasyonlarda akrep zehrine (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL ve 31,2 µg/mL) maruz bırakıldı.

İşlem görmemiş hücreler, hücre canlılığının %100 olduğu kabul edilerek negatif kontrol olarak kullanıldı. 24 saatlik bir maruziyetin ardından, her bir kuyucuğa 100 µl MTT çözeltisi (5 mg/ml) eklendi ve 3 saat inkübe edildi. Üst faz daha sonra aspire edildi ve formazan çökeltileri kuyucuk başına 150 µl dimetil sülfoksit kullanılarak çözüldü. Absorbans, bir mikropilaka okuyucusu ile 570 nm'de ölçüldü. Hücre canlılık yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

% canlılık = tedavi edilen hücrelerin A570/negatif kontrol hücrelerinin A570'i x 100.

IC₅₀ değeri (400 µg/mL), 500 µg/mL ve 31,2 µg/mL aralığındaki zehir konsantrasyonlarından elde edilen hücre canlılık verilerine dayanarak Microsoft Excel kullanılarak doğrusal regresyon analizi ile hesaplandı. Deney üç kez tekrarlandı.

2.5. Apoptotik Hücrelerin Morfolojik Değerlendirmesi

MDA-MB-231 hücreleri (2x10⁴ hücre/kuyu) 96 kuyucuklu bir plakaya ekildi ve bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, hücreler 24 saat boyunca akrep zehirinin IC₅₀ ve ½ IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edildi. Daha sonra, kit talimatlarına (Abcam ab176749, İngiltere) göre boya çözeltileri (Apopksin, 7-AAD, SitoKalsein Menekşe) hazırlandı. Kuyulardaki besiyeri çıkarıldı ve her kuyu bir kez kit içeriğinde mevcut olan 50 µL Assay Buffer ile yıkandı. Daha sonra, hazırlanan boya çözeltisinden her kuyuya 102 µL eklendi. Hücreler oda sıcaklığında karanlıkta 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra çözelti her kuyudan atıldı. Hücreler, 100 µL Assay Buffer ile tekrar yıkandı. Yıkama işleminin ardından hücrelere 100 µL taze Assay Buffer eklendi ve görüntüleme floresan mikroskopta (EVOS Flouid Cell Imaging Station, Thermo Fischer Scientific) Apopksin (Ex/Em = 490/525 nm), 7-AAD (Ex/Em = 550/650 nm) ve SitoKalsein Menekşe (Ex/Em = 405/450 nm) dalga boyları kullanılarak gerçekleştirildi.

2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Değerlendirmesi

Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesinde JC-1 boyası (5, 5', 6, 6'-tetrakloro-1, 1', 3, 3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür) kullanıldı. MDA-MB-231 hücreleri (2x10⁴ hücre/kuyu, 100 µL), 96 kuyulu bir plakaya toplandı ve bir gece inkübe edildi. JC-1 boyama işleminden önce, hücrelere 10 dakika boyunca valinomisin (10 µM) uygulandı ve pozitif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyondan sonra, ortam aspire edildi ve hücreler, 24 saat boyunca IC₅₀ ve ½ IC₅₀ konsantrasyonlarında akrep zehri içeren bir ortama maruz bırakıldı. Hasat edilen hücreler 1X steril fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı ve karanlıkta 37°C'de 30 dakika boyunca JC-1 (2 µM) ile inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda, hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandı. Floresan mikroskop altında (EVOS Flouid Hücre Görüntüleme İstasyonu, Thermo Fischer Scientific) monomer form (523 nm) ve J-agregat form (590 nm) yeşil/kırmızı filtre ile görüntülendi.

2.7. RNA İzolasyonu ve Apoptotik Genlerin qPCR Analizi

24 kuyucuklu bir plakada, 500 µl MDA-MB-231 hücresi (10x10⁴) ekildi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, hücreler ½ IC₅₀ akrep ham zehiri ile muamele edildi ve muamele edilmemiş hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı. Muamele edilmiş ve edilmemiş hücreler daha sonra üç farklı zaman aralığında inkübe edildi: 0 saat, 24 saat ve 48 saat. Her inkübasyon periyodunun sonunda, üreticinin talimatları (VWR, ABD) doğrultusunda RiboZol™ (VWR Life Science) RNA ekstraksiyon ürünü kullanılarak RNA izolasyon protokolü uygulandı.

Kanser hücrelerinden toplam RNA izole edildi ve toplam RNA spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçüldü. İzole edilen RNA örnekleri (500 ng), 20 µL hacimli bir reaksiyonda RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (ThermoFisher Scientific K1622) kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. mRNA düzeyleri Sybr Green testi kullanılarak analiz edildi. qPCR reaksiyonu, 20 µL toplam hacimde Ampliqon RealQ Plus protokollerine göre SYBR Green Master Mix ile hazırlandı (Amplicon, DK).

Kullanılan primer dizileri; *ACTB* (beta actin) (Forward: CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG, Reverse: GGAGCAATGATCTTGATCTTC), *CASP3* (Forward: AGAACTTAGGCATCTGTGGGC, Reverse: ATCCAGGGGCATTGTAGCAC), *CDKN1A* (Forward: CAGGGGACAGCAGAGGAAGA, Reverse: GGCAGAAGATGTAGAGCGGG), *TP53* (Forward: GGGTTAGTTTACAATCAGGCACATT, Reverse: GGCCTTGAAGTTAGAGAAAATTCA), *NOXA* (Forward: TTCAATGTGTTCTGTTGGGC, Reverse: GTGACAAGGAGCATTTCCTCGA), *PUMA* (Forward: GTCCTCAGCCCTCGCTCT, Reverse: CTGCTGCTCCTCTGTCTCC), *BCL2* (Forward: ATGGGCTGGACATTGGACTTC, Reverse: GGGAGGTCAGCAGGGTAGAT), *BCL2L1* (Forward: ACCCCTTAGCCTCCCTGAAA, Reverse: CCATAAACAGCTCTGGGGCA), *BAX* (Forward: CTACAGGGTTTCATCCAG, Reverse: CCAGTTCATCTCCAATTCCG) [19]. Gerçek zamanlı qPCR reaksiyon koşulları Çizelge 1’de belirtilmiştir. qPCR işlemi LightCycler 480 Sistemi (Roche, CH) kullanılarak gerçekleştirildi. Gen ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplandı. Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri, referans gen olan *ACTB* (Beta-aktin) ile normalize edildi. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Çizelge 1. Gerçek zamanlı qPCR reaksiyon koşulları

Döngü Sayısı	Döngü Süresi	Sıcaklık
1	15 dakika	95 °C
40	15 saniye 60 saniye 10 saniye	95 °C 60 °C (Primerlere göre optimize edildi) 72 °C
1	30 saniye	40 °C

2.8. DNA Etkileşimlerinin Belirlenmesi

Akrep ham zehri, süper sarmal pBR322 plazmit DNA'sı ile 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, DNA ve zehir arasındaki etkileşim agaroz jel elektroforezi kullanılarak incelendi. 25 µg/mL ile 1,56 µg/ml arasında değişen çeşitli bileşik konsantrasyonları, %1'lik bir agaroz jele yüklendi. Elektroforez, 70 V'da 120 dakika boyunca bir TAE tamponu altında gerçekleştirildi. Jel, etidyum bromür (0,5 mg/mL) ile boyandı, bir transillüminatör (BioDoc Analyzer, Biometra) kullanılarak UV ışığı altında gözlemlendi ve görüntü, TIFF formatında bir video kamera kullanılarak kaydedildi [20] *BamHI* ve *HindIII* enzimi ile kesim reaksiyonları ile enzim inhibisyonu üzerine zehirin etkisi araştırıldı. Tüm konsantrasyonlardaki zehir ve plazmit DNA karışımı, *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, bileşik ve plazmit DNA örnekleri TAE tamponu altında %1 agaroz jel üzerine yüklendi. Jel, etidyum bromür (0,5 mg/mL) ile boyandı, bir transillüminatör (BioDoc Analyzer, Biometra) kullanılarak UV ışığı altında gözlemlendi ve görüntü, TIFF formatında bir video kamera kullanılarak kaydedildi [21].

2.9. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler en az üç bağımsız tekrar (n=3) halinde gerçekleştirildi ve sonuçlar Ortalama ± Standart Hata (SEM) olarak sunuldu. IC₅₀ değerleri, konsantrasyon-yanıt eğrileri üzerinden logaritmik regresyon analizi ile hesaplandı. Gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler, GraphPad Prism yazılımı (Sürüm 9.3.0) kullanılarak yapıldı. Farklı konsantrasyon gruplarının negatif kontrol grubu ile karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) ve ardından çoklu karşılaştırma testi olarak Dunnett's post-hoc testi kullanıldı. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (*p<0,05, ***p<0,001 ve ****p<0,0001).

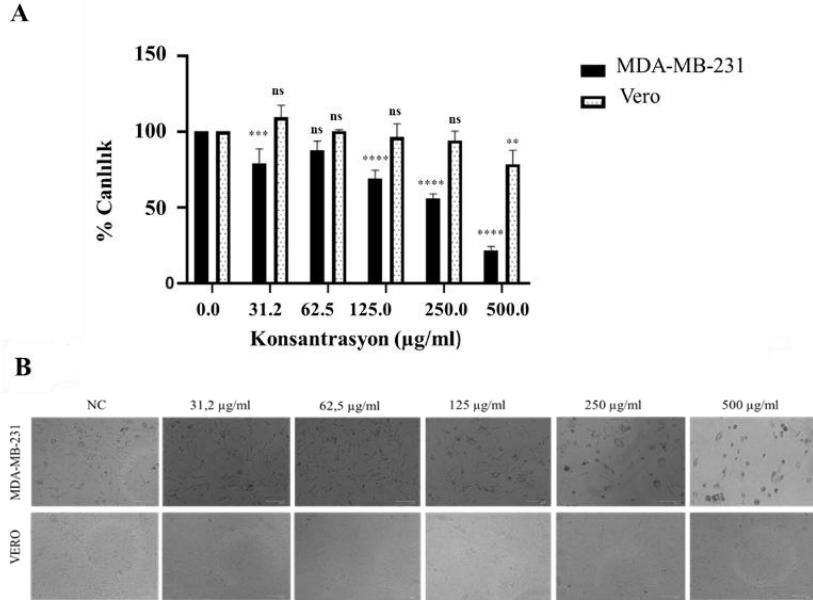
3. BULGULAR

3.1. Sitotoksisite

Bu çalışmanın amacı, zehrin neden olduğu sitotoksisite değerini bulmak ve IC₅₀ cinsinden toksisite belirlemektir. Hücrelerin canlılığını %50'ye düşürmek için gereken zehire maruz kalma doz değerlerine göre sitotoksik aktivite belirlenmiştir.

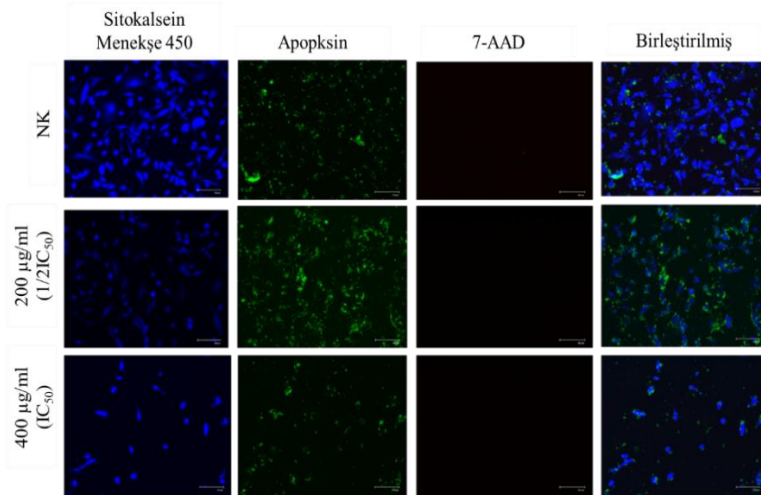
MTT testi, akrep zehrinin hem sağlıklı (Vero) hem de kanser (MDA-MB-231) hücreleri üzerindeki toksisitesini 24 saat boyunca beş farklı konsantrasyonda değerlendirmek için kullanılmıştır. MTT testi, hücre metabolik aktivitesini doza bağlı bir şekilde değerlendirerek toksisite durumunu ölçmüştür (Şekil 1A). *A. crassicauda*'nın meme kanseri ve epitel hücrelerinde farklı etkisini gösteren hücre morfolojik görüntüleri mikroskopta görüntülenmiştir (Şekil 1B). Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Test edilen en yüksek zehir konsantrasyonu 500 µg/mL olup, bu konsantrasyonda hücre canlılığı %21,63 olarak hesaplanmıştır (Şekil 1). En düşük konsantrasyon olan 31,2 µg/mL'de ise MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde %78,9 oranında hücre canlılığı saptanmıştır. *A. crassicauda* ham zehrinin IC₅₀ değeri 400 µg/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, zehrin MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde belirgin sitotoksik etki gösterdiğini, ancak aynı konsantrasyonda epitel hücreleri (Vero hücre hattı) üzerinde sitotoksikite oluşturmadığını ortaya koymuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan dozların negatif kontrol ile kıyaslanması sonucunda 31,2 µg/mL uygulanan dozda *p* değeri 0,0009, 125 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL dozlarda *p* değerleri <0.0001 bulunarak istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Vero hücresi ile yapılan değerlendirmelerin sonucunda ise sadece 500 µg/mL dozda *p* değeri 0,0068 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Elde edilen bulgular, akrep ham zehrinin, meme kanseri hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı ölçüde azalttığını göstermiştir.



Şekil 1. A) Akrep zehrinin 24 saat boyunca sağlıklı (Vero) ve kanser (MDA-MB-231) hücreleri üzerindeki sitotoksitite testi (***p*<0,05, ****p*<0,001 ve *****p*<0,0001). **B)** Sağlıklı Vero ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 24 saat akrep zehiri ile muamele edilmesi (NC: Negatif kontrol)

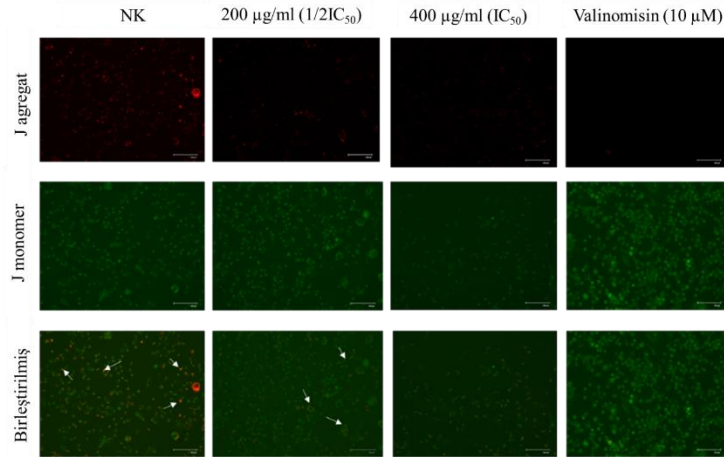
Apoptozis/Nekroz Tespit Kiti (Abcam, ab176749) kullanılarak hücre boyaması yapılarak, *A. crassicauda* zehrinin MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz mu yoksa nekroz mu oluşturduğu değerlendirilmiştir (Şekil 2). Canlı hücreler SitoKalsein Menekşe 450 (mavi), erken apoptotik hücreler Apopksin yeşili ve membran hasarı olan (geç apoptotik veya nekrotik) hücreler 7-AAD (kırmızı) ile görüntülenmiştir. 200 µg/mL (½ IC₅₀) ve 400 µg/mL (IC₅₀) zehri uygulaması, Apopksin pozitif hücre sayısında artışa neden olurken, 7-AAD pozitifliği gözlenmemiştir. Elde edilen bulgular, zehrin bu koşullar altında geç apoptoz veya nekroza ilerlemeden çoğunlukla erken evre apoptozu indüklediğini göstermektedir.



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda akrep zehri ile 24 saat boyunca muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz ve nekrozu gösteren floresan boyama sonuçları. (NK: Negatif kontrol; Mavi: canlı hücreler, Yeşil: apoptotik hücreler, Kırmızı: nekrotik hücreler)

3.2. A. crassicauda Zehrinin Meme Kanseri Hücrelerinde Mitokondriyal Zar Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Üzerindeki Etkileri

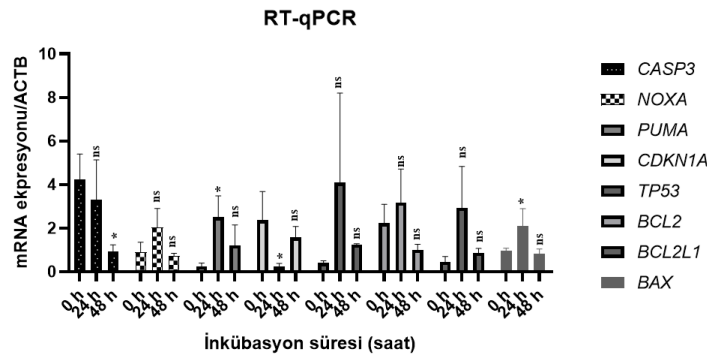
Mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikler, katyonik bir floresan boya olan JC-1 kullanılarak belirlenmiştir. Üçlü negatif meme kanseri hücrelerine IC₅₀ ve ½ IC₅₀ dozları uygulanmıştır. Negatif kontrole herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Mitokondriyal zar bütünlüğünün bozulması, apoptozun ilk olayları arasındadır. Bu değişim, mitokondriyal zar gözeneklerinin açılmasından kaynaklanır. 200 µg/mL konsantrasyonda J-agregatlarının sayısındaki azalma ve J-monomerlerinin sayısındaki artış, hücrelere verilen hasar nedeniyle mitokondriyal zarın dengesizleştiğini ve dolayısıyla hücrelerin apoptozuna yol açtığını göstermektedir. Şekil 3'te gösterildiği gibi, 24 saat boyunca A. crassicauda zehri ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerindeki mitokondriyal membran zar potansiyelinde azalma gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan valinomisin, iç mitokondriyal membranda dengesizlik oluşturarak mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı bilinen bir K⁺ ionofordur. Sonuçlar, zehrin etkisinin pozitif kontrol ile benzer bir mekanizma sergilediğini göstermektedir.



Şekil 3. Floresan mikroskopu altında 24 saat boyunca A. crassicauda zehri ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelindeki değişikliklerin gösterimi. (Beyaz oklar, mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalmayı gösteren J-agregatlarını göstermektedir (NK: Negatif Kontrol, Valinomisin: Pozitif Kontrol))

3.3. A. crassicauda Zehri Uyarımı ile Tedavi Edilen Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik Genlerin Ekspresyonunun Belirlenmesi

MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri, 200 µg/mL doz *A. crassicauda* zehri ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. İncelenen apoptotik ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin (*CASP3*, *NOXA*, *PUMA*, *CDKN1A* (*p21*), *TP53* (*p53*), *BCL2*, *BCL2L1* ve *BAX*) mRNA ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna (0 h) göre 24. ve 48. saat inkübasyon sürelerinde RT-qPCR yöntemi ile nicel olarak analiz edilmiştir. Şekil 4'teki gen ifadeleri ve düzeyleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile hesaplanmıştır. *ACTB*, referans gen olarak kullanılmıştır. Apoptotik genler, *ACTB*, geniyle grafiksel olarak karşılaştırılmıştır. Çoklu karşılaştırmalı istatistiksel analizler sonucunda, incelenen genler arasında yalnızca *PUMA*, *CASP3*, *CDKN1A* ve *BAX* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) değişimler tespit edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. *A. crassicauda* zehri ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinde 0, 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra *CASP3*, *NOXA*, *PUMA*, *CDKN1A* (*p21*), *TP53* (*p53*), *BCL2*, *BCL2L1* ve *BAX* genlerinin gen ekspresyon seviyeleri. Veriler, üç kez tekrarlanan bağımsız deneylerden elde edilen ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir. Belirtilen anlamlılık, kontrole (0 saat) kıyasla 24 ve 48 saatte gösterilmiştir. n.s. (anlamlı değil), * $p < 0,05$

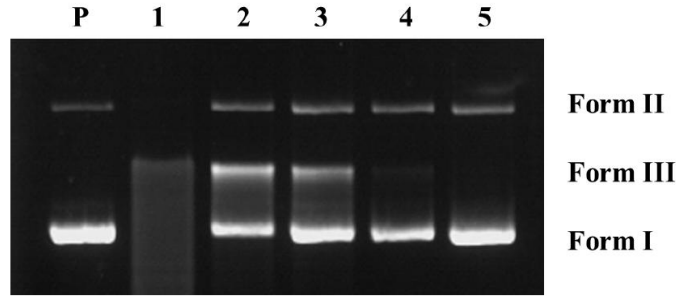
CASP3 geninin ekspresyon seviyesi 48. saatte yaklaşık olarak 4,7 kat azalarak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç oluşturmuştur ($p=0,0320$). *PUMA* geninin ekspresyonu da en güçlü ve en güvenilir nicel yanıtı göstererek, 24. saatte anlamlı olarak 12,5 kat artış göstermiştir ($p=0,0238$). *CDKN1A* mRNA ekspresyon seviyesi, 24. saatte kontrol grubuna göre yaklaşık 12 kat azalmıştır ($p=0,0337$). Pro-apoptotik *BAX* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde de anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. ANOVA analizi sonuçlarına göre, ekspresyon 24. saatte kontrol grubuna göre yaklaşık 2,33 kat artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0445$). Diğer genlerde (*NOXA*, *TP53* (*p53*), *BCL2*, *BCL2L1*) gözlemlenen ekspresyon seviyesi değişimleri ise herhangi bir zaman noktasında istatistiksel anlamlılık eşiğini aşmamıştır ($p > 0,05$). Bu durum, deneysel uygulamanın bu genlerin ekspresyonu üzerinde rastlantısal olmayan, spesifik bir etki yaratmadığını göstermektedir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Gen ifadesi değişimleri ve anlamlılık değerleri.

Gen Adı	Apoptoz Rolü	24. saat (fold-change)	48. saat (fold-change)	P değerleri
<i>CASP3</i>	Apoptoz başlatıcı	1,27 ↓	4,7 ↓	0,0320
<i>NOXA</i>	Pro-Apoptotik	2,22 ↑	0,78 ↓	$p > 0,05$
<i>PUMA</i>	Pro-Apoptotik	12,5 ↑	6,0 ↑	0,0238
<i>CDKN1A</i>	Hücre Döngüsü İnhibitörü	12 ↓	1,6 ↓	0,0337
<i>TP53</i>	Tümör Baskılayıcı	10 ↑	2 ↑	$p > 0,05$
<i>BCL2</i>	Anti-Apoptotik	1,41 ↑	0,45 ↓	$p > 0,05$
<i>BCL2L1</i>	Anti-Apoptotik	5,8 ↑	1,8 ↑	$p > 0,05$
<i>BAX</i>	Pro-Apoptotik	2,33 ↑	0,89 ↓	0,0445

3.4. *A. crassicauda* Zehrinin Plazmit DNA'sı Üzerine Etkisi

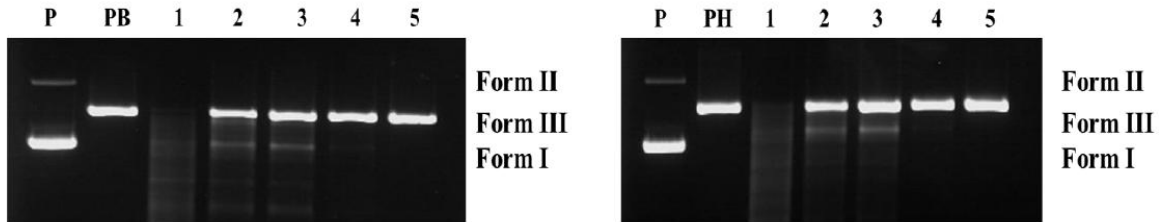
Zehir 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL ve 1,56 µg/mL konsantrasyonlarında DNA ile 24 saat inkubasyona bırakılmış daha sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Etidyum bromür ile boyanarak UV ışığı altında görüntülenmiştir (Şekil 5). P hattı, zehirle muamele edilmemiş DNA'yı, 1 den 5'e kadar olan hatlardaki DNA görüntüsünü göstermektedir. DNA zehir karışımının en yüksek konsantrasyonda DNA'yı tamamen parçaladığı, daha düşük konsantrasyonlar da ise linear DNA oluşmasına neden olduğu dolayısıyla çift zincir kırığına neden olduğu bulunmuştur. *A. crassicauda* zehrinin plazmit DNA'sının konformasyonunda değişikliklere neden olduğunu, yani DNA çift sarmalının kısmen parçalandığını göstermiştir.



Şekil 5. Zehir ile muamele edilen pBR322 plazmit DNA'sı Agaroz jel elektroforezi. (P: pBR322 plazmit DNA, kuyu 1: 25 µg/mL, kuyu 2: 12,5 µg/mL, kuyu 3: 6,25 µg/mL, kuyu 4: 3,12 µg/mL ve kuyu 5: 1,56 µg/mL)

3.5. *Bam*HI ve *Hind*III Enzimiyle Restriksiyon Endonükleaz Reaksiyonu

Restriksiyon endonükleaz kesimi, *A. crassicauda* zehri ve pBR322 plazmit DNA karışımı üzerinde gerçekleştirilmiştir. *Bam*HI ve *Hind*III, DNA'daki fosfodiester bağlarını hidrolize eden restriksiyon endonükleaz enzimleridir. Tanıma bölgeleri *Bam*HI için 5'-G/GATCC-3' ve *Hind*III için 5'-A/AGCTT-3'tür. pBR322 plazmit DNA'sı normalde süper sarmal form I ve açık halkasal form II olarak bulunur. pBR322 plazmit DNA'sı, her iki enzim için de yalnızca bir bağlanma bölgesi içerir ve form I ve form II DNA'sını doğrusal form III DNA'sına dönüştürür. Enzimlerle muamele edildiğinde, akrep zehri enzimin kesim bölgesine bağlı değilse plazmit DNA'sı doğrusal form III DNA'sına dönüşür [22].



Şekil 6. Akrep zehri ile muameleden sonra pBR322 plazmit DNA'sının *Bam*HI ve *Hind*III enzimleriyle restriksiyon endonükleazının sonucu. (P: pBR322 plazmit DNA'sı, PB: *Bam*HI ile muamele, PH: *Hind*III ile muamele, kuyu 1: 25 µg/ml, kuyu 2: 12,5 µg/ml, kuyu 3: 6,25 µg/ml, kuyu 4: 3,12 µg/ml ve kuyu 5: 1,56 µg/ml)

Şekil 6'da görüldüğü gibi, DNA'da her iki restriksiyon endonükleaz enziminin de kısmi kesim yaptığı gözlemlenmiştir, bu da zehrin G/G ve A/A nükleotidlerine bağlandığını göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Akrep zehrinin kanser tedavisinde umut vadeden bir bileşik olarak kullanımı son yıllarda araştırmacıların hedefi hâline gelmiştir. Kanser terapisinin etkinliği, antikanser ilaçların sağlıklı doku hücreleri ve malign hücreler üzerindeki nispi etkilerinin değerlendirilmesiyle ilişkilidir. Kanser hücrelerinde hücre döngüsü düzenlemesi ve apoptotik yollara odaklanmak, kanser tedavisinde ve yeni farmasötik ajanların geliştirilmesinde temel bir yaklaşımı temsil etmektedir. Mevcut literatürde, sınırlı sayıda akrep türünün zehri hematopoitik maligniteler için kemoterapötik bir ajan olarak test edilmiştir. *Buthus martensii* ve *Rhopalurus junceus* türleri kullanılarak fareler üzerinde toksikolojik deneyler yürütülmüştür. Kemirgen ksenograft modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, *B. martensii* akrebinin zehrinin insan gliyomasına karşı kanser karşıtı bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir [23]. Meme kanserli fareler üzerinde gerçekleştirilen *in vivo* bir deneyde, *R. junceus* zehrinin (3,2 mg/kg) ardışık on doz hâlinde intraperitoneal yolla uygulanması, tümör büyümesini inhibe etmiştir. Bu inhibisyon, Ki67 ve CD31 gibi tümör belirteçlerinin ekspresyonundaki azalma ile korelasyon göstermiş olup, zehrin antikarsinojenik etkisini kanıtlamaktadır. [24].

Hücre kültürü çalışmaları, *B. martensii*'nin MDA 435 melanom hücreleri, *B. mathensii* Karsch'ın MCF-7 meme kanseri hücreleri, Tityus discrepans'ın SKBR3 meme kanseri hücreleri ve *Tityus serrulatus*'un servikal kanser hücreleri üzerindeki etkileri gibi çeşitli akrep zehirlerinin anti-tümör etkilerini göstermiştir [25,26]. Zehirlerin etkililiği değişkenlik göstermekte ve etki ettikleri hücre hatları, meme kanseri tiplerinin çeşitliliği nedeniyle farklılık göstermektedir. *A. crassicauda*'yı içeren bazı araştırmalarda, zehrin farmakolojik etkileri ve etki mekanizmaları açıklığa kavuşturulmuştur [27]. *A. crassicauda* zehrinden elde edilen Acra serisi peptitlerin (Acra1, Acra2, Acra3 ve Acra4), özellikle BC3H1 nöroblastoma hücre hattında kanser hücresi proliferasyonunu inhibe edici bir etki gösterdiği gösterilmiştir [28].

Bu çalışmada, MTT testi aracılığıyla belirlenen malign ve sağlıklı hücre canlılığı, önceki çalışmalarla paralel sonuçlar ortaya koymuştur. Hücrelere 24 saat boyunca zehir uygulanması sonucunda üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde IC50 değeri 400 µg/mL olarak bulunurken, sağlıklı hücre hattında istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir toksisite tespit edilmemiştir. En yüksek konsantrasyon (500 µg/mL) meme kanseri hücrelerinin canlılığını %78,37 gibi yüksek bir oranda azaltırken, en düşük konsantrasyon (31,2 µg/mL) %21,02 ile daha sınırlı bir etki ortaya koymuştur. Önemli bir ayırım olarak, sağlıklı Vero hücreleri incelendiğinde, yüksek doz 500 µg/mL yalnızca %21,31'lik bir sitotoksositeye yol açmış; 31,2 µg/mL dozu ise herhangi bir viabilite kaybına neden olmamıştır. Apoptozis ve nekrozun belirlenmesinde kullanılan floresan boyalar, hücre zarındaki fosfatidilserine (PS) bağlanma mekanizmasıyla işlev görmektedir. PS'nin hücre yüzeyine translokasyonu, erken ve ara apoptozis evrelerinin ayırt edici bir biyobelirteci olarak kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızda, Apoptozis/Nekroz test kiti ile yapılan hücre boyama sonucunda, meme kanseri hücrelerinde uygulanan dozlarda apoptozisin meydana geldiği gözlenmiştir. 200 µg/mL ve 400 µg/mL dozlarında akrep zehri ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozis sırasında PS'ye bağlanarak yeşil bir parlaklık yayılmıştır. Zehirle muamele edilen hücrelerde, muamele edilmeyen hücrelere kıyasla apoptotik hücre oluşumları gözlenmiştir. Mitokondriyal membran porlarının açılması nedeniyle mitokondriyal membran bütünlüğünün değişmesi apoptozisde önemli bir belirteçtir. Akrep zehirlerinden elde edilen toksin peptitlerini araştıran bir çalışmada, Hint kara akrebi zehrinden yeni izole edilmiş bir protein olan Bengalin'in lösemi hücreleri (U937 ve K562) üzerindeki pro-apoptotik etkisini incelerken JC-1 floresanında kayda değer bir artış olduğunu bildirmiştir [29,30]. Benzer şekilde, *Odontobuthus doriae* zehrinin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisini incelerken, zehirle 24 saatlik inkübasyondan sonra JC-1 yeşil/kırmızı floresan yoğunluğunda önemli bir artış gözlemlenmiştir; bu, mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir azalmaya işaret etmektedir [9]. Mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi, J-agregatlarının sayısındaki azalmayla gösterildiği gibi apoptozise yol açan, doza bağlı bir membran potansiyelinde azalma olduğunu da ortaya koymuştur. Bazı çalışmalar da, akrep zehirlerinin normal hücreleri korurken kanser hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etkileri olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmalar, akrep zehirlerinin epitel kaynaklı kanser hücreleri üzerinde etkili olduğunu, ancak sağlıklı epitel hücreleri üzerinde etkili olmadığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri akrep zehrine duyarlıyken, sağlıklı epitel hücrelerinde seçici toksisite gözlemlenmiştir [31].

Gen ifadesi değerlendirmelerinde, MDA-MB-231 hücrelerinin zehirle 24 saatlik inkübasyonundan sonra pro-apoptotik genlerin (NOXA, PUMA ve BAX) ifade seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Pro-Apoptotik genler olan PUMA ($p=0,0238$) ve BAX ($p=0,0445$), 24. saatte bazal seviyeye göre sırasıyla 12,50 kat ve 2,33 kat anlamlı artış göstererek mitokondriyal apoptozun erken ve güçlü bir şekilde başlatıldığını kanıtlamıştır. 48 saatlik inkübasyonun ardından, pro-apoptotik genlerin ifadelerinde hem kontrol hem de 24 saatlik inkübasyon dönemlerine kıyasla bir azalma tespit edilmiştir. CASP3'ün ifadesi de 48 saat sonunda 4,7 kat anlamlı derecede azalması ($p=0,0320$) PUMA ve BAX'taki artışa rağmen, hücrenin ölümün son aşamasını mRNA seviyesinde kontrol altında tutmaya çalıştığını düşündürmektedir. Apoptotik yolları ve *Hemiscorpius lepturus* türü akrep zehrinin CT26 (kanser) ve Vero (sağlıklı) hücre hattı üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar, kanser hücrelerinde pro-apoptotik gen ifadelerinde bir artış olduğunu göstermiştir. CT26 hücre hattında, zehrin IC50 değeri 120 µg/mL olarak belirlenmiş ve RT-PCR analizleri bu konsantrasyon kullanılarak yapılmıştır. Zehirle inkübasyondan sonra, BAX, CASP3 ve TP53 genlerinde mRNA ekspresyonunda doza bağlı olarak önemli bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, tümör dokusunda BCL2 mRNA ekspresyonunda önemli bir azalma bulmuşlardır. Bu veriler, *H. lepturus* zehrinin Trp53/Bcl2/Casp3 sinyal yolu üzerinden CT26 hücrelerinde antiproliferatif bir etki gösterdiğini doğrulamaktadır [32]. *R. junceus* zehrinin MDA-MB-231 hücrelerindeki apoptotik yollar üzerindeki etkisi incelendiğinde, TP53, BAX, NOXA, PUMA, CDKN1A ve CASP3 genlerinde aşırı ekspresyon gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu araştırmacılar anti-apoptotik BCL2 ve BCL2L1 genlerinin ekspresyonunda azalma olduğunu da belirtmişlerdir. [33]. *A. crassicauda* ve *Leirus quinquestriatus* zehiri ile MDA-MB-231 hücreleri üzerine yapılan çalışmada, zehire maruz kalan hücrelerde beklenen bir mekanizma olarak hücre döngüsü duraklamasının meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu duraklama, 24 ve 48 saat muamele sonrasında G2/M fazındaki hücre sayısında çarpıcı bir artış ile kendini göstermiştir [34].

Zehrin DNA'ya bağlanma aktivitesi antikanser ilaçları olabilecek ilaç aktivitesi çalışmaları için önemlidir. Zehir kullanımına bağlı gözlenen DNA hasarı, bu zehrin kanser hücre DNA'sında hasara neden olma potansiyelini göstermektedir. Zehir kısmen enzim kesme bölgelerine bağlanarak restriksiyon enziminin doza bağlı bir şekilde DNA'yı kesmesini engellemektedir. Hücresel düzeyde yapılan çalışmalara ek olarak, bu bulgular zehrin toksik etkisini daha da desteklemektedir. DNA etkileşim deneylerinde, MTT testine kıyasla daha düşük zehir dozları kullanılmıştır. Bunun nedeni, daha yüksek konsantrasyonların 25 µg/mL'de bile şiddetli DNA bozulmasına neden olması ve doza bağlı etkilerin gözlenmesini zorlaştırmasıdır. Daha düşük konsantrasyonların kullanılması, zehrin DNA bütünlüğü üzerindeki kademeli etkisinin daha iyi değerlendirilmesini sağlamıştır.

Sonuç olarak, *A. crassicauda* zehrinin üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) belirgin sitotoksik ve pro-apoptotik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Zehir, kanser hücrelerinde hücre canlılığını doza bağımlı olarak azaltmış, mitokondriyal membran potansiyelinde bozulmaya ve apoptotik yolların aktive olmasına neden olmuştur. Buna karşılık, sağlıklı epitel hücrelerinde anlamlı bir toksisite oluşturmadığı da çok önemli başka bir sonuçtur. Ayrıca, gen ekspresyon analizleri pro-apoptotik genlerin (NOXA, PUMA, BAX) artışı ve DNA hasarı ile ilişkili etkileri desteklemektedir. Bulgular, akrep zehrinin seçici sitotoksikite göstermesi nedeniyle potansiyel bir antikanser ajan olabileceğini ortaya koymakta ve bizim bilgimize göre alanda yapılan çok az çalışmadan biridir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında, “*Androctonus crassicauda* zehrinin apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması” isimli yüksek lisans tezinden türetilmiştir. Bu araştırma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin (05/2020-14) proje numarası ile gerçekleştirilmiştir.

YAZARLAR'IN KATKI ORANLARI

Büşra Nur Sabah: Araştırma, Deney sonuçlarının doğruluğunun kontrolü, İçerik analizi, Materyal temini, Makalenin yazımı-Orijinal taslak, Makalenin yazımı- İnceleme ve Düzenleme. **Hatice Mergen:** Kavramlaştırma, Metodoloji, Deney sonuçlarının doğruluğunun kontrolü, Makalenin yazımı- İnceleme ve Düzenleme, Danışman/Kontrolörlük. **Şahin Toprak:** Materyal temini. **Leyla Açık:** Kavramlaştırma, Metodoloji, Deney sonuçlarının doğruluğunun kontrolü, Makalenin yazımı- İnceleme ve Düzenleme, Danışman/Kontrolörlük, Finansman edinimi.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Liang, Y., Dai, X., Chen, J., Zeng, X., Qing, X., Huang, J., & Ruan, X. (2023). Global burden and trends in pre- and post-menopausal gynecological cancer from 1990 to 2019, with projections to 2040: A cross-sectional study. *International Journal of Surgery*, 111(1), 891–903.
- [2] Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108.
- [3] Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193–199.
- [4] Liu, C. C., Yang, H., Zhang, L. L., Zhang, Q., Chen, B., & Wang, Y. (2014). Biotoxins for cancer therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(12), 4753–4758.
- [5] Bozkurt, K. K., Durak, Ö., Çiriş, İ. M., Kapucuoğlu, N., & Devrim, T. (2021). Meme kanserinde moleküler alt tiplerin klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 27(2), 160–165.
- [6] Bildacı, Y. D., Yamaç, D., & Coşkun, U. (2024). Receptor status differences in prognosis for breast cancer. *Gazi Medical Journal*, 35(3), 224-227.
- [7] Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 1–14.
- [8] D'Suze, G., Rosales, A., Salazar, V., & Sevcik, C. (2010). Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon*, 56(8), 1497–1505.
- [9] Zargan, J., Umar, S., Sajad, M., Naime, M., Ali, S., & Khan, H. A. (2011). Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7). *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1748–1756.
- [10] Rapôso, C. (2017). Scorpion and spider venoms in cancer treatment: State of the art, challenges, and perspectives. *Journal of Clinical and Translational Research*, 3(2), 233–249.
- [11] Díaz-García, A., Garrido, Á., Ruiz-Fuentes, J. L., Hermosilla, T., & Varela, D. (2025). *Rhopalurus junceus* scorpion venom induces G2/M cell cycle arrest and apoptotic cell death in human non-small lung cancer cell lines. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 31, e20240035.
- [12] Luna-Ramirez, K., Quintero-Hernandez, V., Vargas-Jaimes, L., Batista, C. V., Winkel, K. D., & Possani, L. D. (2013). Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon*, 63, 44–54.
- [13] Amorim, F. G., Longhim, H. T., Cologna, C. T., Degueudre, M., Pauw, E., Quinton, L., & Arantes, E. C. (2019). Proteome of fraction from *Tityus serrulatus* venom reveals new enzymes and toxins. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 25, e148218.
- [14] Zeng, X. C., Luo, F., & Li, W. X. (2006). Molecular dissection of venom from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii*: Identification and characterization of four novel disulfide-bridged venom peptides. *Peptides*, 27(7), 1745–1754.
- [15] Özkan, Ö., & Karaer, Z. (2003). Türkiye akrepleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 60(2), 55–62.

- [16] Çakmak, A. (2019). *Androctonus crassicauda* toksin SCX8 ile asetilkolin nikotinik reseptör etkileşmesinde GXXXG motifinin rolü. *Bozok Tıp Dergisi*, 9(1), 134–138.
- [17] Al-Asmari, A. K., Riyasdeen, A., Abbasmanthiri, R., Arshaduddin, M., & Al-Harhi, F. A. (2016). Scorpion (*Androctonus bicolor*) venom exhibits cytotoxicity and induces cell cycle arrest and apoptosis in breast and colorectal cancer cell lines. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(5), 537–543.
- [18] Sabah, B. N. (2022). *Androctonus crassicauda* zehirinin apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması (Yüksek lisans tezi). Hacettepe Üniversitesi.
- [19] Frion-Herrera, Y., Diaz-Garcia, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodriguez-Sanchez, H., & Sforcin, J. M. (2015). Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(10), 1448–1456.
- [20] Binici, A., Okumuş, A., Yakut, M., Elmas, G., Kılıç, Z., Koyunoğlu, D., & Şimşek, H. (2022). Comparative syntheses and spectral properties of multiheterocyclic cyclotetraphosphazenes: Antituberculosis and antimicrobial activity and DNA interaction studies. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 197(1), 18–29.
- [21] Dilek Çelik, G., Disli, A., Oner, Y., & Acik, L. (2013). Synthesis of some novel amino and thiotetrazole purine derivatives and investigation of their antimicrobial activity and DNA interactions. *Medicinal Chemistry Research*, 22, 1470–1479.
- [22] Tari, Ö., Gümüş, F., Açıık, L., & Aydın, B. (2017). Synthesis, characterization and DNA binding studies of platinum (II) complexes with benzimidazole derivative ligands. *Bioorganic Chemistry*, 74, 272–283.
- [23] Wang, W. X., & Ji, Y. H. (2005). Scorpion venom induces glioma cell apoptosis *in vivo* and inhibits glioma tumor growth *in vitro*. *Journal of Neuro-Oncology*, 73(1), 1–7.
- [24] Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J. L., Frion-Herrera, Y., Yglesias-Rivera, A., Garlobo, Y. R., Sanchez, H. R., & Lopez Fuentes, L. X. (2019). *Rhopalurus junceus* scorpion venom induces antitumor effect *in vitro* and *in vivo* against a murine mammary adenocarcinoma model. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(7), 759–765.
- [25] Bernardes-Oliveira, E., Farias, K. J. S., Gomes, D. L., Araújo, J. M. G., Silva, W. D., Rocha, H. A. O., & Crispim, J. C. O. (2019). *Tityus serrulatus* scorpion venom induces apoptosis in cervical cancer cell lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 5131042.
- [26] Yang, J., Li, X., Dong, W., Kong, T., Song, H., Zheng, X., & Liu, G. (2000). Effect of anticancer polypeptide from *Buthus martensii* venom on immune function in H22-bearing mice. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 25(12), 736–739.
- [27] Altinkurt, O., & Altan, M. (1980). Urfa yöresi akrep (*Androctonus crassicauda*) zehirinin deney hayvanlarındaki farmakolojik etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Mecmuası*, 10, 41–48.
- [28] Caliskan, F., Quintero-Hernandez, V., Restano-Cassulini, R., Coronas-Valderrama, F. I., Corzo, G., & Possani, L. D. (2013). Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na⁺-channel alpha-type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* venom. *Biochimie*, 95(6), 1216–1222.
- [29] Gupta, S. D., Gomes, A., Debnath, A., Saha, A., & Gomes, A. (2010). Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin. *Chemico-Biological Interactions*, 183(2), 293–303.
- [30] Ju, H. Q., Wang, S. X., Xiang, Y. F., Liu, Z., Liu, J. Y., Chen, Z. P., & Xing, G. W. (2011). BJ-B11 induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cells. *European Journal of Pharmacology*, 666(1–3), 26–34.
- [31] Díaz-García, A., Morier-Díaz, L., Frión-Herrera, Y., Rodríguez-Sánchez, H., Caballero-Lorenzo, Y., Mendoza-Llanes, D., Riquenes-Garlobo, Y., & Fraga-Castro, J. (2013). *In vitro* anticancer effect of *Rhopalurus junceus* venom. *Journal of Venom Research*, 4, 5–12.
- [32] Moradi, M., Najafi, R., Amini, R., Solgi, R., Tanzadehpanah, H., Esfahani, A. M., & Saidijam, M. (2019). Apoptotic pathway of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom. *Cell Biology and Toxicology*, 35(4), 373–385.
- [33] Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J. L., Rodríguez-Sánchez, H., & Fraga-Castro, J. (2017). *Rhopalurus junceus* scorpion venom induces apoptosis in MDA-MB-231 cells. *Journal of Venom Research*, 8, 9–13.
- [34] Al-Asmari, A. K., Riyasdeen, A., & Islam, M. (2018). Scorpion venom causes apoptosis by increasing reactive oxygen species. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 23, 1-10.