

**ARASTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE**

***Androctonus crassicauda* HAM VENOMUNDAN BC3H1 HÜCRELERİNE  
SİTOTOKSİK ETKİLİ Ac8, Ac9 VE Ac10 PEPTİDLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

**Figen ÇALIŞKAN<sup>1</sup>, Hülya SİVAS<sup>2</sup>, Yalçın ŞAHİN<sup>1</sup>**

**ÖZ**

Akrepler çok sayıda biyoaktif bileşen içeren venomlarını avlanma ya da savunma amaçlı kullanan arahnid grubundan canlılardır. Türkiye’de ölümcül zehirlenmelere neden olan iki tür *Leiurus quinquestriatus* ve *Androctonus crassicauda* olup bunlar Buthidae familyasına aittir. Bu çalışmada, *A. crassicauda* venomu içerisinde bulunan peptid bileşenlerin saflaştırılması ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, Şanlıurfa ilinden toplanan akrepler laboratuvar koşullarında beslenmiş ve venomları elektrostimülasyon yöntemiyle sağılmıştır. Venomun içerdiği peptid toksinler Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile saflaştırılmıştır. Peptidlerin hücre canlılığına etkisi BC3H1 fare beyin tümörü hücrelerinde tetrazolyum tuzu testi (MTT) ile araştırılmış ve daha sonra etkin peptidlerin kütle spektrometresinde molekül ağırlıkları belirlenmiştir. HPLC analizi ile venomda toplam 15 adet majör fraksiyon gözlenmiştir. Bunlardan Ac8, Ac9 ve Ac10 olarak adlandırılan peptidlerin BC3H1 hücreleri için sitotoksik olduğu bulunmuş ve Ac8 için IC50 değeri 47 µg/ml, Ac9 için 72 µg/ml ve Ac10 için 40 µg/ml olarak belirlenmiştir. Moleküler ağırlıkları ise Ac8 için 16356 Da, Ac9 için 7422 Da ve Ac10 için 16328 Da olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile ilk kez, *A. crassicauda* ham venomundan sitotoksik etkili yeni peptidler saflaştırılmıştır. Bu peptidler anti-tümör potansiyele sahip olabilirler ve bu nedenle çalışılmalarının yararlı olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler :** *A. crassicauda*, Sitotoksisite, MTT, BC3H1 hücreleri, Venom.

**PURIFICATION OF Ac8, Ac9 AND Ac10 PEPTIDES FROM *Androctonus crassicauda*  
CRUDE VENOM WITH CYTOTOXIC EFFECT ON BC3H1 CELLS**

**ABSTRACT**

Scorpions are arachnids containing many bioactive constituents which they use it for hunting or defense. *Leiurus quinquestriatus* and *Androctonus crassicauda* which causes lethal poisoning in Turkey are two species belonging to Buthidae family. In this study, purification and cytotoxicity of peptide constituents of *A. crassicauda* venom was investigated. For this purpose, scorpions collected from Şanlıurfa province were housed in the laboratory condition and their venoms were collected by electro stimulation method. Peptide toxins of the venom were isolated by High Performance Liquid Chromatograph (HPLC). Effects of the peptides on the viability of BC3H1 mouse brain tumor cells were examined by the assay of tetrazolium salt (MTT) and then the molecular weight of the active molecules were determined by mass spectrometer. Total 15 major fractions were observed by HPLC analysis. Peptides named as Ac8, Ac9 and Ac10 were found to be cytotoxic for BC3H1 cells and IC50 value was 47 µg/ml for Ac8, 72 µg/ml for Ac9 and 40 µg/ml for Ac10. Molecular weights of the peptides were also determined as 16356 Da for Ac8, 7422 Da for Ac9 and 16328 Da for Ac10. By the present study, the new peptides with cytotoxic activity were isolated from the crude venom of *A. crassicauda* the first time. We suggest that these peptides may have a potential as antitumor substances and therefore it may be useful to study on them.

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 26480, Eskişehir.  
Eskişehir. Tel: 239 37 50 / 2727, Fax No: 239 35 70, e-posta: fcalis@ogu.edu.tr.

<sup>2</sup>Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 26470, Eskişehir.

**Keywords:** *A. crassicauda*, Cytotoxicity, MTT, BC3H1 cells, Venom.

## 1. GİRİŞ

Akrepler evrimsel süreçlerinde, çok sayıda biyoaktif bileşenleri venomlarında bir araya getirerek avlarını yakalamada ya da kendilerini savunmada kullanan arachnid grubudur. Akrep venomları insanlara karşı kullanıldığında inflamasyon, doku nekrozu, alerjik reaksiyonlar, anafilaksi, kusma, kasılma ve merkezi sinir sistemi hasarı gibi nörotoksik etkilere ve ayrıca ölümlere neden olmaktadır (Gurevitz vd., 2007). Akrep venomlarının öldürücü etkisine karşılık, ilk kez 1578'de Shi-Zhen Li tarafından yazılan "Tıbbi Materyallerin Kısa Özeti" adlı Çin farmakoloji kitabında, akrep venomlarının farmakolojik özellik ve iyileştirici etkileri detaylı olarak tanımlanmıştır. Akrebin tümü, kuyruğu ya da ekstratlarının felç, epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde, çeşitli ağrıların azaltılmasında ve sinirlerin yatıştırılmasında kullanıldığı bilinmektedir (Xiong vd., 1999; Mortari vd., 2007).

Günümüzde, memeliler için toksik olmayan akrep venom peptidlerinin tedavi amaçlı kullanımları araştırılmaktadır. *Leiurus quinquestriatus* türü akrep venomunun insan embriyonik böbrek hücreleri ile fare miyoblast hücreleri üzerinde apoptotik ve nekrotik etkiye sahip olduğunu belirlenmiştir (Omran, 2003). Bir başka çalışmada, Wang ve Ji (2005) ise, *Buthus martensii* türü akrep venomunun malignan glioma kültür hücrelerinde iyon kanallarını etkileme yolu ile apoptozisi uyardığını göstermiştir. Aynı venomdan saflaştırılan, rBmK Cta peptid toksininin insan glioma hücrelerinde çoğalmayı engellediği gözlenmiş ve beyin kanseri için tedavi edici özelliği olduğu öne sürülmüştür (Fu vd., 2007). Ayrıca *Heterometrus bengalensis* türü ham akrep venomunun kanserli insan kan hücrelerinde apoptozisi uyatarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği belirlenmiştir (Gupta vd., 2007). Diğer yandan farklı akrep türlerinin venomlarından insektisit, analjezik (Kozlov vd., 2000; Xiong vd., 1999), anti-epileptik (Wang vd., 2001), anti-malaryal ve anti-mikrobiyal (Conde vd., 2000; Torres-Larios vd., 2000; Corzo vd., 2001; Moerman vd., 2002) etkiye sahip olan bileşenler de izole edilmiştir. Akrep toksinleri özgünlük ve yüksek etkinlikleri nedeni ile iyon kanal fonksiyonunu gösteren çeşitli reseptör proteinlerin tanımlanması için kullanılan farmakolojik araçlardır (Plessis vd., 2008).

Türkiye akrep faunası 4 familyaya ait 16 tür olarak bilinmektedir. *Androctonus crassicauda* türü bulardan Buthidae familyasına ait 9 türden bir tanesidir (Karataş vd., 2005). Anadolu pek

çok hayvan ve bitki çeşitliliğine sahip olduğu kadar venom çeşitliliğine de sahip olmasına karşın, ülkemizde hayvan venom peptidleri ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Ülkemizde sadece ölümcül zehirlenmelerde başrolü oynayan *A. crassicauda* türü akrep venomunun biyokimyasal karakterizasyonu üzerine yapılan ilk çalışma grubumuz tarafından yapılmış olup, Acra1 ve Acra2 adı verilen iki toksin bileşenin kimyasal yapısı aydınlatılmıştır (Caliskan vd., 2006).

Bu çalışmanın amacı, *A. crassicauda* türü akrep venomu içerisinde bulunan önemli farmakolojik bileşenlerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, akreplerden elektrostimulasyon ile venom elde edilmiş ve Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile peptid toksinler saflaştırılmıştır. Peptidlerin hücre canlılığına etkisi tetrazolyum tuzu testi (MTT) ile araştırılmıştır. Etkin peptidlerin kütle spektrometresinde molekül ağırlığı belirlenmiştir. Bu çalışmada ilk kez, *A. crassicauda* ham venomunda bulunan ve Ac8, Ac9 ve Ac10 olarak adlandırılan peptidler saflaştırılmış ve BC3H1 hücreleri üzerinde canlılığa etkili olduğu bulunmuştur.

## 2. DENEYSEL YÖNTEM

### 2.1 Akreplerin Toplanması ve Bakımı

Akrepler ultraviyole ışığı (UV) altında verdikleri ışımaya yardımı ile Şanlıurfa ili ve çevre ilçelerinden geceleri toplanmış ve plastik kutularda 23–25 °C'de, doğal havalandırmalı Venom Araştırma Laboratuvarında çalışmalar süresince canlı olarak saklanmıştır. Akrepler haftalık olarak *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvaları ile beslenmiştir (Gopalakrishnakone vd., 1995).

### 2.2 Venomun Eldesi

Ham venom, Plessis (2005)'den modifiye edilmiş elektrositumulasyonla sağma yöntemi ile toplanmıştır. Elektrostimulasyon ile 20 volt'luk akım akrep kuyruğuna iki elektrot kullanılarak uygulanmıştır. İşlem süresince, akrep venomları mikrosantrifüj tüpleri içerisinde toplanmıştır. Elde edilen ham venom distile su içerisinde çözülerek, 15 dakika süreyle 4 °C'de 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında peptid toksinleri içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve içerdiği peptid miktarı 280 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. Peptidler vakum kurutucuda kurutulmuş ve -20 °C'de saklanmıştır (Possani vd., 1980; Caliskan, vd., 2006).

### 2.3 Ham Venomun HPLC'de Saflaştırılması ve Peptid İzolasyonu

Ham venom, HPLC'de (SCHIMADZU, SPD-M20A DAD) C18 ters-faz analitik protein-peptid kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır. Peptidler 1 ml/dak. akış hızında, 60 dak. süresince 230 ve 280 nm'de izlenerek ayırım gerçekleştirilmiştir. Ayırımlar sırasında hareketli faz doğrusal gradient olarak uygulanmış ve hareketli faz olarak A ve B ile tanımlanan iki farklı çözelti kullanılmıştır. Tampon A çözeltisi; % 0.12 derişimli trifloroasetik asitin sudaki çözeltisi, Tampon B çözeltisi; % 0.10 derişimli trifloroasetik asitin asetonitril içindeki çözeltisidir. HPLC'de ayrılan bileşenler kolondaki alıkonma sürelerine göre ayrı tüplerin içine toplanmıştır (Caliskan vd., 2006).

### 2.4 Sitotoksik Etkinin Tetrazolyum Tuzu (MTT) Testi ile Belirlenmesi

BC3H1 fare beyin tümörü hücreleri %10 (v/v) fetal sıgır serumu, penisilin/streptomisin (100 ünite/ml) ve 2 mM L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium besiyeri içerisinde, 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda, atmosfer nemi altında büyütülmüştür (Fresney, 2000).

Venom bileşenlerinin sitotoksik etkisi sarı renkli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) tuzunun mitokondriyal enzimler tarafından mor formazan kristallerine indirilmesi prensibine dayanan bir test ile araştırılmıştır (Mossman, 1983). Bunun için, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuğa 3.5 x 10<sup>3</sup> hücre/100 µl olacak şekilde hücreler ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Önce bir ön çalışma ile 0.1-1-10-100 µg/ml olmak üzere geniş aralıktaki peptid dozlarının hücrelerin canlılığına olan etkisi 24 ve 48 saat sürelerle araştırılmıştır. Etkinin 10 µg/ml üzeri dozlarda olduğunu belirlenmiş ve bu nedenle peptidlerin 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 75 µg/ml dozları tüm deneyler boyunca test edilmiştir. Belirlenen dozlarla inkübasyona bırakılan hücreler ters-faz mikroskopu ile görüntüledikten sonra kuyucuklardan besi yerleri uzaklaştırılmış ve 100 µL % 20 MTT (5 mg/ml) içerecek şekilde taze besi yeri eklenerek 4 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Ardından besi yeri ortamdan uzaklaştırılmış ve MTT'nin oluşturduğu kristaller 200 µl dimetilsülfoksit ile çözüldükten sonra 570 nm'de ELISA plaka okuyucuda (EL<sub>x</sub>800) optik dansite (absorbans) okunmuştur (Hu vd., 2006).

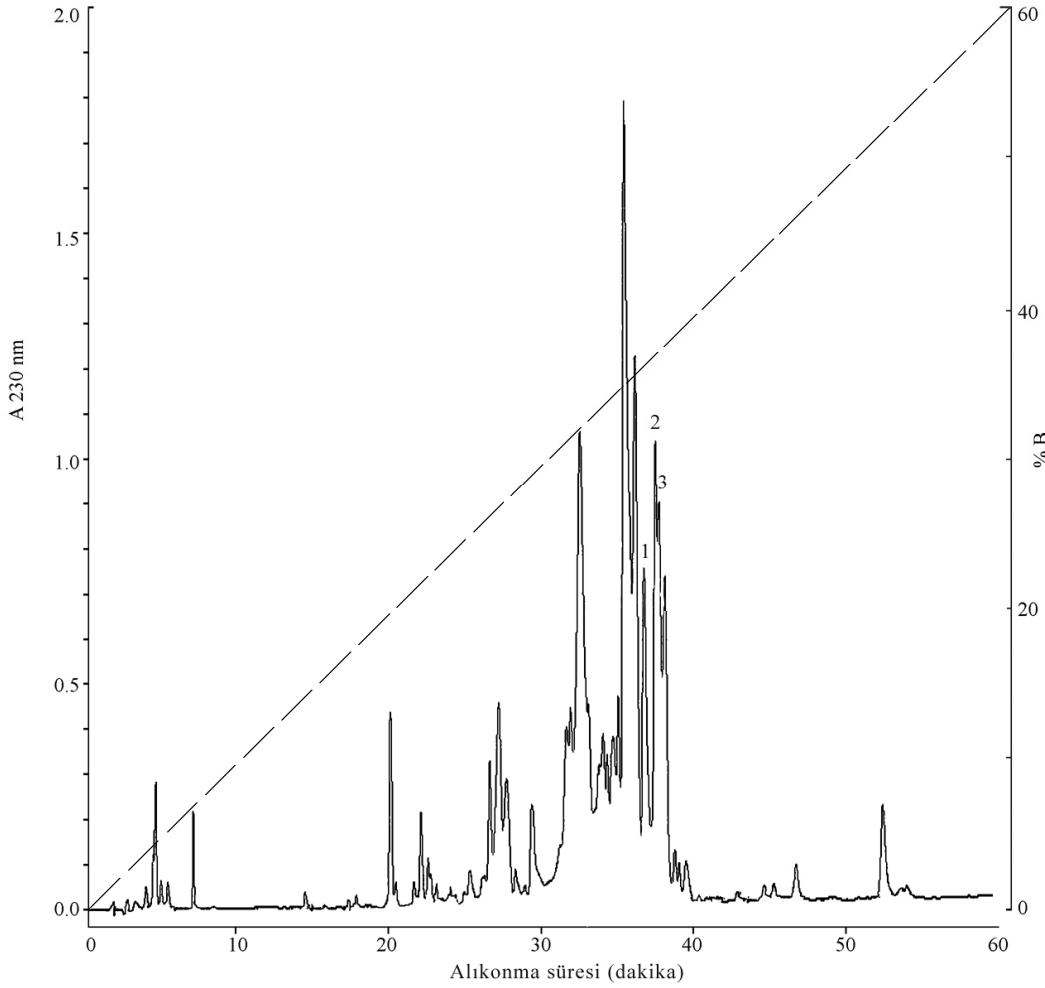
### 2.5 Kütle Spektrometresi ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

HPLC'den alınan peptidler, 0.5 - 1.0 µg olarak % 1 asetik asit içeren % 50 derişimli asetonitril çözeltisinde seyreltilmiş ve 5 µl olarak kütle spektrometresine uygulanmıştır. NanoESI kaynağı 1.60 kV ve kapiler sıcaklık 130 °C olarak ayarlanmıştır. Enstrüman kontrolü, verilerin alınması ve analizi üretici firma tarafından sağlanan Xcalibur yazılımı (sürüm 1.4) ile gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometresi verileri Tune Plus program modülü ile sağlanan gerçek zamanlı görüntüleme ile pozitif iyon modunda toplanmıştır (Diego-Garcia vd., 2007).

## 3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Akrep venomları nörotoksik peptidler olarak adlandırılan birçok küçük proteinler içermektedir (Bosmans ve Tytgat, 2007, Plessis vd., 2008). Bir akrep türünün venomunda 100'den fazla peptid yapısında olan bileşenlerin bulunabileceği proteomik analizler ile açıklanmıştır (Delepierre vd., 1999).

*A. crassicauda* ham venomunda proteomik analizler ile molekül ağırlıkları 267-44541 Da arasında değişen en az 80'in üzerinde farklı peptidin var olduğu belirlenmiştir (Caliskan vd., 2006). *A. crassicauda* ham venomunun HPLC sonrası alınan kromatografik profili Şekil 1 ile gösterilmektedir. Görüldüğü gibi, ham venom içerisindeki miktarına bağlı olarak değişen absorbans değerlerinde birçok fraksiyon bulunmaktadır. Ham venomda bulunan 15 majör bileşenin bir ön çalışma ile BC3H1 hücreleri canlılığı üzerine olan toksik etkileri araştırılmıştır. Beş etkili bileşenden 37.0 (1), 37.3 (2) ve 37.7 (3) dak. alıkonma süresi ile toplanan üç fraksiyon seçilerek saflaştırma için yeniden HPLC'de yürütülmüş ve kromatogramları Şekil 2 A, B ve C'deki gibi elde edilmiştir. Fraksiyonların saf olarak elde edilmesi amacı ile fraksiyonlar 600 nm ve üzerini içerecek şekilde HPLC'den geri toplanmıştır. Fraksiyonların kütle spektrometresinden alınan spektrumlarına göre; 37.0 dak. alıkonma süreli fraksiyon için molekül ağırlığı 16356 Da, 37.3 alıkonma süreli fraksiyon için molekül ağırlığı 7422 Da ve 37.7 dak. alıkonma süreli fraksiyon için molekül ağırlığı 16328 Da olarak belirlenmiştir. Ham venom ayırımında 37.0, 37.3 ve 37.7 dak. alıkonma süresi ile toplanan peptidler saf olarak elde edildikleri için sırası ile; Ac8, Ac9 ve Ac10 olarak adlandırılmıştır.

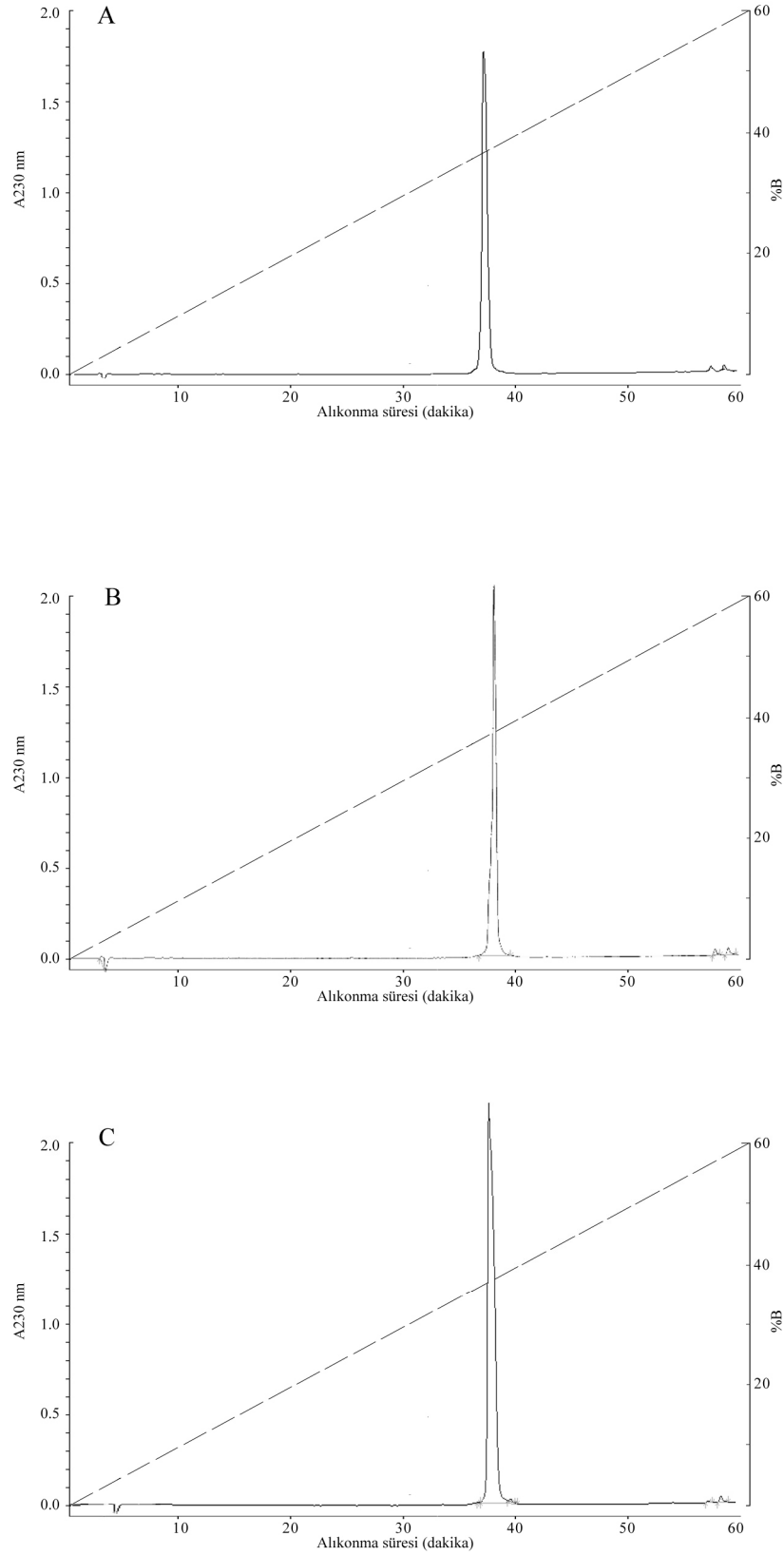


Şekil 1. *A. crassicauda* ham venomu kromatogramı (37.0, 37.3 ve 37.7 alıkönme süreli fraksiyonlar sırası ile 1, 2 ve 3 olarak gösterilmiştir).

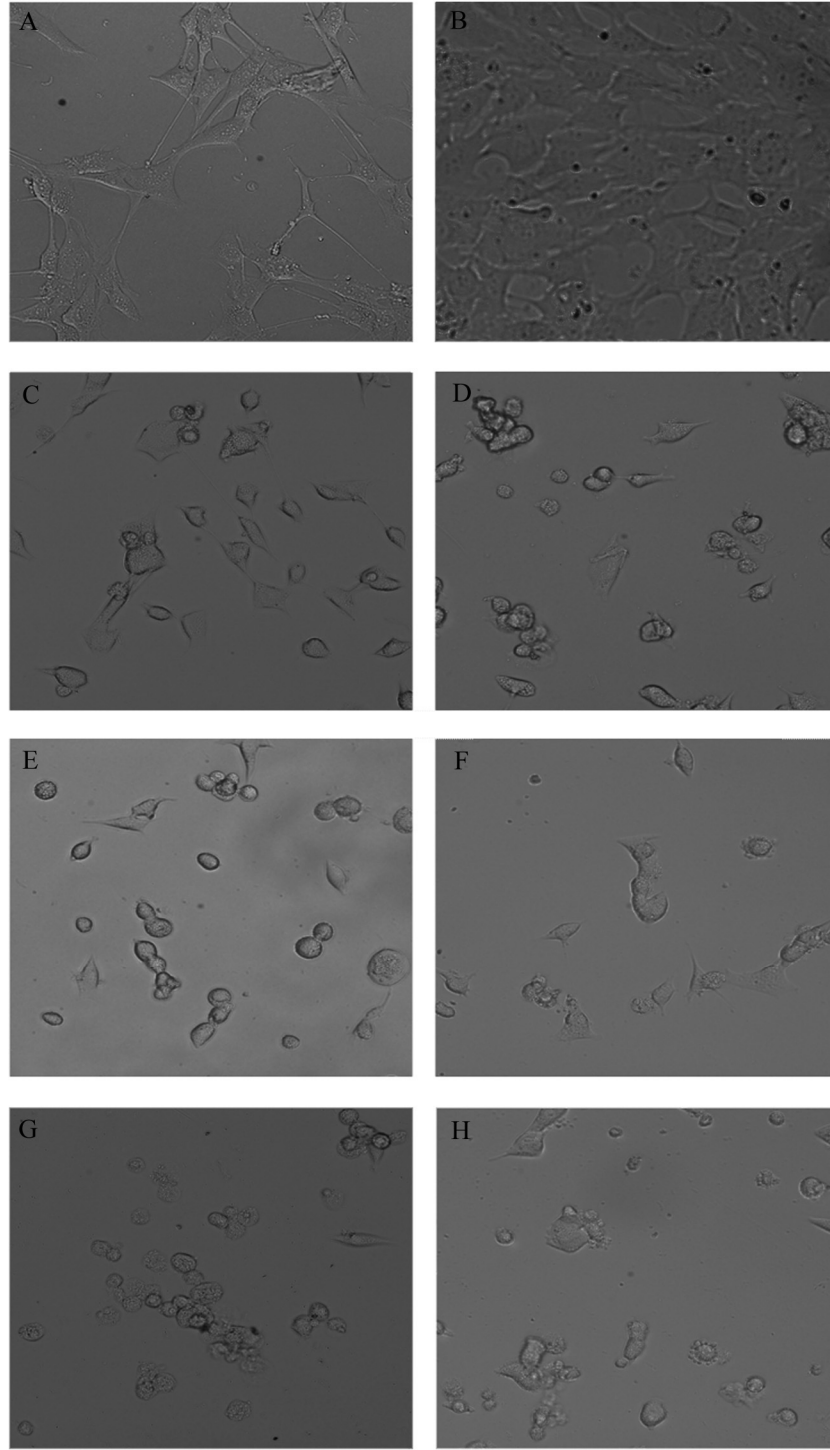
Saflaştırılan Ac8, Ac9 ve Ac10 peptidlerinin olası sitotoksik etkileri BC3H1 hücrelerinde MTT yöntemiyle test edilmiştir. Peptidlerin 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 75 µg/ml içeren dozlarına 24 ve 48 saat maruz kalan hücreler, hemen MTT deneyine geçilmeden önce ters-faz mikroskopunda hala canlıyken morfolojik olarak görüntülenmiştir. Canlılık durumları her bir deney aşamasından önce belirlenmiştir, ancak önemli morfolojik değişiklik gözlenen 50 µg/ml dozundaki peptidlerle muamele edilmiş hücrelerin görüntüleri Şekil 3'de verilmiştir. Görüldüğü gibi, normal hücreler tipik fibroblast benzeri morfolojiye sahipken peptidlere maruz kalan hücreler daha yuvarlak bir şekil almışlardır. Gözlenen yuvarlak morfoloji muhtemelen hücrelerin yüzey ile bağlantılarının zayıflamış olduğunu göstermektedir. Bazıları nekrotik hücre görünümünde daha şişkin ve bazıları ise apoptotik hücre görünümünde daha küçük olarak

gözlenmektedir. Ayrıca hücrelerin sitoplazmalarının da, koful benzeri yapılarda bir artış dikkati çekmektedir. Gözlenen morfolojik değişimlerin her iki inkübasyon süresi içinde de benzer olduğu belirlenmiştir. Özellikle Ac10 diğerlerinden farklı bir etki göstermiş ve hücreler 24 ve 48 saat sonlarında belirgin bir şekilde apoptotik tomurcuklanmalar oluşturmuştur (Şekil 3 G ve H).

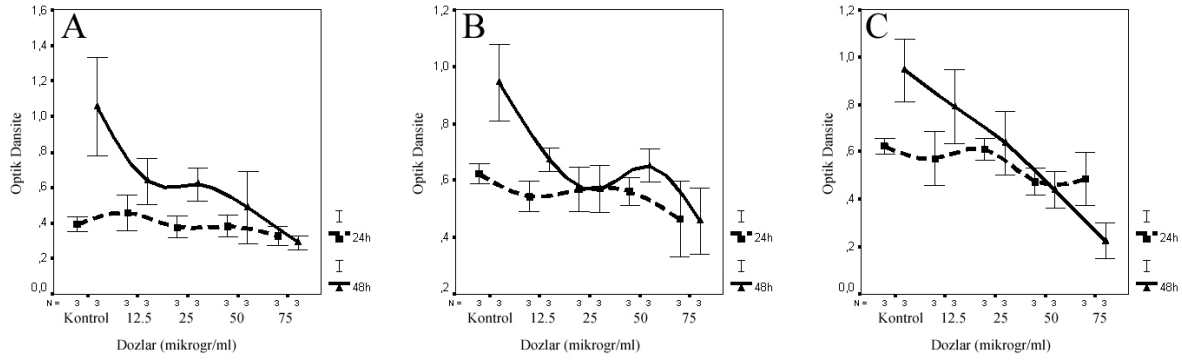
Peptidlerin BC3H1 hücre canlılığı üzerine olan sitotoksik etkisini araştırmak için yapılan MTT testi sonuçları Şekil 4 A, B ve C ile gösterilmektedir. 48 saat inkübasyondan sonra venom bileşenleri hücrelerin canlılığı üzerine oldukça etkili bulunmuştur.



Şekil 2. Ham venomdan saflaştırılan 37.0, 37.3 ve 37.7 dakika alıkonna süreli fraksiyonların HPLC'de aynı ortamda yeniden yürütülmesi ile alınan ters-faz kromatogramları. A) 37.0, B) 37.3 ve C)37.7 dakika alıkonna süresine ait kromatogramları göstermektedir.



Şekil 3. BC3H1 hücrelerinin Ac8, Ac9 ve Ac10 peptidleri ile (50 µg/ml) 24 ve 48 saat inkübasyonları sonucundaki morfolojilerinin terz-faz mikroskobu ile görüntüleri. Kontrol hücreler A) 24 saat, B) 48 saat; Ac8 ile inkübe edilen hücreler C) 24 saat D) 48 saat; Ac9 ile inkübe edilen hücreler E) 24 saat F) 48 saat; Ac10 ile inkübe edilen hücreler G) 24 saat H) 48 saat. Büyütme: 400X.



Şekil 4. BC3H1 hücrelerinin peptidlerin artan dozları ile 24 ve 48 saat inkübasyonları sonucundaki 3 paralel çalışmanın (N=3) canlılık üzerine etkisi. A) Ac8 peptidi, B) Ac9 peptidi ve C) Ac10 peptidine ait MTT testi sonuçları.

Sırasıyla en etkili Ac10 için IC50 değeri 40 µg/ml, Ac8 için 47 µg/ml ve Ac9 için 72 µg/ml olarak belirlenmiştir. Her üç peptidin hücre canlılığına etkisi doza bağlı olarak gözlenmektedir. Peptidler ile hücrelerin 24 saat inkübasyonlarında 48 saate göre çok hafif sitotoksik etki gözlenmiştir. MTT testi ile 48 saat sonrasında bileşenlerin canlılık üzerine etkisi, hücre morfolojisi üzerine olan etkiler ile paralellik göstermektedir. Fakat 24 saat sonra peptidlerin sitotoksik etkisi zayıf olmasına rağmen hücreler morfolojik olarak 48 saate benzer bir şekilde etkilenmişlerdir. Bu sonuçlar, 24 saat sonunda hücrelerin morfolojik olarak etkilendiklerini, ancak hala canlılıklarını koruduklarını göstermektedir. Venom proteinlerinin elektroforetik, toksik ve enzimatik olarak stabilitelelerini uzun süre korudukları bilinmektedir (Munekiyo ve Mackessy, 1998). Ayrıca venomlarda bulunan enzimlerin aktif hale geçmeleri için sulu çözeltilerinde uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaç duydukları da bilinmektedir (Almeida vd., 2002). Bu çalışmada da benzer şekilde sitotoksik etkinin 48 saat sonrasında daha etkin olması, peptidlerin ihtiyaç duyduğu aktivasyon süreleri ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmalarımız sonucu Ac8, Ac9 ve Ac10 peptidlerinin BC3H1 hücrelerinin canlılığı üzerine önemli derecede etkili olduğu bulunmuştur. Önceki çalışmalarımızda, HPLC'den 30. ve 40. dakikalar arasında toplanan fraksiyonlar farelere enjekte edilmiş ve olası öldürücü etkisi test edilmiştir. Ancak, alıkönme süreleri Ac8, Ac9 ve Ac10'e karşılık gelen fraksiyonlarda farelerde öldürücü etkiye rastlanmamıştır (Caliskan vd., 2006). Bu çalışmada kullanılan BC3H1 hücreleri beyin

tümörü hücreleridir ve memelilerde öldürücü etkisi olmayan bu peptidler hücrelerin büyümesini engellemektedir. Günümüz araştırmaları, akrep venomlarında bulunan çeşitli peptidlerin apoptozu indükleyerek, nekroza neden olarak ya da lizis yolu ile hücre çoğalmasını durdurduğunu göstermektedir. Ac8, Ac9 ve Ac10 peptidinin BC3H1 hücreleri üzerindeki canlılığı olan etkisi mekanizması henüz bilinmemektedir. Ac8 ve Ac10 peptidlerinin sırası ile 16356 Da ve 16328 Da gibi yüksek molekül ağırlıkları ile saf olarak elde edilmesi peptidlerin heterodimerik peptidler olabileceğini göstermektedir. Örneğin, LVP1, *Buthus occitanus tunetanus* türü akrep venomundan saflaştırılan lipolitik aktiviteli heterodimerik bir peptiddir (Soudani vd., 2005). Bu amaçla Ac8 ve Ac10 peptidlerinin birincil yapısı kısmen araştırılmış ve heterodimerik peptid oldukları belirlenmiştir (Çalışkan, 2008). Ac8 ve Ac10 peptidlerinin hücre zarı üzerinde diğer heterodimerik peptidlere benzer etkilerinin olabileceği düşünülmektedir. Başta Ac10 olmak üzere tüm peptidlerin sitotoksik etki mekanizmasının nekrotik yolla mı yoksa apoptotik mekanizma ile mi olduğunun araştırılması çok yararlı olacaktır.

Sonuç olarak, Anadolu'nun biyolojik değerleri içinde yer alan *A. crassicauda* türü akrebi ham venomundan ilk kez memelilerde toksik olmayan ancak *in vitro* koşullarda BC3H1 kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkili peptidler saflaştırılmış, molekül ağırlıkları belirlenmiş ve Ac8, Ac9 ve Ac10 olarak adlandırılmıştır. Bu çalışma, Türkiye akrep venomlarının araştırılması için bir başlangıç çalışması olup, toksin peptidlerin daha ileri

seviyelerde araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu peptidlerin potansiyel anti-tümör maddeler olabileceği düşünülmekte ve çeşitli kanser hücrelerinde biyokimyasal ve farmakolojik araştırmalarına devam edilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan akreplerin toplanmasındaki destekleri için; Dr. Hakan Çalışkan ve Dr. D. Ümit Şirin'e, kütle spektrometre çalışmalarındaki desteği için Dr. Fernando Zamudio'ya teşekkür ederiz. Bu çalışma, Dr. Figen Çalışkan'ın doktora tez çalışmasından alınmış olup; Prof. Dr. Yalçın ŞAHİN yürütücülüğündeki TÜBİTAK 106T527 nolu proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Bosmans, F. ve Tytgat, J. (2007). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion  $\alpha$ -toxins. *Toxicon* 49, 142-158.
- Caliskan, F., Garcia, B.I., Coronas, F.I.V., Batista, C.V.F., Zamudio, F.Z. ve Possani, L.D. (2006). Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: Peptides and genes. *Toxicon* 48, 12-22.
- Conde, R., Zamudio, F., Rodriguez, M.H. ve Possani, L.D. (2000). Scorpine, an antimalaria and anti-bacterial agent from scorpion venom. *FEBS Letters* 471, 165-168.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K.J., He, W., Norton, R.S. ve Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal* 359, 35-45.
- Çalışkan, F. (2008). Doktora tezi, *Androctonus crassicauda* türü akrep venomundan peptid toksinlerin saflaştırılması, gen klonlanması ve hücre kültüründe biyokimyasal etkilerinin araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Delepierre, M., Chlufour, A.P., Boisbouvier, J. ve Possani, L.D. (1999). Pi7, a orphan peptide from the scorpion *Pandinus imperator*: A  $^1\text{H-NMR}$  analysis using Nano-NMR probe. *Biochemistry* 38, 16756-16765.
- Diego-Garcia, E., Schwartz, E.F., D'Suze, G., Gonzales, S.A.R., Batista, C.V.F., Garcia, B.I., de La Vega, R.C.R. ve Possani, L.D. (2007). Wide phylogenetic distribution of scorpine and long-chain  $\beta$ -KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of "orphan" components. *Peptides* 28, 31-37.
- Fu, Y.J., Yin, L.T., Liang, A.H., Zhang, C.F., Wang, W., Chai, B.F., Yang, J.Y. ve Fan, X.J. (2007). Therapeutic potential of chlototoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas. *Neuroscience Letters* 412, 62-67.
- Fresney, R.I. (2000). Culture of animal cells a manual of basic technique, 4th Edition, ISBN 0-471-34889-9, ss. 89-104, Wiley-Liss, USA.
- Gao, L., Shan, B., Chen, J., Liu, J., Song, D. ve Zhu, B. (2005). Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 26 (3), 369-376.
- Gao, L., Yu, S., Wu, Y. and Shan, B. (2007). Effect of spider venom on cell apoptosis and necrosis rates in MCF-7 cells. *DNA and Cell Biology* 26(79), 485-489.
- Gopalakrishnakone, P., Cheah, J. ve Gwee, M.C.E. (1995). Black scorpion (*Heterometrus longimanus*) as a laboratory animal maintenance of a colony of scorpion for milking of venom for research, using a restraining device. *Laboratory Animals* 29, 456-458.
- Gupta, D., Debnath, A., Saha, A., Giri, B., Tripathi, G., Vedasiromoni, J.R., Gomes, A. ve Gomes, A. (2007). Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562S. *Leukemia Research* 31, 817-825.
- Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M., Stankiewicz, M., Stühmer, W., Dong, K., ve Gordon, D. (2007). The insecticidal potential of scorpion  $\beta$ -toxins. *Toxicon* 49, 473-489.



- Hu, H., Chen, D., Li, Y. ve Zhang, X. (2006). Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 *in-vitro* and Balb/c nude mice *in-vivo*. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 54, 1-8.
- Karatas, A. (2005). *Mesobuthus caucasicus* (Nordmann, 1840) (Scorpiones: Buthidae) in Turkey. *Euscorpius* 25, 1-7.
- Kozlov, S., Lipkin, A., Nosyreva, E., Blake, A., Windass, J.D. ve Grishin, E. (2000). Purification and cDNA cloning of an insectal protein from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. *Toxicon* 38, 361-371.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Eldere, J.V., Walt, J. ve Verdonck, F. (2002). Antibacterial and antifungal properties of  $\alpha$ -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European Journal of Biology* 269, 4799-4810.
- Mortari, M.R., Cunha, A.O.S., Ferreira, L.B. ve Ferreira dos Santos, W. (2007). Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. *Pharmacology & Therapeutics* 114, 171-183.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65(1-2), 55-63.
- Munekiyo, S.M., Mackessy, S.P. (1998). Effects of temperature and storage conditions on the electrophoretic, toxic and enzymatic stability of venom components. *Comp. Biochem. Physiol* 119, 119-127.
- Omran, M.A.A. (2003). Cytotoxic and apoptotic effects of scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom on 293T and C2C12 eukaryotic cell lines. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 9(2), 1-22.
- Plessis, J.L. (2005) Collection of venom from southern African scorpions. *Toxicon* 45, 681-682.
- Plessis, L.H., Elgar, D. ve Plessis, J.L. (2008). Southern African scorpion toxins: An overview. *Toxicon* 51, 1-9.
- Possani, L.D., Fletcher, P., Alagon, B., Alagon, A. ve Julia, J. (1980). Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican Scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffman. *Toxicon* 18, 175-183.
- Soudania, N., Gharbi-Chihib, J., Srairi-Abida, N., Martin-El Yazidic, C., Planellsc, R., Margotatc, A., Torresanic, J. ve El Ayeba, M. (2005). Isolation and molecular characterization of LVP1 lipolysis activating peptide from scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1747 47- 56.
- Torres-Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z. ve Possani, L.D. (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *European Journal of Biochemistry* 267, 5023-5031.
- Wang, C.G., He, X.L., Shao, F., Liu, W., Ling, M.L., Wang, D.C. ve Chi, C.W. (2001). Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *European Journal of Biochemistry* 268, 2480-2485.
- Wang, W.X. ve Ji, Y.H. (2005). Scorpion venom induces glioma cell apoptosis *in vitro* and inhibits glioma tumor growth *in vivo*. *Journal of Neuro-Oncology* 73, 1-7.
- Xiong, Y., Lan, Z., Wang, M., Liu, B., Liu, X., Fei, H., Xu, I., Xia, Q., Wang, C., Wang, D. ve Chi, C. (1999). Molecular characterization of new excitatory insect neurotoxin with an analgesic effect on mice from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 37, 1165-1180.



**Figen ÇALIŞKAN**, 1970 Bursa doğumludur. 1992'de Anadolu Üniversitesi Kimya Bölümünden lisans, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Fen Bilimleri Enstitüsünden 2002'de Yüksek Lisans, 2008'de Doktora derecesini almıştır. Evli ve 1 çocuk

annesidir. 1999'dan bu yana ESOĞÜ Biyoloji Bölümünde uzman olarak akrep venomlarından peptid saflaştırılması ve diziliminin belirlenmesi, bu peptidler için gen kodlarının klonlanması gibi konularda biyoteknoloji alanında çalışmaktadır.



**Hülya SİVAS**, 1957 Şile doğumludur. 1981'de Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden Lisans, 1987'de Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünden Yüksek Lisans ve 1992'de İngiltere

East Anglia Üniversitesinden Doktora derecesini almıştır. 2005 yılında Doçentlik derecesini almış ve 1984'den bu yana Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde öğretim üyesi olarak kanser moleküler biyolojisi ve genetik toksikoloji alanlarında çalışmaktadır.



**Yalçın ŞAHİN**, 1942 Gömeç doğumludur. 1968'de İstanbul Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden Lisans, 1976'de Fırat Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi'nden Doktora derecesini almıştır. 1981 yılında Doçentlik, 1987

yılında Profesörlük derecesini almış ve 1968'den bu yana sırasıyla İstanbul, Fırat, Anadolu ve ESOĞÜ'de öğretim üyesi olarak görev yapmış ve çeşitli idari görevler üstlenmiştir. Evli ve 2 çocuk sahibidir. Biyoçeşitlilik, sistematik zooloji ve hidrobiyoloji araştırmaları gibi konularda zooloji alanında çalışmakta ve halen ESOĞÜ Biyoloji Bölüm Başkanlığını yürütmektedir.