



**MONTİVİPERA XANTHİNA (GRAY, 1840) VE
VİPERA AMMODYTES (LİNNAEUS, 1758)
ZEHİRLERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER
AKCİĞER EPİTEL HÜCRE HATLARI
ÜZERİNDEKİ İN VİTRO SİTOTOKSİK VE
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Huzeyfe HURİYET



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***MONTİVIPERA XANTHINA* (GRAY, 1840) VE *VİPERA AMMODYTES*
(LİNNAEUS, 1758) ZEHİRLERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER AKCİĞER
EPİTEL HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ İN VİTRO SİTOTOKSİK VE
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Huzeyfe HURİYET

Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2017

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Huzeyfe HURİYET tarafından hazırlanan ‘*Montivipera xanthina* (Gray, 1840) ve *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) Zehirlerinin Sağlıklı Ve Kansere Akciğer Epitel Hücre Hatları Üzerindeki İn Vitro Sitotoksik Ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması’’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Başkan : Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Nilüfer ÇINKILIÇ
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Yrd.Doç.Dr.Gökçe TANER
Bursa Teknik Üniversitesi Doğa Bilimleri
Mimarlık Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM
Enstitü Müdürü

16.10.2017

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

../ ../

İmza

Huzeyfe HURİYET

ÖZET

Montivipera xanthina (Gray, 1840) ve *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758)
Zehirlerinin Sağlıklı ve Kanser Akciğer Epitel Hücre Hatları Üzerindeki İn Vitro
Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması

Huzeyfe HURİYET

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Biyotoksinler, eski çağlardan beri birçok kültürde tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Hayvanlar aleminde basit yapıları olanlardan gelişmiş olanlara kadar bir çok canlının zehir içerdiği bilinmektedir. Antikanser alanında yürütülen çalışmaların özellikle arı, örümcek, akrep ve yılan zehirleri üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Bu çalışmada *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin sağlıklı ve kanser insan akciğer hücre hatlarındaki in vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, her iki yılan türünden elde edilen zehirlerin sitotoksik etkileri, A549 insan akciğer kanseri ve Beas-2B insan sağlıklı bronş epitel hücre hatlarında XTT testi ve klonojenik test, genotoksik etkileri ise komet testi ile değerlendirilmiştir. Bunun yanında, olası hücre içi reaktif oksijen türevlerinin üretim seviyesine etkileri ROS testi ile ölçülmüştür.

Sitotoksikite testlerinde *M. xanthina* ve *V. ammodytes* zehirlerinin hem A549 hem de Beas-2B hücre hatlarında canlılık oranlarında konsantrasyona bağlı olarak azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. XTT testi sonucunda *M. xanthina* türünden elde edilen zehirin A549 ve Beas-2B hücrelerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 1,553 µg/ml ve 2,156 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Klonojenik testte ise bu değerler A549 ve Beas-2B hücreleri için sırasıyla 2,112 µg/ml ve 2,457 µg/ml olarak belirlenmiştir. XTT testinde *V. ammodytes* zehiri için A549 ve Beas-2B hücre hatlarında belirlenen IC₅₀ değerleri 0,429 µg/ml ve 0,564 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Klonojenik test sonucunda ise A549 ve Beas-2B hücre hatlarının klonojenik test bulguları 0,448 µg/ml ve 0,473 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Komet testinde ise *M. xanthina* zehirine 0.1 , 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 ve 3.2 µg/ml'lik konsantrasyonlarda maruz bırakılan A549 ve Beas-2B hücre hatlarında kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar DNA iplik kırıklarında kontrol grubuna göre anlamlı artışlar olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde *V. ammodytes* zehirine 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8 µg/ml'lik konsantrasyonlara maruz bırakılan A549 ve Beas-2B hücre hatlarındaki DNA hasarlarında da istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu belirlenmiştir. ROS testi sonuçları ise hem *M. xanthina* hem de *V. ammodytes* zehirlerinin IC_{12.5}, IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ konsantrasyonlarına maruz bırakılan A549 ve Beas-2B hücrelerinde hücre içi ROS düzeylerinde kontrol gruplarına göre istatistikî olarak anlamlı artışlara yol açtığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Montivipera xanthina*, *Vipera ammodytes* Sitotoksiste, Genotoksiste, BEAS-2B, A549, XTT testi, Klonojenik test, Komet testi, ROS, Kanser

2017, xi + 87 sayfa

ABSTRACT

Investigation of the In Vitro Cytotoxic and Genotoxic Effects of *Montivipera Xanthina* (Gray 1840) and *Vipera Ammodytes* (Linnaeus, 1758) Venoms on Healthy and Cancer Epithelial Lung Cell Lines

Huzeyfe HURİYET

Uludağ University

Institute of Science

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Biotoxins have been used for therapeutic purposes in many cultures since ancient times. It is known that from simple to more complex organisms in the animal kingdom contain poisons. Works in the field of anti-cancer seems to concentrate especially on bees, spiders, scorpions and snake venoms. In the present study, it was aimed to investigate the in vitro cytotoxic effects of *Montivipera xanthina* and *Vipera ammodytes* venoms on healthy and cancer human lung cell lines. For this purpose the cytotoxic effects of venoms collected from both species were investigated using XTT and clonogenic assays whereas the genotoxic effects were evaluated using the comet assay on A549 human lung cancer and Beas-2B human healthy bronchial epithelial cell lines. Furthermore, the possible induction of intracellular reactive oxygen species production was measured by ROS assay.

In cytotoxicity tests it has been determined that venoms of *M. xanthina* and *V. ammodytes* concentration dependently decreased the viability of both A549 and Beas-2B cells. As a result of the XTT test, the IC₅₀ values of the *M. xanthina* venom on A549 and Beas-2B were calculated as 1,553 µg / ml and 2,156 µg / ml, respectively. In the clonogenic test, these values were determined as 2,112 µg / ml and 2,457 µg / ml for the A549 and Beas-2B cells, respectively. The IC₅₀ values for *V. ammodytes* venom in the A549 and Beas-2B cell lines were calculated as 0.429 µg/ml and 0.564 µg / ml in the XTT test. Clonogenic test results revealed IC₅₀ values of 0,448 µg / ml and 0,473 µg / ml for A549 and Beas-2B cell lines, respectively. In the comet test, tail length, tail% DNA and olive tail moment values were calculated in A549 and Beas-2B cell lines exposed to *M. xanthina* venom at concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 µg/ml and the obtained results revealed significant increases DNA strand breaks in comparison to the control group. Similarly, statistically significant increases in DNA damage in A549 and Beas-2B cell observed following exposure to *V. Ammodytes* venom at concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 µg / ml. ROS test results revealed statistically significant increases in intracellular ROS levels in A549 and BEAS-2B cells exposed to IC_{12.5}, IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅ concentrations of both *M. xanthina* and *V. ammodytes* venoms in comparison to the control groups.

Key Words: *Montivipera xanthina*, *Vipera ammodytes*, Cytotoxicity, Genotoxicity, BEAS-2B, A549, XTT Clonogenic test, Comet test, ROS, Cancer

2017, xi + 87 pages

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bana rehberlik eden, tüm çalışmalarım boyunca yardımcı olan, ilgisini, sevgisini ve pozitif enerjisini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum danışmanım Sayın Hocam, Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a

Bu süreçte ilgisi ve pozitif enerjisiyle desteğini esirgemeyen Değerli Hocam Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ'a

Deneylerimin yapımında ve değerlendirilmesinde her zaman desteğini ve yardımını gördüğüm, Sayın Hocam Doç. Dr. Özgür VATAN'a,

Arazi çalışmalarımda bana yardımcı ve önderlik eden, Sayın Dr. Abdulmuttalip AKKAYA'ya

Laboratuvarımızda tam bir ekip ruhu oluşturan Sayın Arş. Gör. Melika BEKTAŞ HORTOĞLU'na, Neylan ORAL, Merve GÜLFİDANLI ve Fawaz Muhammed ABDULLAH'a,

Tüm bu zahmetli süreçte desteklerini esirgemeyen ve evlatları olduğum için kendimi şanslı hissettiğim anneme, babama ve inancıyla bana güç veren kardeşime,

Sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, "U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı" tarafından KUAP (F)-2015/71 nolu Bilimsel Araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1 Kanser	3
2.2. Hayvanlarda Zehirler	5
2.3. Hayvan Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması	6
2.3.1. Akrep Zehirleri.....	6
2.3.1.1. Akrep Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması	7
2.3.2. Örümcek Zehirleri.....	8
2.3.2.1. Örümcek Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması.....	8
2.3.3. Arı Zehiri.....	10
2.3.3.1. Arı Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması	10
2.3.4. Amfibi zehirleri.....	11
2.3.4.1. Amfibi Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması.....	11
2.3.5.Yılan zehirleri.....	13
2.3.5.1.Yılan zehirlerinde bulunan bazı enzimler	15
2.3.5.1.1. Kolinesterazlar	15
2.3.5.1.2. Hiyalürinidazlar.....	15
2.3.5.1.3. Fosfolipaz A2.....	16
2.3.5.1.4. Metalloproteinazlar	16
2.3.5.1.5. L-aminoasit oksidazlar	17
2.3.5.1.6. Fosfodiesteraz	17
2.3.5.1.7. 5'-Nukleotidaz.....	17
2.3.5.1.8. Trombin.....	17
2.3.5.1.9. Trombin Benzeri Enzimler.....	17
2.3.5.2. Yılan zehirlerinin anti kanser araştırmalarda kullanımı.....	18
2.3.5.3.Yılan Zehirleri İle İlgili Türkiye de Yapılan Çalışmalar	20
2.3.5.4.Tez Çalışmamızda Kullanılan Yılan Türleri Ve Ekolojileri	22
3. MATERYAL YÖNTEM	24
3.1 Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler	24

3.2. Kullanılan Hücre Hatları	26
3.3. Kullanılan Yılan Zehirlerinin Elde Edilmesi	26
3.4. Zehirlerin Total Protein İçeriklerinin Belirlenmesi (Bradford Yöntemi)	27
3.5 XTT Testi	29
3.6. Klonojenik Test	30
3.7. Komet Testi	31
3.8. ROS Testi	34
3.9. İstatistiksel Analiz	35
4.BULGULAR	36
4.1. Bradford Testi Sonuçları	36
4.1.1. <i>Montivipera xanthina</i> Zehiri İçin Bradford Bulguları	36
4.1.2. <i>Vipera ammodytes</i> Zehiri İçin Bradford Bulguları	36
4.2.XTT Bulguları	38
4.2.1. A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen XTT bulguları	38
4.2.2. Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen XTT bulguları	38
4.2.3. A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen XTT bulguları ...	38
4.2.3. Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen XTT bulguları	38
4.3. Klonojenik Test Bulguları	40
4.3.1. A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen klonojenik Test bulguları	40
4.3.2. Beas-2B Hücre Hattında <i>Montivipera xanthina</i> Zehiri İçin Elde Edilen Klonojenik Test Bulguları	41
4.3.3. A549 Hücre Hattında <i>Vipera ammodytes</i> Zehiri İçin Elde Edilen Klonojenik Test Bulguları	42
4.3.3. Beas-2B Hücre Hattında <i>Vipera ammodytes</i> Zehiri İçin Elde Edilen Klonojenik Test Bulguları	43
4.4. Komet Testi Bulguları	45
4.4.1. Kuyruk uzunluğu bulguları	45
4.4.1.1. A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları	45
4.4.1.2. Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları	46
4.4.1.3 A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları	47
4.4.1.4. Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları	48

4.4.2. Kuyruk % DNA bulguları	49
4.4.2.1. A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen kuyruk % DNA bulguları.....	49
4.4.2.2. Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen kuyruk % DNA bulguları.....	50
4.4.2.3. A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen kuyruk % DNA bulguları	51
4.4.2.4. Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen kuyruk % DNA bulguları.....	52
4.4.3. Olive kuyruk momenti bulguları	53
4.4.3.1. A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları	53
4.4.3.2. Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları.....	54
4.4.2.3. A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları	55
4.4.2.4. Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları	56
4.5. ROS Testi Bulguları.....	61
4.5.1. A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen ROS testi sonuçları	61
4.5.2. Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen ROS testi sonuçları	62
4.5.3. A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen ROS testi bulguları	63
4.5.4. Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen ROS testi bulguları	64
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
μg	Mikrogram
$^{\circ}\text{C}$	Celcius
A549	Akciğer Kanseri Epitelyum Hücre Hattı
B16F10	Fare Melenoma Hücre Hattı
Beas-2B	Akciğer Sağlıklı Epitelyum Hücre Hattı
Ca	Kalsiyum
CaCo-2	İnsan kolon kolorektal kanseri
CO ₂	karbondioksit
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
gr	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HCT-8	İnsan İleoçekal Koleraktal Adenokasinoma Hücre Hattı
HELA	İnsan Serviks Adeno Karsinoma Hücre Hattı
HEP3B	İnsan Hepatesüler Karsinoma Hücre Hattı
HL60	İnsan Promylotik Lösemi Hücre Hattı
HT29	İnsan Kolorektal Karsinoma
HUTU	İnsan Duedenum Adenokarsinoma Hücre Hattı
K562	İnsan Kronik Miyolojen Lösemi
kg	kilogram
L	Litre
L1210	Mus musculus lenfotik lösemi
LL-24	İnsan Akciğer Fibroblast Hücre Hattı
LNCaP	İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
LU-1205	İnsan Metastatik Akciğer Kanseri
mA	miliAmper
MCDK	Köpek Böbrek Hücre Hattı
MCF7	İnsan Meme Adenokarsinoma Hücre Hattı
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
MKN-45	İnsan Gastrik Adenokarsinoma
ml	Mililitre
MOLT-4	İnsan Akut Lösemi Hücre Hattı
Na ₂ EDTA	Sodyum Etilendiamin Tetra Asetik Asit
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaHPO ₄	Monosodyum fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
nM	Nanomolar
P	Fosfat
PC-3	İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
RKO	İnsan Kolon Kanseri
SaOS-2	İnsan Osteosarcoma Hücre Hattı
SKBR3	İnsan meme bez Hücre Hattı

SK-N-MC	İnsan Nöroepitelium Hücre Hattı
SK-N-SH	İnsan Beyin Nöroblastoma Hücre Hattı
TE13	Özofagal Karsinoma Hücre Hattı
U-87 MG	İnsan Globlostama Hücre Hattı
U937	İnsan Histositik lenfoma
V	Volt
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar

Açıklama

BSA	Bovine Serum Albumin
Cltx	Klorotoksin
DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate
DCFH	Dichlorodihydrofluorescein
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonukleik Asit
EAC	Ehrlich Ascites Carcinoma
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fetal Bovine Serum
IARC	International Agency For Research On Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)
LMA	Low Melting Agoroz (Düşük sıcaklıkta eriyen agaroz)
M.Ö	Milattan önce
MIC	Maksimum inhibisyon konsantrasyon
MMP-2	Metalloproteinaz 2
PBS	Fosfat Buffer Serum
RBC	Red Blood Cell (Kırmızı kan Hücreleri)
RNA	Ribonukleik asit
ROS	Serbest Reaktif Oksijen
WBC	White Blood Cell (Beyaz kan hücreleri)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Bazı zehirli hayvan grupları	5
Şekil 2.2.	Cholorotoxinin 3 boyutlu yapısı ve siklik formdaki aminoasit dizilimi ...	9
Şekil 2.3.	Zehirli bir yılanda zehir bezinin konumu ve zehir dişlerinin duruşu	13
Şekil 2.4.	Bir <i>Montivipera xanthina</i> (Şeritli engerek) örneği	22
Şekil 2.5.	Bir <i>Vipera ammodytes</i> (boynuzlu engerek) örneği	23
Şekil 3.1.	Cosmasie Brilliant blue G-250 boyasının kimyasal yapısı	27
Şekil 3.2.	Canlı hücrelerde XTT metabolizasyonu sonucunda suda çözünebilir formazan oluşumu ..	29
Şekil 4.1.	<i>Montivipera xanthina</i> zehirinin protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart eğrisi.....	31
Şekil 4.2.	<i>Vipera ammodytes</i> zehirinin protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart eğrisi.....	37
Şekil 4.3.	<i>Montivipera xanthina</i> ve <i>Vipera ammodytes</i> zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında IC ₅₀ , değ.....	39
Şekil 4.4.	<i>Montivipera xanthina</i> zehirine maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları	40
Şekil 4.5.	<i>Montivipera xanthina</i> zehirine maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları	41
Şekil 4.6.	<i>Vipera ammodytes</i> zehirine maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları.....	42
Şekil 4.7.	<i>Vipera ammodytes</i> zehirine maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları.....	43
Şekil 4.8.	<i>Montivipera xanthina</i> ve <i>Vipera ammodytes</i> zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında IC ₅₀ , değerleri.....	44
Şekil 4.9.	A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri	45
Şekil 4.10.	Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri	46
Şekil 4.11.	A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri	47
Şekil 4.12.	Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri.....	48
Şekil 4.13.	A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen kuyruk % DNA verileri	49
Şekil 4.14.	Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen kuyruk % DNA verileri	50
Şekil 4.15.	A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen kuyruk % DNA verileri.....	51
Şekil 4.16.	Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen kuyruk % DNA verileri.....	52

Şekil 4.17.	A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti verileri	53
Şekil 4.18.	Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti verileri	54
Şekil 4.19.	A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen kuyruk olive kuyruk momenti verileri	55
Şekil 4.20.	Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti verileri	56
Şekil 4.21.	Komet testi sonunda A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için çeşitli konsantrasyonlardaki florasın mikroskop görüntüleri.....	57
Şekil 4.22.	Komet testi sonunda Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri için çeşitli konsantrasyonlardaki florasın mikroskop görüntüleri	57
Şekil 4.23.	Komet testi sonunda A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için çeşitli konsantrasyonlardaki florasın mikroskop görüntüleri.....	58
Şekil 4.24.	Komet testi sonunda Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için çeşitli konsantrasyonlardaki florasın mikroskop görüntüleri.....	58
Şekil 4.25.	A549 hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri IC ₇₅ (2,33 µg/ml), IC ₅₀ (1,55 µg/ml) ve IC ₂₅ (0,77 µg/ml) ve IC _{12,5} (0,38 µg/ml) doz gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması	61
Şekil 4.26.	Beas-2B hücre hattında <i>Montivipera xanthina</i> zehiri IC ₇₅ (3,23 µg/ml) , IC ₅₀ (2,15 µg/ml) ve IC ₂₅ (1,07 µg/ml) ve IC _{12,5} (0,53 µg/ml) doz gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması	62
Şekil 4.27.	A549 hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri IC ₇₅ (0,644 µg/ml) , IC ₅₀ (0,429 µg/ml) ve IC ₂₅ (0,214 µg/ml) ve IC _{12,5} (0,107 µg/ml) doz gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması	63
Şekil 4.28.	Beas-2B hücre hattında <i>Vipera ammodytes</i> zehiri IC ₇₅ (0,846 µg/ml) , IC ₅₀ (0,564 µg/ml) ve IC ₂₅ (0,282 µg/ml) ve IC _{12,5} (0,141 µg/ml)doz gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1.	Yılan zehirlerinin içerisinde bulunan başlıca maddeler.....	15
Çizelge 3.1.	Çalışmalarda kullanılan ekipman.....	24
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....	25
Çizelge 3.3.	Bradford yöntemi için hazırlanan standartların derişimleri.....	28
Çizelge 3,4.	DCF standartlarının tüp dilüsyon yöntemiyle hazırlanması	35
Çizelge 4.1.	<i>Montivipera xanthina</i> ve <i>Vipera ammodytes</i> zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında IC ₇₅ , IC ₅₀ , IC ₂₅ ve IC _{12,5} değerleri.....	39
Çizelge 4.2.	<i>Montivipera xanthina</i> zehirine maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri.....	40
Çizelge 4.3.	<i>Montivipera xanthina</i> zehirine maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri.....	41
Çizelge 4.4.	<i>Vipera ammodytes</i> zehirine maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri.....	42
Çizelge 4.5.	<i>Vipera ammodytes</i> zehirine maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri.....	43
Çizelge 4.6.	<i>Montivipera xanthina</i> ve <i>Vipera ammodytes</i> zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında Klonojenik test sonucu hesaplanmış IC ₅₀ değerleri.....	44
Çizelge 4.7.	A549 ve Beas-2B hücre hatlarında <i>Montivipera xanthina</i> ve <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için Kuyruk uzunluğu sonuçları.....	59
Çizelge 4.8.	A549 ve Beas-2B hücre hatlarında <i>Montivipera xanthina</i> ve <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için Kuyruk % DNA sonuçları.....	59
Çizelge 4.9.	A549 ve Beas-2B hücre hatlarında <i>Montivipera xanthina</i> ve <i>Vipera ammodytes</i> zehiri için olive kuyruk momenti sonuçları.....	60
Çizelge 4.10.	<i>Montivipera xanthina</i> ve <i>Vipera ammodytes</i> zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarındaki ROS testi sonuçları	65

1.GİRİŞ

Kanser dünyada ölüm nedenleri arasında en önde gelen sağlık problemlerinden biridir. Uluslararası kanser araştırmaları ajansının (IARC) istatistiklerine göre 2012 yılında 14.1 milyon insan yeni kanser vakası olarak kaydedilmiş ve bunlardan 8.2 milyon vaka ölümle sonuçlanmıştır. Bu vakalarda ilk sırada 1,7 milyon kişi ile akciğer kanseri, ikinci sırada ise 1,6 milyon kişi ile meme kanseri yer almaktadır (Ferlay ve ark. 2015). Birleşik devletlerde 2016 yılında 1,658,210 kişi yeni kanser vakası olarak kaydedilmiş ve 595,690 kişi kanserden dolayı yaşamını yitirmiştir. Kanser tipleri arasında erkeklerde prostat ve akciğer kanseri görülürken kadınlarda meme kanseri en yaygın görülen kanser tipi olarak görülmüştür (Siegel ve ark. 2016).

Kanser tedavisinde birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Tedavi yöntemlerinin arasında en çok kullanılan radyoterapi ve kemoterapötik ilaçlar başta gelmektedir. Kemoterapik ilaçların birçok yan etkisinin olduğunun görülmesiyle doğal kaynaklardan geliştirilen ilaçların üretilmesi hız kazanmıştır. Kanser araştırmalarında 1940 yılından 2007 yılına kadar üretilen 155 yeni kemoterapik ilacın %47 si doğal kaynaklardan elde edilen ilaçlardır (Newman ve Gordon 2006). Bu anlamda yararlanılan doğal kaynaklardan birini de biyotoksinler oluşturmaktadır Tarihi kayıtlar antik çağlardan bu yana Çin, Mısır, Hindistan gibi medeniyetlerde zehirler bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olduğunu göstermektedir. Hindistanlı bir hekim olan Sushruta (M.Ö. 7.yüzyıl) yılan zehirlerinin uzun yaşamla ilgisi olduğunu söylemiş ayrıca Charaka adlı başka bir hekim ise “udra raga” adı verilen bir sindirim sistemi hastalığının tedavisinde yılan zehirlerini kullanmıştır (Gomes ve ark. 2010). Biyotoksinlerin patofizyolojik problemlere karşı kullanılabileği ve kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçların geliştirilebilme potansiyelleri ortaya çıkmıştır (Lui ve ark. 2014).

Hayvanlara alemine bakıldığında çok basit yapılı canlılardan daha gelişmiş organizasyonlu canlılara kadar bir çok türde zehir üretimi görülmektedir. Hayvan zehirlerinin antikanser potansiyellerine dair bir çok araştırma bulunmakla birlikte bu çalışmaların özellikle arı, örümcek, akrep ve yılan zehirleri üzerine yoğunlaştığı görülmektedir.

Bu çalışmada *Montivipera xanthina* (Gray 1840) (Şeritli engerek) ve *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) (Boynuzlu engerek) zehirlerinin in vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin sağlıklı ve kanserli hücre hatları üzerinde karşılaştırmalı olarak araştırılmasını amaçlanmıştır. Çalışmamızda model olarak en yaygın görülen kanser türlerinden olan akciğer kanser hücrelerinde ve bu hücrelerin sağlıklı formlarında çalışılması planlanmıştır. Bu amaçla, sağlıklı akciğer (Beas-2B) ve akciğer kanser (A549) hücre hatları seçilmiştir. Sitotoksik/antiproliferatif etkilerin belirlenmesi amacıyla, klonojenik test ve XTT testleri kullanılmıştır. Genotoksik etkilerinin ve DNA hasarlarının araştırılması amacıyla komet test yöntemi kullanılmış, ayrıca hücre içi ROS üretimi DFCDA kullanılarak ölçülmüştür.



2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Kanser

Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak devamlı ve kontrolsüz bir şekilde bölünebilen vücudun diğer organlarına giderek o bölgelerde yerleşip bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Yengeçler, düşmanını uzun dişli kollarıyla tutar ve yavaş yavaş kemirerek yer. Bu benzerlik nedeni ile kanserin kelime anlamı yengeçtir. Kanser bir genom hastalığı olup, DNA'da yapı değişikliğiyle başlayan süreçte temel sorun, kontrolsüz çoğalmadır. Kanserdeki ölümlerin çoğu tümöral dokunun kendisinden değil, sekonder olarak gelişen metabolik değişimlerden kaynaklanmaktadır. Tüm dünyada ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan hemen sonra, ikinci sırada kanser gelmektedir (Erdamar ve ark. 2005)

Kanser bölgeye ve zamana bağlı olmadan çok farklı etiyojolojiye sahip multigenik ve multiselüler bir hastalık olarak ortaya çıkmaktadır. Hanahan ve Weinberg (2011) kanserin tanımlanmasında 6 tip özellik ve fenotip belirlemişlerdir. Kanser hücreleri sınırsız bir şekilde bölünme potansiyeline sahip, çevresindeki dokulardan bağımsız olarak büyüebilme, apoptozdan kaçabilme yeteneği, anjiyogenez (tümör hücresi için gerekli olan besin ve oksijeni almak için kendisi için yeni damar ağı üretebilme potansiyeli), invazyon ve metastaz gibi özellikler kanser hücrelerinde bulunmaktadır.

Yirminci yüzyılın başlarında az rastlanan bir kanser türü olarak tanımlanan akciğer kanserinin sıklığı 20. yüzyılın sonlarına doğru giderek artan bir şekilde devam etmiştir. Erkeklerde prostat kanserinden sonra, kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen kanser türü akciğer kanseri olmuştur. Akciğer kanseri her iki cinsten de ölüme en sık neden olan kanser türüdür. Akciğer kanserinin etiyojisinde en önemli faktör sigaradır. Sigara akciğer kanserlerinin yaklaşık %85-90'undan sorumludur. Akciğer kanserinin oluşuna etki eden başka bir faktör ise asbesttir. Asbest maruziyeti, sigara kullanımıyla birleştiğinde akciğer kanserine yakalanma oranını yaklaşık 90 kat arttırmaktadır. Radyasyona maruz kalanlarda akciğer kanseri riski artmaktadır. Radon gazı akciğer kanserine sebep olan bir radyoaktif maddedir. Ayrıca bis (klorometil) eter, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, krom, nikel ve organik arsenik bileşikler gibi

maddelere maruz kalanlarda akciğer kanseri daha sık görülmektedir (Turhan 2010, Ece ve Hürkal 2010).

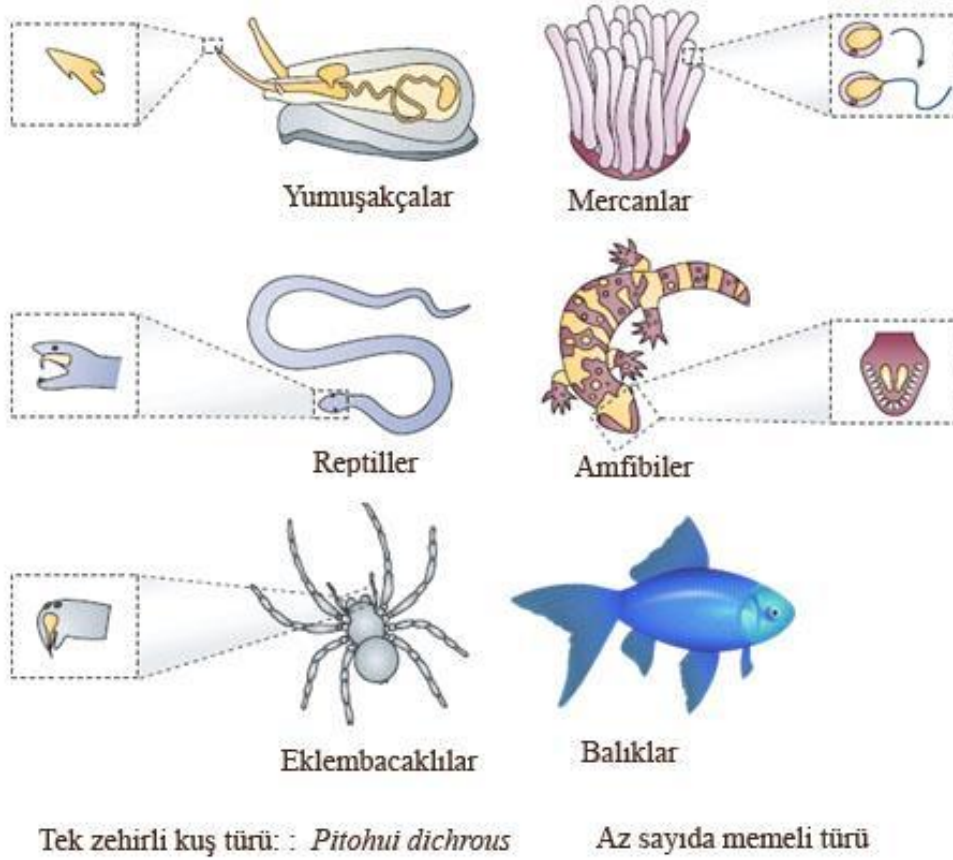
Bazı genlerin, özellikle de kanser metabolizmasıyla ilişkili genlerdeki kalıtsal polimorfizmin çeşitli çevresel maruziyetler ile stimülasyonu sonucu bireyde akciğer kanseri gelişme olasılığının arttığı gösterilmiştir. Akciğer kanserlerinde pek çok kromozomal ve yapısal sitogenetik anormallikleri (delesyon, amplifikasyon, nonresiprokal translokasyonlar) görülmektedir. Birçok kanser türünde oluşu gibi akciğer kanserinde de büyük genetik olaylar şöyle sıralanabilir: Onkogenlerde oluşan mutasyonlar, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, hücre siklusunun düzenlenmesin rol alan genlerde oluşan mutasyonlar, DNA tamir mekanizmasında ortaya çıkan mutasyonlar, büyüme faktörleri ve reseptörleriyle ilgili değişiklikler.

Ülkemizde Kanserle Savaş Daire Başkanlığı 1983 yılında kurulmuştur. Bu yıllarda kanser hastalığı bildirim zorunlu hastalıklar arasına alınmıştır. Bu dönemde, kanser sıklığı çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda, organa özgü kanser sayıları ile ülkemizde ilk kez kanserin profili görülmüştür. Ülkemizde tüm yaş gruplarında 2014 verilerine göre erkeklerde en çok sırasıyla akciğer-bronş-trake kanserleri, prostat kanseri, kolorektal kanser ve mesane kanseri görülmektedir. Kadınlarda ise sırası ile meme kanseri, tiroit kanseri, kolorektal kanser ve uterus kanseri önde gelmektedir. Ayrıca ülkemizde 0-14 yaş (çocukluk çağı) grubunda hem erkek hem kız çocuklarda kan kanseri, 15-24 erkeklerde testis kanseri kadınlarda tiroit kanseri, 25-49 ve 50-69 yaş gruplarında ise erkeklerde akciğer-bronş-trake kanserleri, kadınlarda meme kanseri görülmektedir (Anonim 2017 a).

Kanser tedavisinde radyasyon terapisi, cerrahi, kemoterapi ve hormon tedavisi gibi çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Bu tedavi yöntemleri arasında ise en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri kemoterapi'dir. Bununla birlikte kemoterapötik ajanların sistemik olarak birçok yan etkisinin olduğu bilindiğinden özellikle doğal kaynaklardan anti-kanser ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Celikler-Kasımoğulları ve ark. 2014, Arı ve ark. 2015).

2.2. Hayvanlarda Zehirler

Hayvanlar âlemine bakıldığında çok basit yapılu organizmalardan yüksek yapılu organizmalara birçok büyük grupta zehirli canlıların bulunduğu görülmektedir (Şekil 1). Bunlar arasında başta sürüngenler, balıklar olmak üzere amfibi ve memeliler gibi omurgalılar, deniz yıldızı gibi derisi dikenliler, koni salyangozu ve ahtapotlar gibi yumuşakçalar, örümcekler, akrepler böcekler ve çiyenlar gibi eklem bacaklılara ait 100.000 den fazla türün zehire sahip olduğu bilinmektedir (Juan ve ark. 2009).



Şekil 2.1. Bazı zehirli hayvan grupları (Lewis ve Garcia 2003)

2.3. Hayvan Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması

Birçok havyan sınıfının zehiri anti kanser araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu alışmalar akrep, örümcek, arı, amfibi ve yılan zehirleri üzerinde ağırlık kazanmıştır (Partha ve ark. 2015)

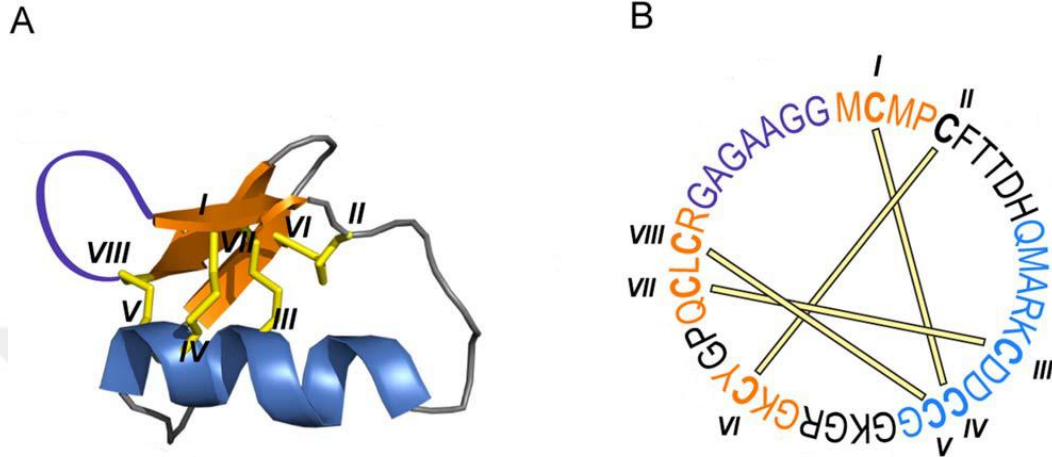
Antikanser peptitler farklı açılardan kanser gelişmesine karşı mücadeleye izin veren kansere hedeflendirilmiş ilaçların dizaynı için önemli bir kaynak sunar. Bazı küçük moleküller etkili olarak dokulara girer ve kanser hücrelerini ortadan kaldırır. Bu moleküller tümörler üzerine doğrudan, kemoterapötiklerle birlikte sinerjistik olarak veya biyobozunur ya da düşük seçicilikte ilaçlar için yapılan taşıyıcı araçlar içinde gönderilerek gösterirler (Gaspar ve ark.2013).

2.3.1. Akrep Zehirleri

Akrepler dünyada yaklaşık 400 milyon yıldır varlığını sürdüren canlılardır (Polis 1990). Birçok ülkede akrep sokmaları önde gelen sağlık sorunlarından biridir. Yılda 1,2 milyondan fazla akrep sokması rapor edilmekte ve akrep sokmaları arteryal hipertansiyon veya hipotansiyon, taşikardi veya bradikardi gibi önemli sağlık sorunlarına sebep olmaktadır (Chippaux 2012). Diğer taraftan akreplerin geleneksel tedavi yöntemlerinde Afrika ve Asya'daki eski kültürlerde kullanıldığı bildirilmektedir. (Goudet ve ark. 2002, Shao ve ark. 2012). Akrepler yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ve potansiyel kanser tedavisinde kullanılabilecek biyolojik aktif moleküler, antiviral, antifungal ve antimalarial peptitler, serotonin, histamin gibi düşük moleköl ağırlıklı moleküler, inorganik tuzlar, mukus ve nörotoksinleri içermektedir (Ortiz ve ark. 2015, Du Plessisa ve ark. 2008).

2.3.1.1. Akrep Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması

Akrep zehirleri ile ilgili anti kanser çalışmalarda en önde gelen peptit *Leiurus quinquestriatus*'tan izole edilen cholorotoxindir (Cltx). Cholorotoxin 36 amino asitten ve 4 disulfid köprüsünden oluşan kısa zincirli bir peptittir (Ojeda ve ark. 2015).



Şekil 2.2. A)Cholorotoxinin 3 boyutlu yapısı . Disfid köprüleri sarı çubuklarla, β yapısı turuncu α -heliks yapısı mavi ile gösterilmiştir. B)Cholorotoxinin siklik formdaki amino asit dizilimi gösterilmiştir. Disfid köprüleri sarı çizgilerle ve aynı zamanda sistein molekülleri roma rakamları ile etiketlenmiştir (Paola ve ark. 2015)

Chlorotoksin hücre zarında klor kanallarına girip inhibe ederek glioma hücrelerinde etkili olmaktadır. Bu peptit sadece glioma hücrelerine bağlanmakta, normal hücrelerde ya çok az ya da hiç aktivite göstermemektedir. Bu toksin matriks metalloproteinaz II (MMP-2) ye bağlanarak ekstraselüler matriks enzimi olan jelatinaz aktivitesini inhibe etmektedir. MMP-2 glioma ve ilişkili kanserlerde tümör invazyonuyla alakalı bir protein olarak bilinir ve özelikle bu kanser tiplerinde bu protein sentezi fazladır. Chlorotoksin glioma hücrelerinde MMP-2 ye etkili bir şekilde bağlanmakta ve klor kanallarındaki akımın bozulmasıyla düşük jelatinaz aktivitesine sebep olmaktadır (Soroceanu ve ark. 1998, Liliana ve ark. 1999, Deshane ve ark. 2003, Veiseh ve ark. 2007).

Lipozomlarla modifiye edilmiş cholorotoksinin; BALB/c farelerin elde edilen MMP-2 ekspresyonu yüksek olan agresif metastatik meme kanseri hücrelerinde oldukça yüksek antimetastatik etki gösterdiği bildirilmiştir (Qin ve ark. 2014) .

Çin kırmızı akrebi (*Buthus martensii* Karsch) zehrinden izole edilen serin proteinaz benzeri BMK-CBP peptininin, MCF-7 (meme kanseri) hücre hattında doza bağlı olarak hücreye bağlandığı gösterilmiştir (Gao ve ark. 2008).

Gupta ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada *Heterometrus bengalensis* (Hindistan siyah akrebi) zehrinden izole edilen bengalin olarak adlandırılan peptinin U937 (histiositik lenfoma) ve K562 (kronik myeloid lösemi) hücre hatları üzerinde antikanser etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bengalin mitokondriyal zar potansiyelini sitozole sitokrom c in salınmasını başlatarak potansiyelin kaybına sebep olmakta ve ısı şok proteinleri (heat shock protein) 70 ve 90 ekspresyonunu azaltmaktadır. Bu sonuçlar bengalinin insan lösemi hücreleri üzerine antikanser etkisini kabul edilen mitokondriyal ölüm basamakları olarak gösterilen bu mekanizmalarla etkilediğini göstermektedir.

2.3.2. Örümcek Zehirleri

Örümcekler artropodanın çok çeşitli gruplarından biridir; 38 000 kadar türü tanımlanmıştır ve göreceli olarak toksinleri şu ana kadar az çalışılmıştır. Örümcek zehrinin içeriği moleküler olarak çok çeşitlilik gösterir. Örneğin *Atrax robustus* örümceğinin zehiri 1000 den fazla peptit içermektedir. Her bir farklı örümcek zehrinin 500 den fazla farklı toksin içerdiği tahmin edilmekte, böylece 38000 kadar tanımlanmış örümceğin zehrinin 19 milyon kadar toksin içerdiği düşünülmektedir. Bu kadar çok farklı peptinin oluşu yeni farmakolojik maddelerin geliştirilmesi için önemli bir kaynak sağlamaktadır.(Escoubas 2006)

2.3.2.1. Örümcek Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması

Macrothele raven türü örümceğin zehri ile yapılan bir çalışmada insan servikal (rahim ağzı) kanseri hücre hattı olan HELA hücre hattında proliferatif ve sitotoksik etkisi araştırılmıştır ve çalışmada etidyum bromid /akridin oranj boyamalarında morfolojik değişiklikler gözlenmiş doza bağlı olarak HELA hücrelerinin proliferasyonunun inhibe edildiği olduğu saptanmıştır. Ayrıca apoptoz ve nekroz oranlarının yükseldiği ve kaspaz-3'ün regülasyonunun arttığı bildirilmiştir (Gao ve ark. 2005 a).

Zhonghua ve ark.(2012) yaptıkları çalışmada *Macrothele raven* zehrinin miyolojen lösemi hücre hattında (K562) doza ve zamana bağlı olarak hücrelerin büyümelerini baskıladığını bildirilmiştir. DNA fragmentasyon yöntemiyle Annexın-V ve propidyum iyodur ikili boyamalarında apoptojenik olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda kaspaz-3 ve kaspaze-8 indüklediği rapor edilmiştir.

Macrothele raven zehrinin insan meme kanseri hücrelerinde 10,20,40 µg/ml lik konsantrasyonlarda sitotoksik etkisini gösterdiği ve bu konsantrasyonlarda flow sitometre sonuçlarının ise apoptoz ve nekrozu indüklediği bildirilmiştir. İn vivo olarak nude farelerde tümörün büyümesini 1.6, 1.8, 2.0µg/ml dozlarda inhibe ettiği gösterilmiştir (Gao ve ark. 2007).

Macrothele raven zehriyle yapılan bir başka çalışmada İnsan sokuamoz özofagal karsinoma hücre hattı olan TE13 kullanılmış ve bu hücre hattında örümcek zehrinin 25, 50, 100 µg/ml lik dozlarında hücre siklusunu G₀/G₁ fazında duraklattığı görülmüş aynı zamanda örümcek zehrinin ROS seviyesini yükseltmesi ve bunun yanında mitokondriyal membran potansiyelini azaltmasıyla apoptoza sebep olduğu, zehrin farmakolojik aktivitesinin p21 ekspresyonunu artırarak sağladığı western blot yöntemiyle gösterilmiştir. İn vivo testlerde tümör büyüklüğünün 21 gün sonra önemli derecede sonra azaldığı bildirilmiştir (Gao ve ark. 2005 b).

Gao ve ark. (2009) tarafından A549 akciğer adenokarsinom A549 hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada *Macrothele raven* zehrinin kanser hücrelerinde apoptoz inhibitörü olan P38 MAPK ekspresyonunu azalttığı gösterilmiş ve böylece bu zehrin akciğer adenokarsinomlarında antikanser potansiyali olduğu rapor edilmiştir.

Rodrigues ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada *Acanthoscurria gomesiana*'dan izole edilen ve antibakteriyal etkisinin olduğu bilinen gomesin'in antitümör etkisinin de olduğunu göstermişlerdir. C57BL/6 farelerde B16F10-Nex2 melanoma hücrelerine subkutan enjeksiyonla verilen gomesin'in kontrol gruplarına göre tümörün gelişimini azalttığı ve farelerin hayatta kalma sürelerinin uzadığı tespit edilmiştir. Ayrıca

gomesinin melanoma, meme kanseri ve kolon kanseri gibi birçok farklı hücre hattında sitotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir.

Sheng ve ark. (2015) *Macrothele raven* zehrinin kuyruk veninden enjekte ettikleri hepatokarsinomlu farelerde (1.0-4.0µg/g 20 gün) karsinojenik faktörler olan PI3K, AKT, mTOR faktörlerini down regülasyonunu ve tümör supresör faktörler(PTEN ve Bax) genlerinin upregülasyonunu sağladığını rapor etmişlerdir.

2.3.3. Arı Zehiri

Bal, polen, propolis, balmumu ve arı zehri gibi arı ürünleri binlerce yıldır insanlık tarafından romatoid artrit, romatizmal hastalıklar, siatik, kas ağrılarında ve multiple skleroz(MS) gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Ali 2012).

Arı zehiri içerisinde proteinler (fosfolipazA2, fosfolipazB, hiyolurinidaz, fosfataz, glikosidaz), peptitler (melittin, apamie, secapin, pamin, minimin, adolapin terciapin, kardiopep, melittin f, proteaz inhibitör), Biyojen aminler (Histamine Dopamin Nöradrenalin), aminoasitler (aminobütirik asit, a-amino asitler), şekerler (Glukoz, fruktoz), feromonlar ve Mineraller (P, Ca, Mg) gibi çok çeşitli maddeler bulunur (Bogdanov 2014).

2.3.3.1. Arı Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması

Moon ve ark. (2006) yaptığı çalışmada arı zehrinin insan lösemi U937 hücrelerinde apoptozu indüklediği ve bu apoptozu ERK ve Akt sinyal yollarının down regülasyonu ile sağladığını rapor etmişlerdir.

Arı zehrinde bulunan melittin ilk olarak 1985 te insan lösemi hücrelerinde calmodulin inhibitörü olarak hücrelerin büyümesini ve klonojenitesinin etkilendiği gösterildi (Hait ve ark. 1985). Aynı yıl Lee ve Hait (1985) benzer bir etki mekanizmasıyla melittinin astrastoma hücrelerinde de aynı etkiyi yaptığını rapor etti.

Melittin suda çözünebilen bir peptit olarak *Apis mellifera* dan izole edilmiş ve hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerinde büyümelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Melittin tümör hücrelerinin migrasyonunu ve hareketinin azalmasını Rac-1'e bağlı sinyal yollarının baskılanmasıyla sağlar. Melittin Rac-1 sinyal yolağının

inhibisyonuyla metastazın önlenmesini sağlar ve bu yüzden melittin karaciğer karsinomlarında potansiyel terapötik ajan olarak önerilebilir (Liu ve ark. 2008).

Cisplatin kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır ancak cisplatine karşı kanser hastalarında bir direnç gelişebilir. Bu yüzden cisplatinle birlikte arı zehrinin kombine olarak tedavide kullanılabileceği düşünülmüş, arı zehri tek başına insan glioblastoma hücreleri olan A1235 hücre hattında sitotoksik etkisinin olduğu gözlenmiş ve etidyum bromidle boyamalar sonucunda nekrotik hücreler tespit edilmiştir. Cisplatin ve arı zehrinin doza bağlı olarak birlikte sinerjistik etki yaptığı söylenmiş ve arı zehrinin kanser tedavisinde kullanılabilme potansiyelinin olduğu rapor edilmiştir (Gajski ve ark. 2015)

2.3.4. Amfibi zehirleri

Amfibiler avcılara karşı kendilerini korumak için farklı morfolojik fizyolojik ve davranışsal birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan biri de derilerinde bulunan glandular bezlerden salgılar yapmalarındadır. Bu bezler zehir bezi olarak da adlandırılmakta ve hayvanın vücudu bu salgılarla kaplanmaktadır. Eski kültürlerden beri amfibilerin tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. Amfibi derisinde bulunan bu salgılar peptitler, proteinler, steroidler ve alkaloidler gibi birçok biyoaktif maddenin bulunduğu ve bu maddelerin antifungal, antiprotozoal, antidiabetik etkilerin var olduğu gösterilmiştir. Bu biyoaktif maddelerin potansiyel olarak yeni ilaçların geliştirilmesi için kullanılabileceği düşünülmektedir (Gomes ve ark. 2007 a).

2.3.4.1. Amfibi Zehirlerinin Antikanser Araştırmalarda Kullanılması

Geleneksel çin tedavisinde kullanılan Chan Su olarak adlandırılan *Bufo bufo gargarizans* derisinden elde edilen zehir, insan akciğer karsinoma hücrelerine (A549) farklı dozlarda verilmiş ve doza bağlı olarak hücrelerin büyümesini ve canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca anti-apoptotic Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı, pro-apoptotik Fas ligandın ve ölüm reseptörü 4 ün ekspresyonunu arttırması ve mitokondriyal membran potansiyelini azaltmasıyla apoptozu indüklediği görülmüştür (Yun ve ark. 2009)

Bufo bufo gargarizans derisinden izole edilen chan su mesane kanser hücre hattı olan T24 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak kanser hücrelerinin gelişimini engellediği ve ölümüne yol açtığı gösterilmiştir.

Aynı zamanda T24 hücrelerinde apoptozu antiapoptotik genler olan Bcl-2 ve Bcl-X_{s/L} ekspresyonunu azalttığı ve proapoptotik etkisi bilinen Bax ekspresyonu artırdığı ortaya konulmuştur.(Ko ve ark. 2005)

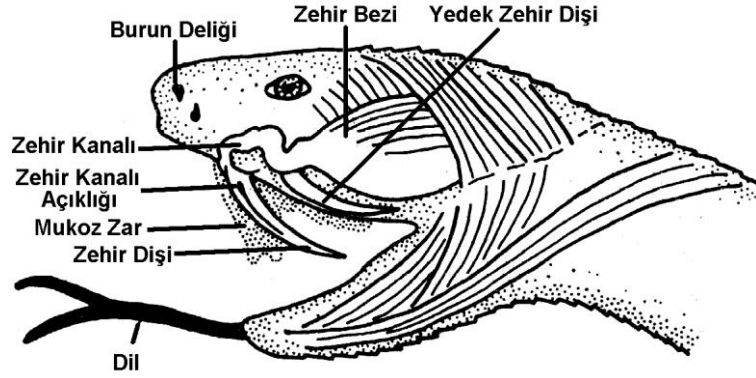
Bufo melanostictus tan elde edilen bufolin K562(insan kemik iliği) kronik miyeloid lösemi hücrelerine verilmiş, sonuç olarak WT1 ekspresyonunu düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca bufolinin konsantrasyonun artması DNA sentezini ve topoizomerez 2 aktivitesinin inhibe etmektedir. Ayrıca bufalin hücre siklusunda ML1 hücrelerini G2 fazında U937 hücrelerini seçici olarak S ve G2 fazında durdurmuştur (Hashimoto ve ark. 1997).

Bufo melenisticus tan izole edilmiş BM-ANF1 in lösemi ve hepatoselüler kanser hücre hatlarında antiproliferatif ve sitotoksik özelliklere sahip olduğu, BM-ANF1'in sitotoksik özelliğini kaspaz-3 ün up-regülasyonu ile oluşturduğunu, tümör supresör geni olan p53 geni ve DNA sentezinde düzenleyici molekülleri etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca BM-ANF1 hücre siklusunda tümör hücrelerini G1 fazında durdurduğu rapor edilmiştir (Gomes 2007 b).

Ghavami ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada Non- hemolitik bir defensin olan Brevenin 2R *Rana ridibunda* derisinden izole edilmiş ve T hücre lösemileri, B hücre lenfoması, kolon kanseri, fibrosarkoma, meme adenokarsinoması ve akciğer adenokarsinom hücre hatlarında sitotoksik özelliğinin olduğunu gösterilmiştir. Brevenin 2R pro-apoptotik moleküllerin ekspresyonunun ve reaktif oksijen moleküllerinin artmasına, mitokondriyal zar potansiyelinin azalmasına sebep olmuştur. Ayrıca breveninin 2R lizozomal mitokondriyal ölüm yolağını aktive ederek otofajiye sebep olduğu bildirilmiştir.

2.3.5.Yılan zehirleri

Yılan zehirleri tükürük bezlerinin değişip farklılaşması sonucu oluşan özelleşmiş zehir bezlerinde oluşmaktadır (Budak ve Göçmen 2008). Yılan zehirleri bir çok protein, peptit, enzim, toksin içermektedir Yılan zehirinin içeriği yaşa, cinsiyete, ekolojik etkilere ve beslenme koşullarına göre değişebilir.(Daltry 1996 ; Furtado 2006 ; Arıkan 2014 ; Chippaux 1991)



Şekil 2.3. Zehirli bir yılanda zehir bezinin konumu ve zehir dişlerinin duruşu (www.turkherptil.org/MenuDetay.asp?MenuId=26&altMenuId=93)

Yılan zehirleriyle ilgili yapılan çalışmalar genel olarak şu başlıklar altında toplanabilir;

1. Peptitlerinden veya diğer içeriklerinden, ilaç (antikanser antikougulan antimikrobiyal vb.) geliştirme amaçlı yapılan çalışmalar (Calvete ve ark. 2007, Vetter ve ark. 2010).
2. Yılan ısırıklarına veya ısırık sonrası zehirlenmelerine karşı etkin tedavi geliştirme amaçlı çalışmalar (Gibbs ve ark. 2009, Boldrini-França ve ark. 2010)
3. Farklı coğrafik bölgelerde, farklılık gösteren zehirlere karşı anti serum geliştirmeye yönelik çalışmalar (Fry ve ark. 2003, Gutiérrez ve ark. 2009)
4. Yılan zehirlerinin sistematik alanında kullanılmasına yönelik çalışmalar (Sanz ve ark.2008).

Yılan zehirlerini 3 tip olarak sınıflandırabiliriz.

- Nörotoksik olanlar (insan vücudunda sinir sistemi üzerine etki edenler)
- Hemotoksik olanlar (kardiovasküler sistem üzerine etki edenler)
- Sitotoksik olanlar (özel olarak hücreleri veya dokuları hedef alarak etki edenler) (Goswami 2014)

Nörotoksinler sinir sistemi üzerine ileri derecede etki yapmakta, kalp ve/veya solunum problemlerine sebep olmaktadır. Nörotoksinler etkilerini sinapslarla nöronlar arasındaki iletişimi engelleyerek ya da nöron zarında iyon geçişini inhibe ederek gösterir. Bu toksinler sinir sisteminde asetilkolinin bağlanma bölgelerinde asetilkolinin şeklini alarak asetilkolini taklit eder ve bağlanmasını engeller (Bradbury ve Deane 1993).

Hemotoksin olarak bilinen toksinler ise eritrositler üzerine etki etmekte ,dolaşım sisteminde ve kas dokularında zararlara ve kangrene sebep olur. Kardiotoksinler özellikle kalp üzerine etki eden yapıya sahiptir. Bunlar kalbin kaslarına bağlanarak kalp kasının kasılmasını önlemektedir (Yang ve ark. 2005)

Viperidae familyasında bulunan çingiraklı yılanlar, bakır kafalı yılan ve su mokaseni gibi yılanların zehirleri hemotoksik olmasına rağmen kobralar, mambalar, deniz yılanları, mercanyılanları ve bungarus cinsi yılanların zehirleri nörotoksiktir. Fakat bazı yılan türleri zehirlerinde hem nörotoksik hem de hemotoksik bileşikler içerebilir.

Geçmişten günümüze kadar biyotoksinler çok farklı şekilde kullanılmış günümüzde biyoteknoloji ve moleküler biyolojinin gelişmesiyle bu alanda yapılan çalışmalar artmış ve birçok yeni ilaç geliştirilmiştir. Özellikle yılan zehirlerinin kan hücrelerine olan etkilerinin araştırılması sonucu geliştirilen, kan pıhtılaşması üzerine etki eden birçok molekül bulunmuştur. Bu anlamda engerek zehirlerinden elde edilen Integrilin® (*Echis carinatus* zehrinden) ve Aggrastat® (*Sistrurus miliaris* zehrinden) ilaçlar antiagregan olarak kullanılmaktadır (Zeymer ve Wienbergen 2007, Batchelor 2002, Du ve ark 2006).

Zehirler tek bir yapıdan değil yüzlerce hatta binlerce peptit protein ve kimyasaldan oluşmaktadır. Farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda şu ana kadar 20 farklı tip toksik enzim bulunduğu bilinmektedir. En yaygın olarak yılan zehirlerinde L-amino oksidazlar, serin proteazlar, metalloproteinazlar ve fosfolipaz A2 bulunmaktadır (Kang ve ark. 2012).

Çizelge 3.1. Yılan zehirlerinin içerisinde bulunan başlıca maddeler.(Braga ve Fox 1994, Inqueira ve Ho 2002, Romos ve Araujo 2006, Mackessy 2009, İğci 2010).



2.3.5.1. Yılan zehirlerinde bulunan bazı enzimler

2.3.5.1.1. Kolinesterazlar

Kolinesterazlar nöral sisteme saldırarak kasların kasılmasına kontrol dışı kalmasına ve nöral impulsların aktarılmasına engel olmaktadır. Orgonofosfor zehirlenmelerinde ve önleyici tedavilerinde etkili bir terapötik ilaç olarak orgonofosfor bileşiklere karşı yüksek etkisi olduğundan kullanılabilir (Cohen 2001).

2.3.5.1.2. Hiyaluridazlar

Hiyaluridik asit hayvanlar aleminde çok fonksiyonlu yüksek moleküler ağırlığa sahip bir polisakkarit olup özellikle yumuşak bağ dokularla ekstraselüler matris arasında bulunur.

Hiyalurinidaz, hiyaluridik asidin beta N-asetil glikozamin bağlarını parçalayarak endoglikosidaz işlevi görür. Hiyalurinidaz akrep arı gibi hayvanların zehirlerinde de bulunur ve yayılma faktörü olarak adlandırılır. Hiyalurinidaz ekstraselüler matrikste hasara yol açar ve diğer toksinlerin hızlı bir şekilde yayılmasına sebep olur. Hiyalurinidazın, ısırık bölgesindeki doku hasarlarını minimize etmek ve zehrin sistemik hasarlarını inhibe etmek için fonksiyon ve özelliklerinin araştırılması gerekmektedir (Kemparaju ve Girishy 2006, Girish ve Kemparaju 2007, Lokeshwar ve Selzer 2008).

2.3.5.1.3. Fosfolipaz A2

Fosfolipaz A2 (PLA2) hücre sinyalleri, hücre büyümesi, prostaglandin ve lökotrienlerin oluşumu gibi bir çok önemli biyolojik süreçte rol oynamaktadır (Rodrigues ve ark. 2009) Bu enzim serbest yağ asitlerinin oluşumu ve lizofosfolipitlerin oluşumu için çok çeşitli fosfolipitlerin sn-2açil ester bağlarını hidrolize etmektedir. Memelilerde fosfolipaz A2 hücre zarının homeostazisi, tekrardan üretimi, sinyal üretimi ve fosfolipit metabolizması gibi birçok önemli rol oynamaktadır.(Gao ve ark. 2005) Ayrıca fosfolipaz A2 nin anti-koagulan, hemolitik, nörotoksik, myotoksik gibi farmakolojik özellikleri bulunmaktadır. Fosfolipaz A2 iki farklı gruptan oluşur hem 1PLA2 hemde 2LA2 moleküler ağırlıkları 85-110 kDa arasında olup intraselüler enzimdir ve hücre sinyal yollarında görev alır.1PLA2 genellikle kobra, deniz yılanları ve bungaruslarda bulunurken 2PLA2 engerek ve çingiraklı yılanlarda bulunur (Arunmozhiarasi ve ark. 2009).

2.3.5.1.4. Metalloproteinazlar

Son 40 yıldır metalloproteinazların kanama, ödem, hipotansiyon, hipovolemi, infiltrasyon ve nekroz gibi semptomların gelişiminde anahtar rol oynadığı hakkında araştırmalar artmıştır (Fox ve Serrano 2005). Bu enzimler hemostatik sistemin içeriğini ve ekstraselüler matriksin proteinlerini degrade eden aynı zamanda endotelial hücreler üzerine sitotoksik etkisi bulunan çinko endopeptidaz ailesine aittir (Panfoni ve ark 2010). Bu enzimler kılcal damarlarda sistemik ve lokal kanamalara veya farklı yollarla lokal doku hasarlarına neden olabilir (Escalante ve ark 2011).

2.3.5.1.5. L-aminoasit oksidazlar

L-AAO yılan zehirine sarı rengini veren bileşiktir, alfa hidroksi asidin ve L –alfa amino asidin oksidasyonuna sebep olurlar.

2.3.5.1.6. Fosfodiesteraz

DNA da ve RNA da ekzonükleaz olarak görev yaparak polinükleotid zincirinden mononükleotitlerin serbest kalmasını sağlar ve bütün yılan zehirlerinde bulunmaktadır.

2.3.5.1.7. 5'-Nukleotidaz

Nukleotidaz yılan zehirlerinden etkili fosfotazlardan biridir. DNA ve RNA da 5' durumundaki fosfat mono ester bağlarını hidrolizinde bulunmaktadır.

2.3.5.1.8. Trombin

Trombin fibrinojenin aktivitesinden sorumludur ve plazmanın pıhtılaşmasından sorumludur.

2.3.5.1.9. Trombin Benzeri Enzimler

Yılan zehirleri çeşitli proteolitik enzimler içerir. Kanın pıhtılaşma sürecini etkilemektedir. Bir kaç farklı zehirde bulunan serin proteazlar kısmen de olsa trombin benzeri işlev göstermektedir. Bu yüzden trombin benzeri enzimler olarak isimlendirilirler. Bu enzimler glikoprotein yapılı olup moleküler ağırlıkları 29 000 ile 35 000 arasındadır. Bu enzimlerin bazıları prokoagülant özellikler göstermesine rağmen bazıları ise antikougülant özellikler göstermektedir. Crotolaz, batroxobin, agkistrodon ve ancrod gibi trombin benzeri enzimler birçok farklı yılan türünden izoleedile bilmektedir. Ancrod deneysel olarak trombus oluşturulan köpekte trombosis önlediği gösterilmiştir. Crotalase ve batroxobinin hayvanlarda yapılan çalışmalara göre, fibrinin yanık bölgeye yerleşmesini engellediği görülmüştür. (Vyas ve ark. 2013, Castro ve ark. 2004)

2.3.5.2. Yılan zehirlerinin anti kanser araştırmalarda kullanımı

Bothrops cinsi yılan türlerine ait zehirlerin in vitro genotoksik etkileri insan lenfositlerinde mikronükleus ve komet testleri kullanılarak araştırılmış ve DNA/kromozom hasarlarında önemli derecede artış olduğu bildirilmiştir (Marcussi ve ark., 2013). Aynı araştırmacılar tarafından yürütölen bir diğer çalışmada ise *Crotalus durissus terrificus* zehrinin insan lenfositlerinde genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Marcussi ve ark. 2011).

Isabel ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada *Bothrops leucurus* zehrinin düşük dozların böbrek epitel hücre hattı MCDK'da kaspaz ekspresyonunu arttırıp apoptoza sebep olduğunu yüksek dozlarda ise nekroza sebep olduğunu göstermişlerdir.

Gustavo ve ark.(2010) *Bothrops leucurus* zehrinde bulunan L-aminooxidaz enziminin toksik etkilerini MKN-45, HUTU, RKO ve LL-24 hücre hatlarında incelemiş ve bu enzimin tüm hücrelerde apoptoz ve nekroza sebep olduğunu ayrıca sitotoksik ve antikanser etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Sara ve ark. (2015) ise pankreatik tümör hücrelerinde yaptıkları çalışmada *Crotalus scutulatus* ve *Crotalus viridis* zehirlerinde bulunan r-majastin 1 ve r- viridistatin 2 peptitlerinin özellikle proliferasyon adhesyon ve migrasyon ve apoptoz gibi metastaz kaynaklarını etkilediğini göstermişler ve yılan zehirlerinde elde edilen bu iki peptidin pankreatik tümörlere karşı geliştirilecek ilaçlar için bir aday olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Mohomed ve ark (2013) tarafından yürütölen bir diğer çalışmada *Walterinnesia aegyptia* zehrinin insan multiple miyoloma hücre hattı U266'ya silika nanopartiküllerle birlikte verildiğinde mitokondrial membran potansiyalinin değiştiği, kaspaz -3, -8 ve -9 un aktivitesinin arttığı, hücrelerin apoptoza gittiğini ve miyolamanın durduğu gözlemlenmiştir.

Bir diğer çalışmada ise *Vipera ammodytes* zehrinden elde edilen Ammodytin-L (Fosfalipaz benzeri) in vitro koşullarda miyotubullerde sitotoksik olduğunu ve farklı konsantrasyonlarda ammodytin-L'nin miyojenik hücrelerde, eritrosit trombosit ve fibroblastlarda nekroza sebep olduğunu gösterilmiştir (Bernardini ve ark. 1996).

İnsan androjen bağımsız prostat kanseri (PC-3) hücre hattı, androjen bağımlı prostat kanseri (LNCaP) hücre hattı ve kronik miyeloid lösemi (K562) hücre hatlarında yapılan bir çalışmada ise *Vipera lebetina* zehrinin jel filtrasyon yöntemiyle molekül ağırlıklarına göre 9 farklı fraksiyona ayrılmış molekül ağırlığı yüksek olan fraksiyonda PC-3 hücre hattı üzerine yüksek etkili olduğu gösterilmiştir. Metalloproteinaz içeren fraksiyonlarda PC-3 hücre hattında doza ve zaman bağılı olarak yüzde canlılığı düşürdüğü gösterilmiş, fakat DNA fragmentasyon testleri sonucu apoptozla öldürmediği rapor edilmiştir. Metalloproteinaz içeren fraksiyonlarda LNCaP ve K562 hücre hatlarında canlılık açısından anlamlı etki gözlenmemiştir (Samel ve ark. 2012).

Jokhio ve Ansari (2005) yaptıkları çalışmada kobra yılanının zehrinin meme kanseri dokularında kanserli dokuya seçici davranarak nukleik asit sentezine inhibe ettiğini göstermiş böylece kobra zehrinin hücre proliferasyonu üzerine etki ettiği ve antikanser ilaç olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğunu belirtmişlerdir.

Sitotoksinler kobra zehirlerinde bulunan ve birçok fizyolojik etkiye sahip polipeptitlerdir. Cytotoxin-II insan meme adenokarsinoma hücre hattında (MCF-7) araştırılmıştır. Cytotoxin-II ($IC_{50} 4.18 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$) MCF-7 hücre hattında anti kanserojen ilaç olarak kullanılan cisplatinden ($IC_{50} 28.02 \pm 1.87 \mu\text{g/mL}$) daha etkili olduğu gösterilmiştir. Zamana ve doza bağılı olarak reaktif oksijen miktarlarını artırdığı tespit edilmiş, akridin oranj ve etidyum bromid boyamalarıyla MCF-7 hücrelerini apoptozla öldürdüğü, mitokondriyal membran potansiyelini düşürdüğü ve hücre siklusunda G1 fazında duraklattığı gösterilmiş böylece Cytotoxin-II gelecekte anti kanser ilaç olarak kullanılabilme potansiyelinin bulunduğunu rapor edilmiştir (Karim ve ark. 2014).

Naja kaouthia ve *Vipera russelli* türlerinde elde edilen zehirlerin sub-letal dozlarda in vivo koşullarda Ehrlich ascites carcinoma (EAC) hücreli Balb C farelerde üzerine sitotoksik etkisinin olduğu yapılan histopatolojik deneylerde tümör dokusunda nekrozun oluştuğunu ve antioksidan sistemin güçlendiği rapor edilmiştir. Ayrıca zehirlerin potansiyel olarak sitotoksik ve apoptogenik özelliklerindeki olduğu insan lösemi hücre hatlarında (U937/K562) gösterilmiştir (Anindita ve ark. 2007).

2.3.5.3.Yılan Zehirleri İle İlgili Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Yapılan literatür taramalarında ülkemizde de yılan zehirleriyle yürütülen çeşitli çalışmalara rastlanmış olmakla birlikte, bu çalışmaların genellikle histopatolojik ve zehir bileşimlerine yönelik biyokimyasal analiz temelli çalışmalar olduğu görülmektedir.

Örneğin, Arıkan ve ark.(2003) tarafından yapılan bir çalışmada Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan 5 farklı engerek (*Vipera xanthina*, *Vipera ammodytes*, *Vipera kaznakovi*, *Vipera wagneri* ve *Vipera lebetina*) türünün zehir ekstraktlarının poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile incelenmiş ve zehir proteinlerinde önemli farklar olduğu bildirilmiştir.

Topyıldız ve Hayretdağ (2012) *Montivipera xanthina* zehrinin deri iskelet kası ve karaciğer dokularındaki histopatolojik etkilerini incelemiştir. 2,85mg/kg gastrocnemius kasına enjekte edildiğinde, derinin epidermis kısmında hasara, dermis kısmında ise ödem ve hemoraji lokal kanlanmalara yol açtığını gözlemlemiştir. Kas dokusunda miyonekroz, karışık karakterli hücre infiltrasyonu, hemoraji, miyofibrillerde inkluzyon oluşumu ise gözlenen diğer hasarlardır. Karaciğer dokusunda ise sinuzoidal kanlanma ve hepatoseluler dejenerasyon olduğu bildirilmiştir.

Vipera kaznakovi ve *Vipera ammodytes* zehirleri üzerine yapılan bir çalışmada iki tür yılanın farklı büyüklüklerde örneklerinden zehirler alınmış ve zehirlerin yaşa bağlı olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. türün kendi içindeki yaş farklarında zehir içeriklerinin farklı olabileceği bunda antiserum üretiminde daha etkili anti serumların üretilmesi konusunda yardımcı olacağı bildirilmiştir.(Arıkan ve ark. 2014)

Kıbrıs ve Güney Anadolu da yaşayan koca engerek (*Macrovipera lebetina*) türleri morfolojik hemipenis ve zehir proteinleri açısından karşılaştırılmış ve her iki popülasyon arasında dikkate değer farkların bulunduğu saptanmıştır. Bu farklılıklara bakılarak Güney Anadolu popülasyonunun Kıbrıs'taki nominant alt tür, (*M.lebetina lebetina*) olarak ele alınamayacağına sonucuna varılmıştır (Göçmen ve ark. 2006 a).

Bunun yanında Kıbrıs'tan toplanan 75 cm uzunluğunda ergin erkek bir Koca engerek, *Macrovipera lebetina lebetina* (Linnaeus) tarafından kazara (40 yaşındaki erkek bir araştırmacı) ısırılmıştır. Isırılmadan hemen sonra ortaya çıkan klinik belirtileri ve önemli semptomlar gözlenmiş, Ödem, hipotansif şok, hemoraji, doku nekrozu, melanodermi ve albumin, globulin, albumin/globulin oranlarında kantitatif açıdan önemli farklılıklar ortaya çıktığı belirlenmiştir. Kan yayma preparasyonlarından gerçekleştirilen ölçümler ve biyokimyasal sonuçlar RBC, MCV, MHV ve kan hücrelerinin normal boyutlarında düşüş, WBC de ise artış olduğunu göstermiştir (Göçmen ve ark.2006 b).

Yalçın ve ark. (2014) tarafından yürütülen bir çalışmada ise, *Montivipera xanthina*'dan elde edilen zehrin 24 ve 48 saatlik IC50 dozlarının etkilerini 6 farklı hücre hattında (HT-29, SaoS-2, MCF-7, LNCap, Hep3B, Vero) yalnızca MTT yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda bu yılan zehrinin Hep3B ve Vero hücreleri hariç tüm hücre hatlarında antiproliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Özgün ve ark. (2015) yaptığı çalışmada, *Macrovipera lebetina obtusa* zehrinin çeşitli kanser hücreleri (A549,HeLa, CaCo-2, U-87 MG ve MCF-7) ve sağlık hücre hattında (Vero) MTT test yöntemiyle IC₅₀ konsantaryonları bulunmuş, gram negatif ve gram pozitif bakterilerde MIC (minimum inhibitory concentration) saptanmıştır. Ayrıca zehrin anti fungal etkisi *C.albicans* üzerinde araştırılmıştır. Sonuç olarak *Macrovipera lebetina obtusa* zehrinin sitotoksik, antimikrobiyal ve antifungal etkisinin olduğu ve ilaç geliştirme için aday olabileceği belirtilmiştir.

2.3.5.4. Tez Çalışmamızda Kullanılan Yılan Türleri Ve Ekolojileri

Ülkemizde yaşayan yılan türlerinin yaklaşık olarak % 10'unun zehirli olduğu bilinmektedir. Bu türler arasında ülkemizin değişik bölgelerinde yayılım gösteren türler arasında Viperidae familyasından şeritli engerek (*Montivipera xanthina*) ve boynuzlu engerek (*Vipera ammodytes*) bulunmaktadır.

Montivipera xanthina (Şeritli engerek), boyu 70-80 cm kadardır (Şekil 2.4). Başın üst tarafı gözlerin üzerindeki ince Supraocular plaklar haricinde, küçük ve karınalı pullar ile örtülüdür. Sırt tarafı gri kahverengi ve üzerinde iri, art arda koyu lekeler bulunur. Bu koyu lekeler baklava dilimi yahut yuvarlağımsı, bazen de zikzak bant şeklindedir. Ventrali sarımsı beyaz, üzerinde koyu nokta veya küçük lekeler vardır. Bu cinsin diğer türleri gibi *Montivipera xanthina*'da ovovivipardır, yani yumurta gelişimi uterusu gerçekleştirir ve canlı doğum yapar. Dağlık bölgelerde ormansız ve taşlık yamaçlarda yaşar. 200 m yüksekliğe kadar rapor edilmiştir. Gece aktiftirler. Hareketleri oldukça yavaştır, avlarını zehirleyerek öldürürler. Genellikle uygun yerde avlarının yaklaşmalarını beklerler. Zehri insan için tehlikeli olabilir. Rahatsız edilmedikçe ve ya kendini tehlike altında hissetmedikçe insana saldırmazlar. Türkiye'de Orta, Güney ve Batı Anadolu'da yayılmıştır. Ülkemizde nominat tek alttür, *M. x. xanthina* ile temsil edilir.



Şekil 2.4. Bir *Montivipera xanthina* (Şeritli engerek) örneği

Vipera ammodytes (Boynuzlu engerek), toplam uzunluğu 90 cm kadardır (Şekil 2.5). Başın ön ucundan yukarıya kalkık ve üzeri pullarla kaplı boynuz şeklinde etli bir çıkıntı bulunur. Başın üstünde yalnız göz üstü plakları (Supraocular plaklar) mevcuttur. Başın diğer kısımları küçük pullarla örtülüdür. Sırt tarafı gri kahverengi ve bu zemin üzerinde koyu zikzak bir bant bulunur. Ventrali sarımsı beyaz ve üzeri siyah noktalı veya lekelidir. Bodur bitkilerle örtülü kuru ve taşlık biyotoplarda yaşarlar. Hareketi yavaştır. Sıcakkanlı hayvanları zehirleyip öldürdükten sonra, soğukkanlı hayvanları ise canlı yutarlar. Zehirleri insan için tehlikelidir. Tür güney doğu Avrupa ve batı Asya'da dağılışı gösterir. Yurdumuzda Orta ve Güneydoğu Anadolu hariç, her yerde bulunur. *V. a. mantandoni* ve *V. a. meridionalis* olmak üzere 2 alt türü bilinir (Budak ve Göçmen 2005, Akkaya ve Uğurtaş 2012).



Şekil 2.5. Bir *Vipera ammodytes* (boynuzlu engerek) örneği

3. MATERYAL YÖNTEM

Bu çalışmada *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin, sitotoksik etkileri A549 insan akciğer kanseri hücre hattı ve Beas-2B insan sağlıklı bronş epitel hücre hattında, XTT testi ve klonojenik test ile araştırılmıştır. *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin genotoksik etkileri ise komet testi ile değerlendirilmiştir. Hücre içi reaktif oksijen seviyesine etkileri ROS testi ile ölçülmüştür.

3.1 Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1 de, sarf malzemelerine ilişkin bilgiler ise Çizelge 3.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar

Ekipman	Marka/Model
Etüv	BINDER – CB 150
Soğutmalı santrifüj	SIGMA-2-16PK
Laminar akım kabini	BERNER
Hassas terazi	SHIMADZU-AUW220D
Kaba terazi	RADWAG-WTB2000
Pastör fırını	Elektro.mag-M3025P
İnvert mikroskop	SOIF
Floresan mikroskop	NIKON-ECLIPSE 80i
Işık mikroskobu	NIKON-ECLIPSE E100
Komet yazılımı	Kameram 21
Elektroforez güç kaynağı	PeqLab-Reqpower 300
Elektroforez tankı	Cleaver Scientific
Mikroplaka okuyucu	Bio Tek, ELx800 U.S.A
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
Ph metre	HANNA – HI 221
+4 buzdolabı	REGAL
Manyetik Karıştırıcı	ISOTEX
-20 derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
-80 derin dondurucu	ELCOLD
Karıştırıcı-ısıtıcı	M TOPS MS300HS
Hücre sayım cihazı	CEDEX XS
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Firma/ Katalog No
Serolojik pipet	COSTAR
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT-MIDI PLUS/ Dragon MED Levo plus
Steril 15 ml'lik tüpler	ISOLAB
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	NEST BIOTECHNOLOGY
RPMI-1640 (500 ml)	PAN BIOTECH/ P04-22100
Penisilin-Streptomisin	SIGMA/ P0781
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA/ RNBB4386
Fetal-Bovine serum	PANBIOTECH/ P30-1985
Sodyum pirüvat (100 ml)	PANBIOTECH/ P04-43100
EDTA disodium salt	CARLO ERBA/ 303201
DPBS	PANBIOTECH/ P04-36500
Etanol	MERCK
NaCl	MERCK/ 7647-14-5
NaOH	SIGMA/ S8045-1 KG
Triton X-100	GERBU/ 34021300
Lowmelting Agaroz	SIGMA/ A9414-25G
Normal Agaroz	SIGMA/ A9539-100G
DMSO	MERCK/ K39661843
Tripsin-EDTA	GIBCO/ 1304898
DCFH-DA (ROS Kit)	Cell Biolabs'OxiSelect™ / 59342021
Hücre proliferasyon kiti	BIOLOGICAL INDUSTRIES/1548576
Cosmasie Brillant blue G-250	7815 SIGMA Brilliant Blue G 250

3.2. Kullanılan Hücre Hatları

Tez çalışmasında A549 insan akciğer kanseri hücre hattı ve Beas-2B insan sağlıklı bronşiyal epitel hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler havalandırılmalı T75 flasklar içinde 37 °C ve %5 CO₂ ortama sahip inkübatörde inkübe edilmiştir. Flasklara bulunan besiyeri: 500 ml RPMI Medium + 60 ml FBS (fetal bovine serum) + 3 ml L- glutamine, 6 ml penisilin-streptomisin, 6 ml sodyum pirüvattan oluşmaktadır.

Hücrelerin pasajlanma prosedürü;

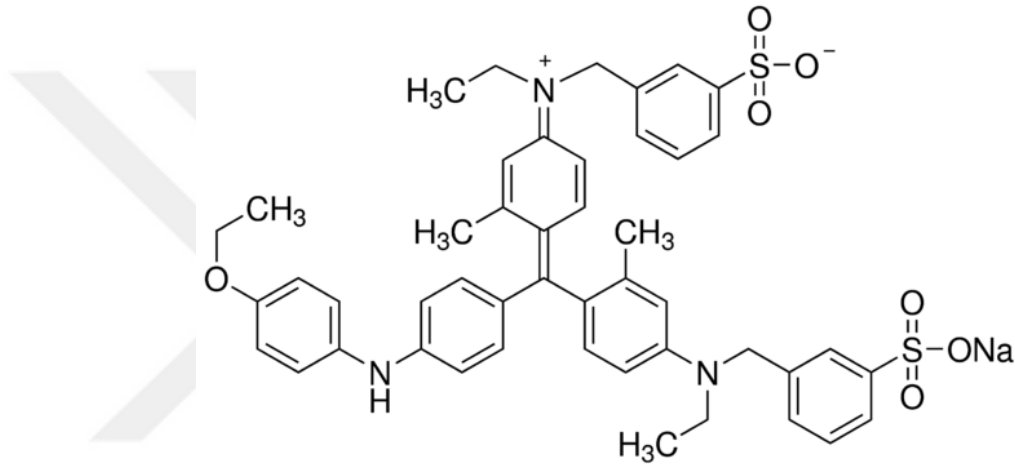
Flasklardaki besiyeri uzaklaştırılır. Bu işlem sırasında hücreler flask yüzeyine yapışık olduklarında hücreler flask tabanından ayrılmazlar. Hücreler daha sonra PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanır ve PBS flasktan uzaklaştırılır. Bu işlemin ardından flasklara tripsin eklenerek inkübatöre de 2- 3 dk bekletilir, bu işlem flask tabanına yapışmış hücrelerin flasktan ayrılmasını sağlar. Tripsin reaksiyonunu durdurmak için eklenen tripsin miktarı kadar besiyeri eklenir ve hücreler 15 ml lik tüplere toplanarak +4 °C'de 2500 rpm de 5 dk boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatant atılarak hücreler süspanse edilir. Yeni flasklara besiyerleri eklendikten sonra hücre süspanسیونundan hücreler flasklara aktarılır.

3.3. Kullanılan Yılan Zehirlerinin Elde Edilmesi

Bu çalışmada *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirleri kullanılmıştır. Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalına bağlı Zooloji müzesinin imkânları kullanılmıştır. Yılan zehirlerinin içeriği yaşa, coğrafi bölgeye, beslenme koşullarına göre değişebilmektedir bu farklılaşmayı minimize etmek için *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* türleri, yapılan arazi çalışmalarında farklı lokalitelerden ve farklı boylarda toplanmış Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Müzesinde tutulmuştur. Ayrıca beslenmenin zehir içeriğine olan etkisini azaltmak amacıyla haftada bir fare ile beslenmiştir. Yılanlardan zehir alma çalışmaları parafin gerilmiş steril beherleri yılanların ısırması sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Mikrosantrifüj tüplerine alınarak 5000 rpm 10 dk. santrifüj edilip istenmeyen hücre kalıntılardan arındırılmıştır. Süpernatant kısmı alınarak hücre kültürü çalışmaları başlayıncaya kadar -80 °C de saklanmıştır.

3.4. Zehirlerin Total Protein İçeriklerinin Belirlenmesi (Bradford Yöntemi)

Bradford yönteminde Cosmasie Brilliant blue G-250 boyasının (Şekil3.1.) farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak değişik renk şiddetine sahip mavi renkli çözeltiler ortaya koyma özelliğinden yararlanılmaktadır. Mavi rengin oluşumunda proteinlerin aminoasit bileşimleri önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik aminoasitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlandığı gösterilmiştir. Bu yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir (Bradford 1976).



Şekil 3.1 Cosmasie Brilliant blue G-250 boyasının kimyasal yapısı (www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/27815?lang=en®ion=TR)

Bradford prosüdüğü

Tampon Çözeltilerin hazırlanması ;

0,2 M pH:8 Sodyum Fosfat tamponunun hazırlanması

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8,725 gr tartılır ve 245 ml dH_2O da çözülmüştür.
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7,96 gr tartılır ve 255 ml dH_2O da çözülmüştür.

Cosmasie Brilliant blue G-250 boyasının hazırlanması

- 12,5 ml etanol içerisinde 0,025 gr Cosmasie Brilliant blue G-250 boyası çözülmüştür.
- Çözülen boyanın üzerine 25 ml % 85 lik H_3PO_4 ilave edilir ve dH_2O ile 250 ml ye tamamlanmıştır.

Bovine serum albuminin (BSA) hazırlanması

- 0,01 gr Bovine serum albumin (BSA) 20 ml dH_2O da çözülmüştür. (500 mg/L)

Standartların hazırlanması;

Çizelge 3.3. Bradford yöntemi için hazırlanan standartların derişimleri

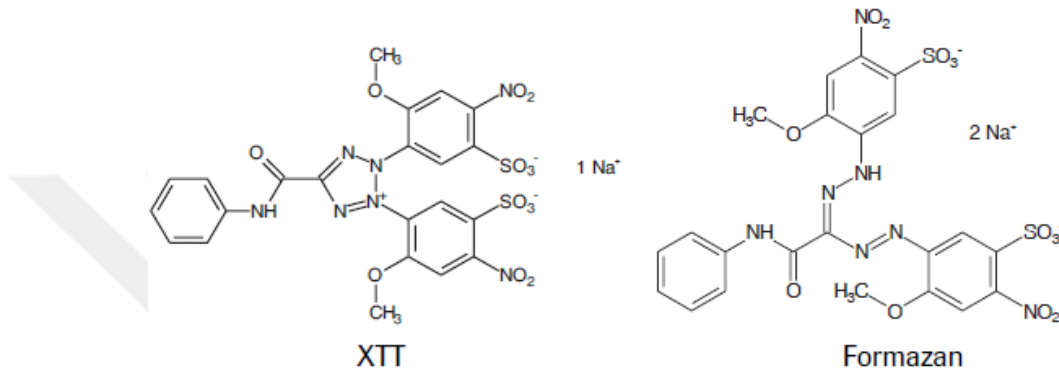
No	Derişim (mg/L)	Stok BSA (ml)	Tampon (ml)
1	500 mg/L	5 ml	0 ml
2	300 mg/L	3 ml	2 ml
3	200 mg/L	2 ml	3 ml
4	100 mg/L	1 ml	4 ml
5	70 mg/L	0,7 ml	4,3 ml
6	50 mg/L	0,5 ml	4,5 ml
7	30 mg/L	0,3 ml	4,7 ml
8	15 mg/L	0,15 ml	4,85 ml

Bradford protein miktar tayin deneyinin yapılışı;

8 adet 15 ml'lik tüpe 3 ml hazırlanmış olan Cosmasie Brilliant blue G-250 boyası eklenmiştir. Ayrıca ayrı ayrı *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirleri için 3 ayrı tüp hazırlanmış ve bu tüplere de 3 ml Cosmasie Brilliant blue G-250 boyası eklenmiştir. Her bir standarttan 3 ml boya bulunan tüplere 100 µl eklenmiş ve zehirler için hazırlanan tüplere *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinden 100 µl eklenmişti. Bu tüpler karanlık ortamda reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dk. vortekslenmiştir. 30 dk sonra 595 nm de spektrofotometrede okunmuştur. Standartlardan absorpsiyon eğrisi çizilmiş ve bu eğriden yararlanılarak *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirleri için protein miktarları tayin edilmiştir.

3.5. XTT Testi

Hüresel proliferasyonun ve canlılığın belirlenmesinde çok çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. XTT test yöntemi sarı tetrazolyum tuzunun (XTT) metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından portakal renkli formazan boyasına ayrılmasına dayanmaktadır. Bu dönüşüm sadece canlı hücrelerde oluşur. Formazan boyalar sulu çözeltilerde çözünebilir ve doğrudan spektrofotometre tarafından ölçülebilmektedir. (Scudiero ve ark. 1988)



Şekil 3.2. Canlı hücrelerde XTT metabolizasyonu sonucunda suda çözünebilir formozan oluşumu

XTT Testi Protokolü;

Hücrelerin 75 cm²lik flaslarda 1 hafta boyunca büyümesi beklenmiştir. Flaslarda %80 doluluğa ulaştığında pasajlanarak hücreler 96 kuyucuklu platelere ekilmiştir. A549 ve Beas-2B hücre hatları için her bir kuyucuğa 5×10³ hücre eklenmiştir. 37 °C ve %5 CO₂ ortamlı inkübatörde 24 saat inkübe edildikten sonra besi yeri değiştirilmiş ve *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinden 0,1 ile 12,8 µg/ml arasında değişen farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 24 saatlik muameleden sonra kuyucuklar PBS ile yıkanmış ve 100 µL yeni besiyeri eklenmiştir. Her bir kuyucuğa aktive olmuş XTT solüsyonu eklenmiş ve 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikropilaka okuyucu ile 450nm’de absorbans ölçülmüştür. Blankler çıkarıldıktan sonra (1- A muamele grubu / A kontrol) x100 formülü kullanılarak hesaplanmıştır ve proliferasyon eğrisi çizilmiştir. Proliferasyon eğrisinden *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* için ayrı ayrı A549 ve Beas-2B IC₅₀ dozları hesaplanmıştır.

Kimyasalların Hazırlanması;

- Kimyasallar deneyden hemen önce 37 °C’de ısıtılarak eritilmiştir.
- XTT ölçüm solüsyonunu hazırlamak için XTT solüsyon A’ya 1:50 hacim oranında elektron bağlama solüsyonu eklenmiştir. Örneğin 96 kuyucuklu platete 5000 µl XTT solüsyonu için 100 µl aktive edici ajana ihtiyaç duyulmaktadır.

3.6. Klonojenik Test

Klonojenik test, bir hücrenin bir koloni yada klon oluşturacak şekilde üreme yeteneğinin korumasına ve devamlı bölünebilme yeteneğine dayanmaktadır. Bu şekilde üreyen hücrelere klonojenik hücre denir. Hayatta kalma eğrisi dozlar arasındaki ilişkileri gösterir. Klonojenik test ilk olarak radyasyon etkilerini incelemek amacıyla yapılmış olmasına rağmen günümüzde yaygın olarak ajanların etkilerini incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu testte yeteri kadar bölünemeyen hücreler ölü olarak değerlendirilir. Bu nedenle koloni sayımı yapılırken 50 hücreden küçük olan koloniler sayılmamaktadır (Franken ve ark. 2006).

Klonojenik test protokolü;

- 1) T75 flaksta bulunan ve %80 konfluent olan flakslar hücreler pasajlanmıştır. Flakslardan toplanan hücreler +4 °C’de 2500 rpm’da santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra hücrelerin supernatant kısmı atılmış ve hücreler süspanse edilmiştir. Toplam hücre sayısı hücre sayım cihazında hesaplanmıştır. Deney gruplarımızın sayısı kadar T25 flaska istediğimiz sayıda hücre eklenmiştir.
- 2) Ekimden birkaç gün sonra hücreler T25 flakslarında %80 doluluğa ulaştıklarında flakslar *Montivipera xanthina* için kontrol grubu, 0,4 µg/ml, 0,6 µg/ml, 0,8 µg/ml, 1,6 µg/ml, 2,4 µg/ml ve 3,2 µg/ml olacak şekilde dozlama yapılmıştır. *Vipera ammodytes* için ise kontrol grubu, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,6 µg/ml ve 0,8 µg/ml konsantrasyonlarında dozlanmıştır.
- 3) Dozlamadan 24 saat sonra flakslardaki hücreler pasajlanır ve 15 ml lik tüplere alınmıştır. Santrifüj işleminden sonra supernatant kısmı atılarak ve kalan hücreler süspanse edilerek canlı hücre sayımı yapılır.

4) Sayım sonuçlarına göre 60 mm'lik petriye 500 canlı hücre aktarılacak şekilde hesaplama yapılmış ve her doz için 4 ayrı petriye 500 canlı hücre aktarılmıştır. Daha sonra petriler 37 °C ve %5 CO₂ ortama sahip inkübatörde inkübe edilmiştir.

Petrilerdeki hücrelerin koloni oluşturması beklenmiş ve her gün petriler invert mikroskopta kontrol edilmiş petrilerdeki koloniler belli büyüklüğe eriştiklerinde petrilerden besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. 0,5 gr toz halindeki kristal viyole boyası 20 ml metanol içerisinde çözülmüş sonra 100 ml' ye dH₂O ile tamamlanarak hazırlana boya ile boyanmıştır

5) Her bir petrideki koloniler sayılarak elde edilen sonuçlar tablo haline getirilmiştir.

6) Aşağıda belirtilen formül ile yüzde yaşayabilirlik oranı (sitotoksosite) hesaplanmıştır.

$$\text{Yaşayabilirlik (sitotoksosite)} = \frac{\text{Petri başıma düşen ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

3.7. Komet Testi

Komet testi bir genotoksosite testi olup komet testinin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların, canlı hücrelerin DNA'ları üzerine etkilerini incelemektir. Tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ve bu hasarları DNA tamir mekanizmaları tarafından tamir edilememiş hücrelerin DNA molekülleri, farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip oldukları için elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç etmektedir. Bu DNA molekülleri ethidium bromid gibi DNA'ya özgü boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre kuyruklu yıldız şeklini almaktadır. Komet yöntemi kısaca DNA parçalarının elektrik akımı doğrultusunda ilerlemesi kuyruk oluşturması ilkesine dayanır (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010).

Komet Testi Protokolü

T75 cm²'lik flaskta bulunan ve %80 konfluent olan flasklardaki hücreler pasajlanmış, T25 cm²'lik flasklara bölünmüş ve çoğalması için inkübatörde bekletilmiştir. Çoğalan hücreler *Montivipera xanthina* için kontrol grubu, pozitif kontrol grubu, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,8 µg/ml, 1,6 µg/ml ve 3,2 µg/ml olacak şekilde dozlama yapılmıştır.

Vipera ammodytes için ise kontrol grubu, pozitif kontrol grubu, 0,05 µg/ml 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,6 µg/ml ve 0,8 µg/ml konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. Dozlanan hücreler 24 saat sonra tripsinlenerek kaldırılmış tüplere alınarak santrifüj edilmiştir.

1) Bu aşamadan sonra prosedür karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı atıldıktan sonra kalan hücreler 1 ml PBS ile seyreltilmiş ve iyice karıştırılmıştır.

2) Komet testinde kullanılacak lamaların bir gün önceden agarla kaplanması gerekir. 0,75 gr normal melting agaroz 100 ml dH₂O'da çözülmüş ve lamaların rodajlı kısımlarına kadar agarla kaplanmıştır. Lamaların rodajlı kısımları deney gruplarına göre etiketlenmiştir.

3) Hücreleri jel içine gömmek için, düşük erime noktalı agaroz (LMA) kullanılmıştır. 0,065 gr LMA tartılmış ve 10 ml PBS içinde ısıtılarak jel haline getirilmiştir.

4) Eppendorf tüplere 250'şer µL LMA bölünmüş ve bu eppendorf tüpler 37 °C'de bekleyen sıcak su banyosuna yerleştirilmiştir.

5) Hücre pelletlerinden 100 µl çekilmiş, su banyosunda bekleyen ve içinde 250µl LMA jeli bulunan eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Buradaki hücre süspansiyonundan alınacak miktar hücre yoğunluğuna göre ayarlanabilir. Eppendorf tüpünde pipetaj yapılarak karışımın homojen olması sağlanır.

6) Bu karışımdan 80 µl çekilmiş ve lam üzerine yayılmıştır. Her deney grubu önceden etiketlenmiş olan lamaların üzerine ayrı ayrı yayılmıştır.

7) Üzerine karışım koyulan lamalar hemen lamelle kapatılmış ve yayma işlemi bittikten sonra lamalar 15 dakika +4 °C de bekletilmiştir.

8) 15 dakika sonra lamaların üzerindeki lameller çıkarılmıştır.

9) Lamelleri çıkmış olan lamalar şalelere dizilmiş ve şaleler lizis solüsyonu ile doldurulmuştur. Lamalar şaleler içinde 1 gece boyunca karanlıkta ve +4 °C de bekletilmiştir.

10) Bir gece bekletilen lamalar lizis solüsyonundan çıkarılmış ve elektroforez tankına dizilmiştir. Tanklar yürütme tamponu ile doldurulmuş ve 30 dk yürütme tamponu içinde akım verilmeden bekletilmiştir.

11) Yürütme işlemi 500 mA, 25V'da, yarım saatte gerçekleştirilmiştir.

12) Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamalar tanktan çıkarılıp nötralizasyon tamponuna konulmuş ve 5 dakika lamalar tampon içerisinde karanlıkta bekletilmiştir.

13) Nötralizasyon işlemi sonrasında lamalar tampondan çıkarılıp soğuk distile suya daldırılıp yıkanmış ve kuruması beklenmiştir.

15) Kuruduktan sonra lamalar %99 etanol içinde 5 dakika fikse edilmiştir.

Boyama İşlemi

20 µg/mL konsantrasyonlu EtBr boya solüsyonundan enjektör ile 0,2 ml çekilir ve lamlara damlatılır. Boya damlatıldıktan sonra lamalar lamellerle kapatılıp, mikroskopik inceleme için hazırlanır.

Lamların mikroskopta incelenmesi

Sayım ve değerlendirme aşamalarında floresan mikroskop kullanılmıştır. Boyanılan lamlara mikroskopta bakılmış ve her lamdan 100 tane hücre sayılmıştır. Değerlendirme kameram 21 komet sayım programı ile yapılmıştır. Komet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk moment uzunluğu verileri değerlendirilmiştir. Deneyler iki bağımsız tekrar halinde yapılmıştır.

Komet Testinde Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.

Lizis Çözeltisinin Hazırlanması

29,22 gr NaCl, 7,4448 gr Na₂EDTA ve 0,2422 Tris tartılmıştır ve tartılan maddeler 178 ml dH₂O'da çözülmüştür. NaOH ile pH 10'a ayarlanmıştır. Deneyden 30 dk önce 2ml Triton X100 ve 20 ml DMSO çözeltiye eklenmiştir. Deneyin lizis aşamasına kadar +4 °C de bekletilmiştir

Yürütme Tamponunun Hazırlanması;

0,56 gr Na₂EDTA ve 18 gr NaOH, 1,5 L dH₂O' da çözülmüştür. pH, NaOH ile 13' e ayarlanmıştır. Tamponun hazırlanması sırasında ısı kullanılmamış ve elektroforez tankına konuluncaya kadar +4 °C de bekletilmiştir.

Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması;

Nötralizasyon çözeltisi için 4,8456 gr Tris tartılarak 100 ml dH₂O' da çözülmüştür. pH' 7,5' e ayarlamak için HCl kullanılmıştır. Ardından +4 °C de bekletilmiştir.

3.8. ROS Testi

Bu test yöntemi ile *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin hücre içi ROS oluşumuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) hücre içerisine girerek hücrel esterazların etkisi ile 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) oluşturur. Bu iki maddenin floresan özellikleri yoktur fakat DCFH reaktif oksijenlerin varlığında çok hızlı bir şekilde okside olarak 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) ye dönüşür DCF'nin yüksek seviyede floresan özelliği bilinmektedir.

ROS Testi Protokolü

ROS testi için hücreler T75cm²'lik flasklarda üretilmiştir. Büyüyen hücreler 96 kuyucuklu siyah platelere ekilmiştir ve 24 saat boyunca 37 °C ve %5 CO₂ ortama sahip inkübatörde inkübe edilmiştir. Kültür sonunda besi yeri değiştirildikten sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücrelere 1X DCFH-DA/besiyeri çözeltisinden 200'er µl eklenmiş ve 37 °C'de 120 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler 2 kez PBS ile tekrar yıkanmıştır. DCFH-DA yüklenmiş hücrelere *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin XTT testi ile belirlenmiş IC₇₅, IC₅₀, IC₂₅ ve IC_{12,5} dozları ile muamele edilmiştir. Ayrıca H₂O₂'nin IC₅₀ dozu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Konsantrasyonu 0 µM – 10 µM arasında değişen DCF standartlarının 1:10 seyreltme serisi 1mM DCF stok solüsyonunun besi yeri ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Standartlar tüp dilüsyon yöntemi ile hazırlanmıştır. (Çizelge3.4)

Çizelge 3.4. DCF standartlarının tüp dilüsyon yöntemiyle hazırlanması

No	DCF standardı	Besiyeri (RPMI)	DCF (nM)
1	10	990 µl	10000 nM
2	1.tüpten 100 µl	900 µl	1000 nM
3	2.tüpten 100 µl	900 µl	100 nM
4	3.tüpten 100 µl	900 µl	10 nM
5	4.tüpten 100 µl	900 µl	1 nM
6	5.tüpten 100 µl	900 µl	0,1 nM
7	6.tüpten 100 µl	900 µl	0,01 nM
8	0 µl	1000 µl	0 nM

Absorbansı 480 nm/530 nm’de florometrik plaka okuyucuda plateler 24 saat belirli aralıklarla kinetik olarak okunmuştur. ROS değerleri standartlardan çizilen standart dağılım grafiğinin eğim formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Deneyler her bir yılın zehiri ve hücre hattı için iki tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 23 paket programıyla gerçekleştirilmiştir. Normal Dağılıma uygun olmayan veriler Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Normal dağılıma uygun olan veriler homojen dağılım gösteriyorsa Tukey testi homojen bir dağılım göstermiyorsa Tamhane Testi ile değerlendirilmiştir.

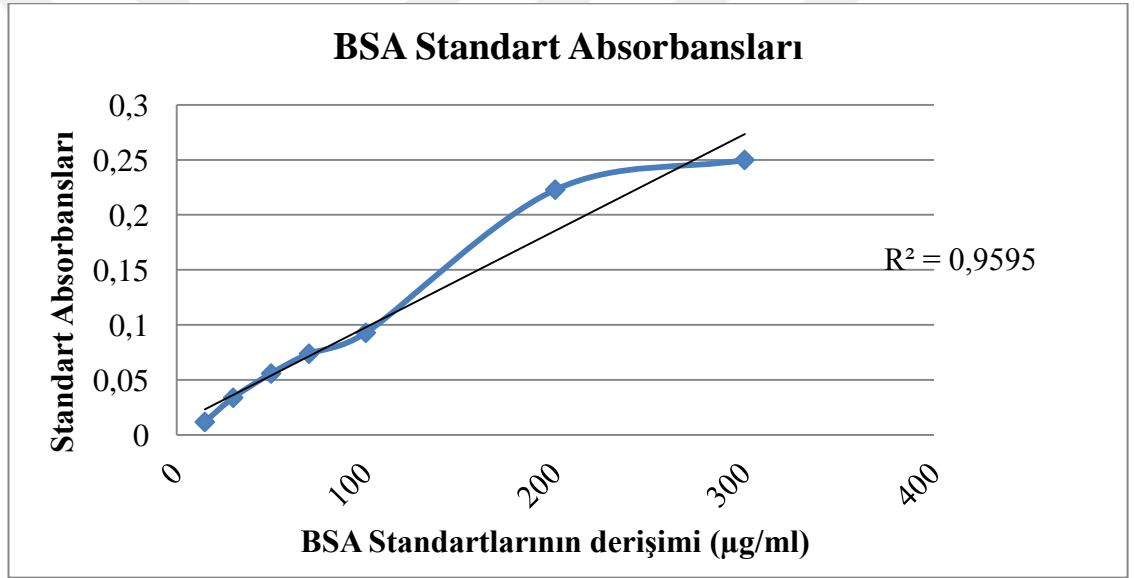
4.BULGULAR

4.1. Bradford Testi Sonuçları

Bradford yöntemi *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin protein miktar tayini için kullanılmıştır. Yöntemde standartlar hazırlanmış ve her bir zehir için üç tekrar yapılmıştır.

4.1.1. *Montivipera xanthina* Zehiri İçin Bradford Bulguları

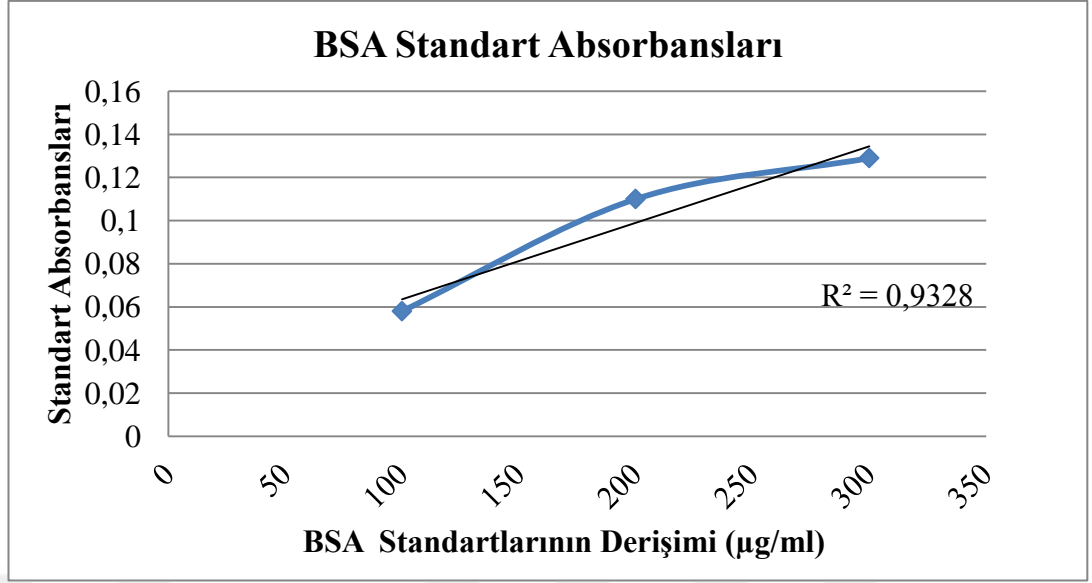
Montivipera xanthina zehiri 3 tekrarlı olarak spektrofotometrede ölçülmüş sonuçlar standart eğrisinde elde edilen eğim denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1). *Montivipera xanthina* zehiri için protein miktarı 256.185 µg/ml bulunmuştur.



Şekil 4.1. *Montivipera xanthina* zehirinin protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart eğrisi.

4.1.2. *Vipera ammodytes* Zehiri İçin Bradford Bulguları

Vipera ammodytes zehiri 3 tekrarlı olarak spektrofotometrede ölçülmüş sonuçlar standart eğrisinde elde edilen eğim denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır.(Şekil 4.2). *Vipera ammodytes* zehiri için protein miktarı 165,8 µg/ml olarak saptanmıştır.



Şekil 4.2. *Vipera ammodytes* zehiri için protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart eğrisi

4.2.XTT Bulguları

XTT testinden elde edilen bulgular Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinden 0,1 µg/ml ve 25,6 µg/ml arasında değişen konsantrasyonları A549 ve Beas-2B hücre hatlarına 24 saat muamele edilmiştir. Zehirlerin bu hücre hatlarında IC₇₅, IC₅₀, IC₂₅ ve IC_{12,5} değerleri hesaplanmıştır

4.2.1. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen XTT bulguları

A549 hücre hattının *Montivipera xanthina* zehiri ile 24 saat muamelesi sonucu elde edilen, IC_{12,5} IC₂₅, IC₅₀ve IC₇₅ değerler sırasıyla; 0,388 ± 0,144 µg/ml, 0,776 ± 0,289 µg/ml, 1,553 ± 0,578 µg/ml ve 2,330 ± 0,868 µg/ml'dir. A549 hücre hattının *Montivipera xanthina* zehirinde elde edilen bulgular Çizelge 4.1. ve Şekil 4.3.' de gösterilmiştir.

4.2.2. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen XTT bulguları

Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri ile 24 saat muamelesi sonucu elde edilen, IC_{12,5} IC₂₅, IC₅₀ve IC₇₅ değerler sırasıyla; 0,539 ± 0,213 µg/ml, 1,078 ± 0,426 µg/ml, 2,156 ± 0,853 µg/ml ve 3,234 ± 1,280 µg/ml'dir. Beas-2B hücre hattının *Montivipera xanthina* zehirinde elde edilen bulgular Çizelge 4.1. ve Şekil 4.3.' de gösterilmiştir.

4.2.3. A549 hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen XTT bulguları

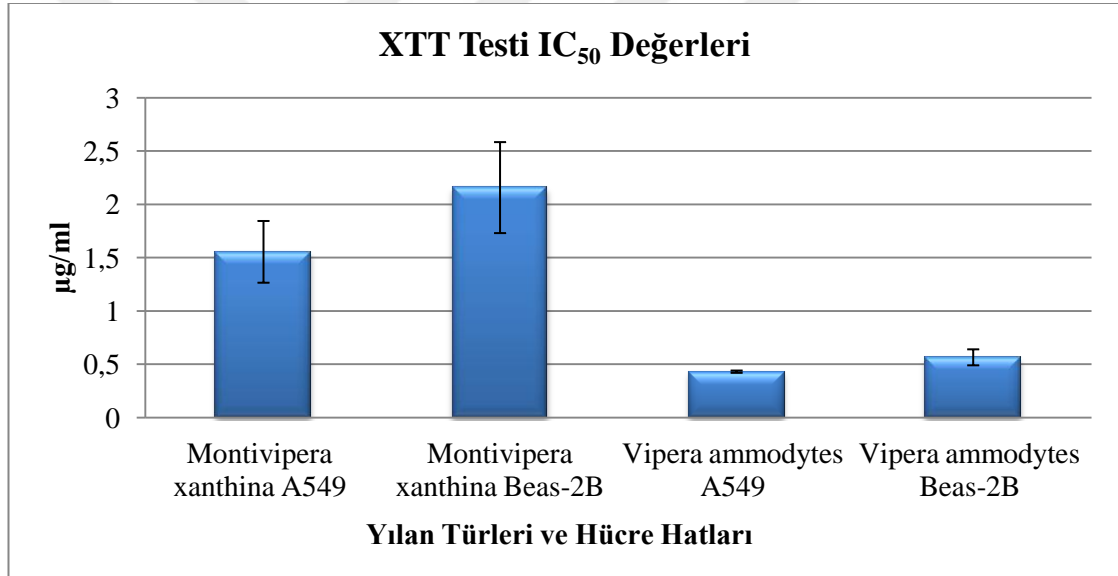
A549 hücre hattının *Vipera ammodytes* zehiri ile 24 saat muamelesi sonucu elde edilen, IC_{12,5} IC₂₅, IC₅₀ve IC₇₅ değerler sırasıyla; 0,107 ± 0,005 µg/ml, 0,214 ± 0,01 µg/ml, 0,429 ± 0,018 µg/ml ve 0,644 ± 0,028 µg/ml'dir. A549 hücre hattının *Vipera ammodytes* zehirinde elde edilen bulgular Çizelge 4.1. ve Şekil 4.3.' de gösterilmiştir.

4.2.3. Beas-2B hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen XTT bulguları

Beas-2B hücre hattının *Vipera ammodytes* zehiri ile 24 saat muamelesi sonucu elde edilen, IC_{12,5} IC₂₅, IC₅₀ve IC₇₅ değerler sırasıyla; 0,141 ± 0,037 µg/ml, 0,282 ± 0,075 µg/ml, 0,564 ± 0,150 µg/ml ve 0,846 ± 0,225 µg/ml'dir. Beas-2B hücre hattının *Vipera ammodytes* zehirinde elde edilen bulgular Çizelge 4.1. ve Şekil 4.3.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında IC₇₅, IC₅₀, IC₂₅ ve IC_{12,5} değerleri, ± standart sapmayı ifade etmektedir

Dozlar	<i>Montivipera xanthina</i> zehiri	<i>Montivipera xanthina</i> zehiri	<i>Vipera ammodytes</i> zehiri	<i>Vipera ammodytes</i> zehiri
	A549	Beas-2B	A549	Beas-2B
IC ₇₅	2,330 ± 0,868 µg/ml	3,234 ± 1,280 µg/ml	0,644 ± 0,028 µg/ml	0,846 ± 0,225 µg/ml
IC ₅₀	1,553 ± 0,578 µg/ml	2,156 ± 0,853 µg/ml	0,429 ± 0,018 µg/ml	0,564 ± 0,150 µg/ml
IC ₂₅	0,776 ± 0,289 µg/ml	1,078 ± 0,426 µg/ml	0,214 ± 0,01 µg/ml	0,282 ± 0,075 µg/ml
IC _{12,5}	0,388 ± 0,144 µg/ml	0,539 ± 0,213 µg/ml	0,107 ± 0,005 µg/ml	0,141 ± 0,037 µg/ml

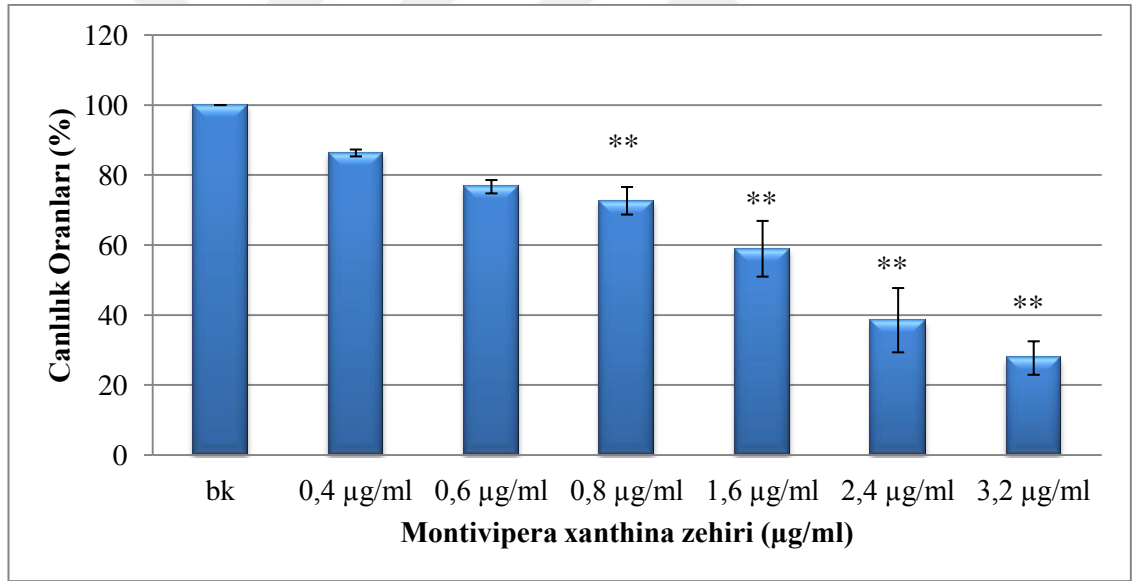


Şekil 4.3. *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında IC₅₀, değerleri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir

4.3. Klonojenik Test Bulguları

4.3.1. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen klonojenik Test bulguları

A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri farklı konsantrasyonlarda verilmiş ve canlılık oranları ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Klonojenik test uygulaması sonuçları Şekil 4.3'te verilmiştir. Klonojenik deney sonuçlarında dozun artmasına paralel olarak anlamlı azalma olduğu Mann Whitney U testi ile belirlenmiştir ($p<0,05$). 0,4 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,6 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma saptanmamıştır ($p>0,05$). 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$, 2,4 $\mu\text{g/ml}$ ve 3,2 $\mu\text{g/ml}$ ' lik konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre canlılık oranlarının anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p<0,001$). (Şekil 4.4.)



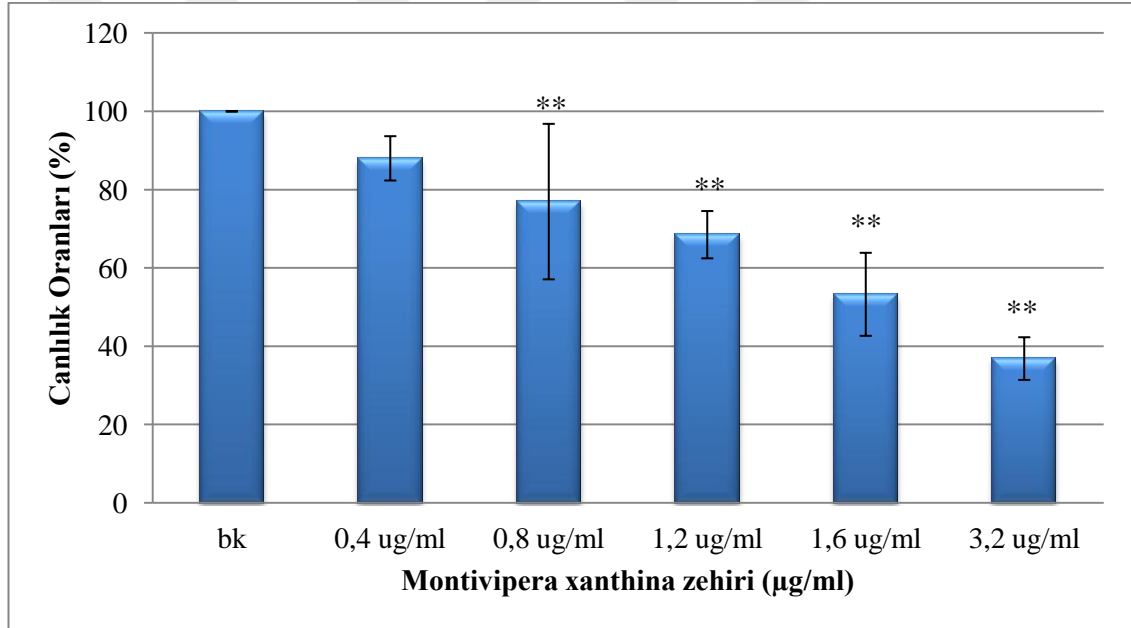
Şekil 4.4. *Montivipera xanthina* zehirine maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları; ** $p\leq 0,001$

Çizelge 4.2. *Montivipera xanthina* zehirine maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri; \pm standart sapmayı ifade etmektedir

Dozlar	Büyüme Kontrol	0,4 $\mu\text{g/ml}$	0,6 $\mu\text{g/ml}$	0,8 $\mu\text{g/ml}$	1,6 $\mu\text{g/ml}$	2,4 $\mu\text{g/ml}$	3,2 $\mu\text{g/ml}$
% Canlılık	100 ± 0	86,30 ± 0,98	76,65 ± 1,90	72,63 ± 3,93 **	58,91 ± 7,96 **	38,5 ± 9,19 **	27,67 ± 4,78 **

4.3.2. Beas-2B Hücre Hattında *Montivipera xanthina* Zehiri İçin Elde Edilen Klonojenik Test Bulguları

Montivipera xanthina zehiri Beas-2B hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır ve canlılık oranları ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Klonojenik test uygulaması sonuçları Şekil 4.5'te verilmiştir. Klonojenik deney sonuçlarında konsantrasyonun artmasına paralel olarak anlamlı azalma olduğu Mann Whitney U testi ile belirlenmiştir ($p < 0,05$). 0,4 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma saptanmamıştır ($p > 0,05$). 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,2 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$, ve 3,2 $\mu\text{g/ml}$ ' lik konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre canlılık oranlarının istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p < 0,001$). (Şekil 4.5.)



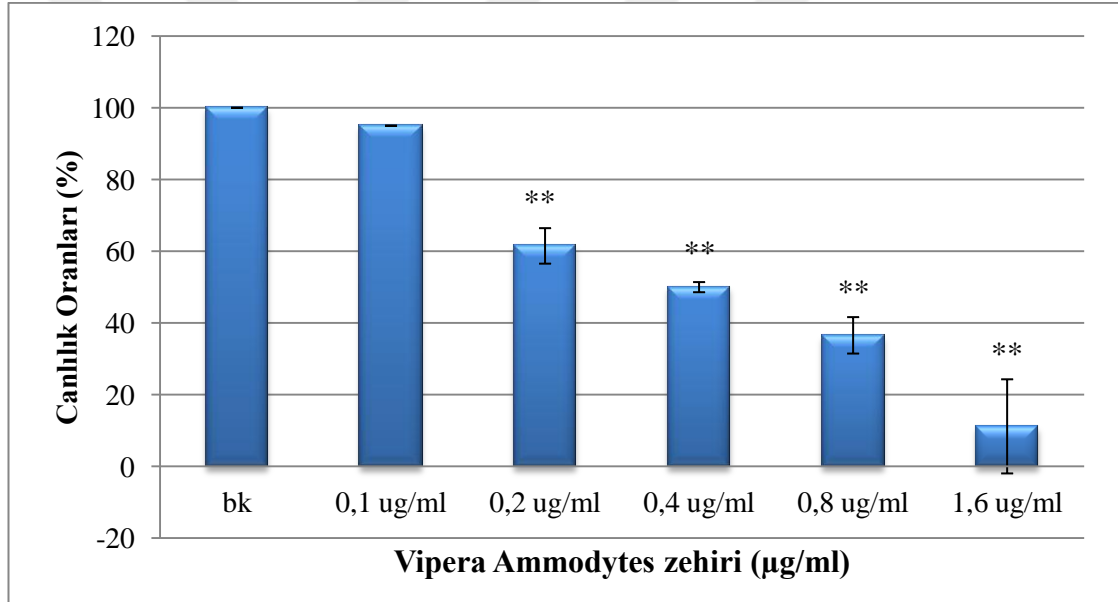
Şekil 4.5. *Montivipera xanthina* zehirine maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları; ** $p \leq 0,001$

Çizelge 4.3. *Montivipera xanthina* zehirine maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri; \pm standart sapmayı ifade etmektedir

Dozlar	Büyüme Kontrol	0,4 $\mu\text{g/ml}$	0,8 $\mu\text{g/ml}$	1,2 $\mu\text{g/ml}$	1,6 $\mu\text{g/ml}$	3,2 $\mu\text{g/ml}$
% Canlılık	100 \pm 0	88,0 \pm 5,65	76,95 \pm 19,86 **	68,5 \pm 10,60 **	53,27 \pm 6,03 **	36,85 \pm 5,44 **

4.3.3. A549 Hücre Hattında *Vipera Ammodytes* Zehiri İçin Elde Edilen Klonojenik Test Bulguları

A549 hücreleri *Vipera Ammodytes* zehirinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir ve hücre canlılık oranları ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). Klonojenik test uygulaması sonuçları Şekil 4.6'te verilmiştir. Klonojenik deney sonuçlarında konsantrasyonun artmasına paralel olarak anlamlı azalma olduğu Mann Whitney U testi ile belirlenmiştir. ($p < 0,05$). 0,1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma saptanmamıştır ($p > 0,05$). 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$ ve 1,6 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre canlılık oranlarının anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.6.)



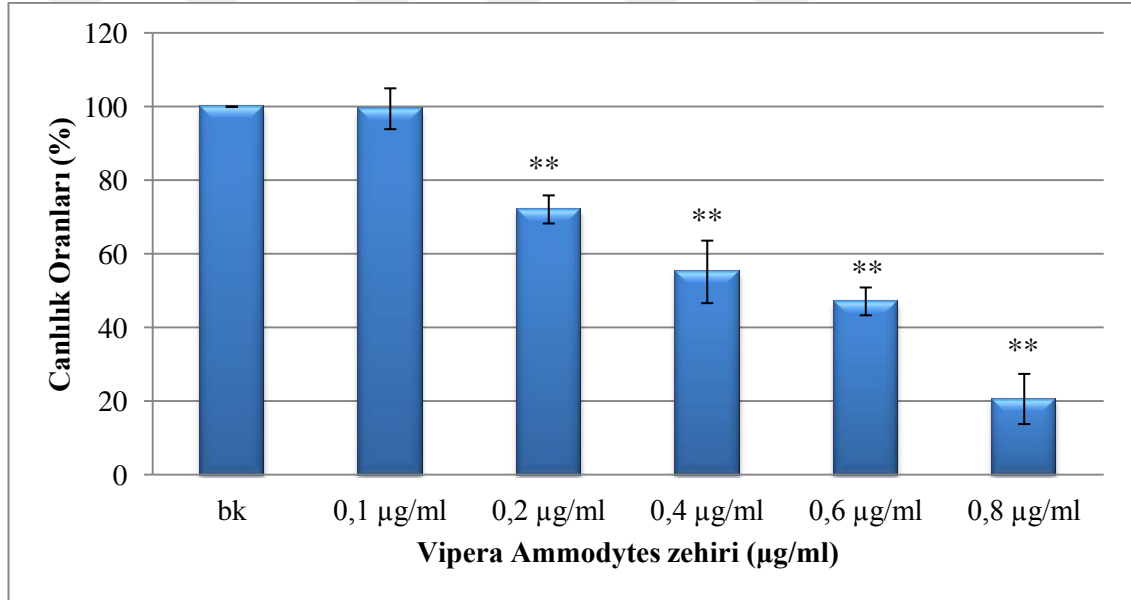
Şekil 4.6. *Vipera Ammodytes* zehirine maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları; ** $p \leq 0,001$

Çizelge 4.4. *Vipera Ammodytes* zehirine maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri; \pm standart sapmayı ifade etmektedir

Dozlar	Büyüme Kontrol	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,4 $\mu\text{g/ml}$	0,6 $\mu\text{g/ml}$	0,8 $\mu\text{g/ml}$
% Canlılık	100 \pm 0	95,0 \pm 0	61,5 \pm 4,94 **	50,0 \pm 1,41 **	36,56 \pm 5,07 **	11,19 \pm 13,11 **

4.3.3. Beas-2B Hücre Hattında *Vipera Ammodytes* Zehiri İçin Elde Edilen Klonojenik Test Bulguları

Beas-2B hücreleri *Vipera Ammodytes* zehirinin farklı konsantrasyonlarında muamele edilmiştir ve canlılık oranları ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.5.). Klonojenik test uygulaması sonuçları Şekil 4.7'te verilmiştir. Klonojenik deney sonuçlarında konsantrasyonun artmasına paralel olarak anlamlı azalma olduğu Mann Whitney U testi ile belirlenmiştir. ($p < 0,05$). 0,1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma saptanmamıştır ($p > 0,05$). 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,8 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre canlılık oranlarında istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.7.)

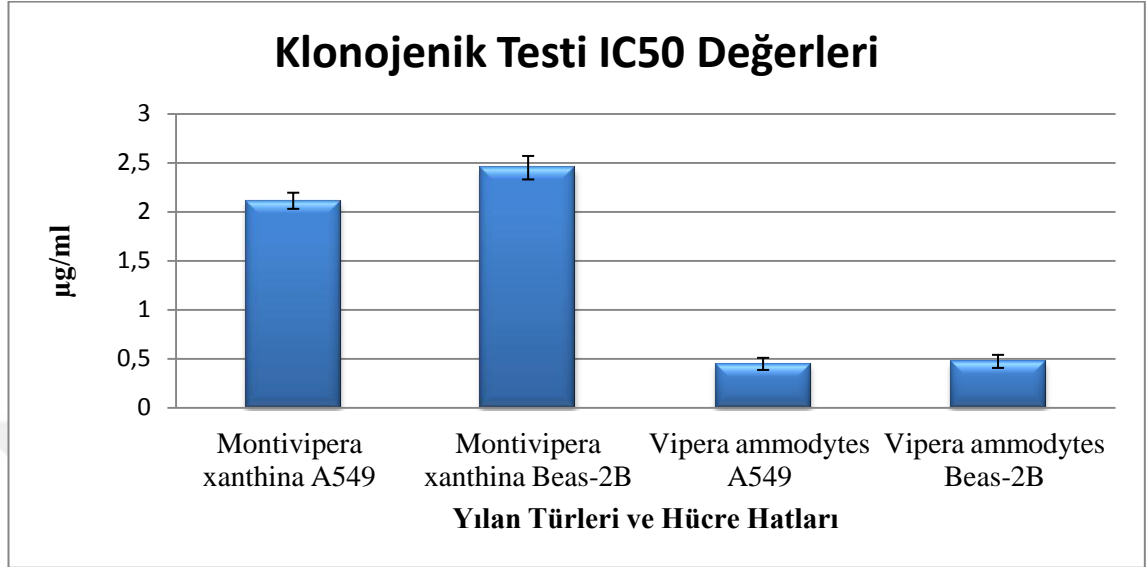


Şekil 4.7. *Vipera ammodytes* zehirine maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları; ** $p \leq 0,001$

Çizelge 4.5. *Vipera Ammodytes* zehirine maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri; \pm standart sapmayı ifade etmektedir

Dozlar	Büyüme Kontrol	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,4 $\mu\text{g/ml}$	0,6 $\mu\text{g/ml}$	0,8 $\mu\text{g/ml}$
% Canlılık	100 \pm 0	99,43 \pm 5,54	72,09 \pm 3,81 **	55,12 \pm 8,49 **	47,11 \pm 3,77 **	20,60 \pm 6,80 **

Klonojenik test sonucunda oluşan *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında IC₅₀, değerleri Şekil 4.8. ve Çizelge 4.6. da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında IC₅₀, değerleri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir

Çizelge 4.6. *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında Klonojenik test sonucu hesaplanmış IC₅₀ değerleri, ± standart sapmayı ifade etmektedir

Yılan türü/Hücre hattı	Montivipera xanthina A549	Montivipera xanthina Beas-2B	Vipera ammodytes A549	Vipera ammodytes Beas-2B
IC ₅₀ değeri (µg/ml)	2,112 ± 0,116 µg/ml	2,457 ± 0,169 µg/ml	0,448 ± 0,087 µg/ml	0,473 ± 0,094 µg/ml

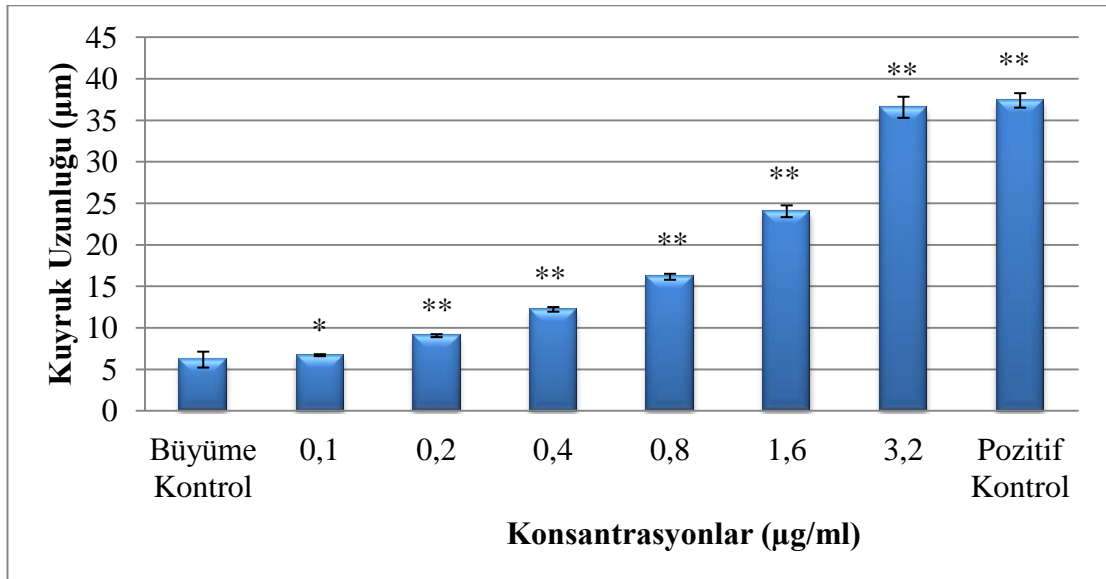
4.4. Komet Testi Bulguları

4.4.1. Kuyruk uzunluğu bulguları

Montivipera xanthina ve *Vipera ammodytes* zehirleri A549 ve Beas-2B hücre hatlarına çeşitli konsantrasyonlarda 24 saat muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu sonuçları Çizelge 4.7 de verilmiştir. Kuyruk uzunluğu verileri istatistiksel analizleri Mann Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.4.1.1. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları

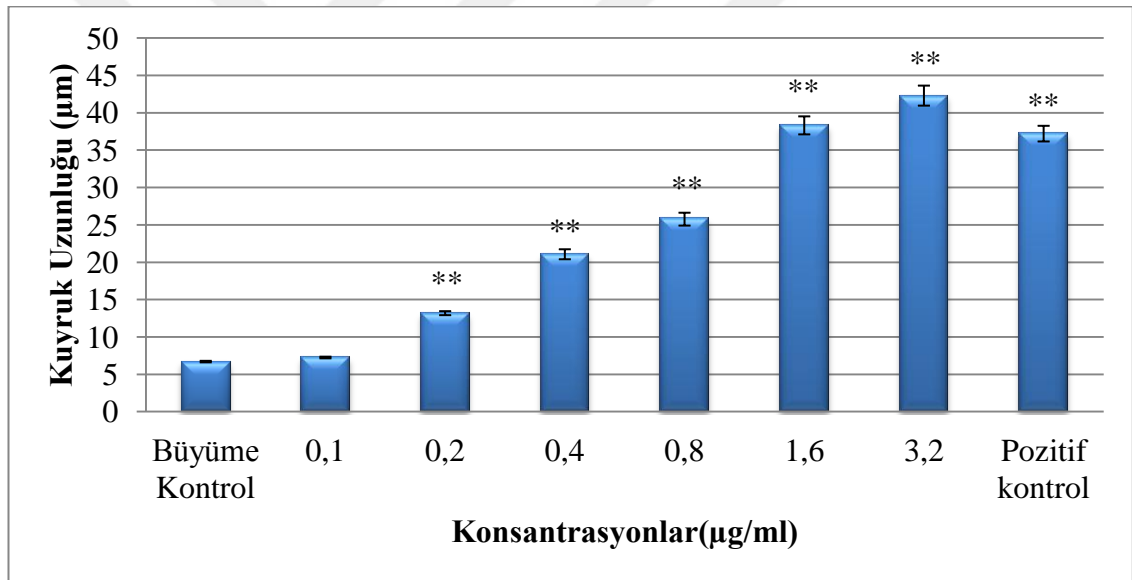
Montivipera xanthina zehri ile muamele edilen A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk uzunluğu $6,15 \pm 1,36 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,8 \mu\text{g/ml}$, $1,6 \mu\text{g/ml}$ ve $3,2 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kuyruk uzunlukları sırasıyla; $6,68 \pm 1,69 \mu\text{m}$, $9,03 \pm 2,536 \mu\text{m}$, $12,20 \pm 4,02 \mu\text{m}$, $16,13 \pm 5,11 \mu\text{m}$, $24,02 \pm 10,07 \mu\text{m}$ ve $36,54 \pm 18,06 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun kuyruk uzunluğu $37,36 \pm 12,29 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. $0,1 \mu\text{g/ml}$ lik konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın gözlemlendiği bulunmuştur ($p \leq 0,05$). $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,8 \mu\text{g/ml}$, $1,6 \mu\text{g/ml}$, $3,2 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda ve pozitif kontrol grubunda kuyruk uzunlukları kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.9.)



Şekil 4.9. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$; * ($p \leq 0,05$)

4.4.1.2. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları

Montivipera xanthina zehiri ile muamele edilen Beas-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk uzunluğu $6,72 \pm 1,46 \mu\text{m}$ olarak saptanmıştır. 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$ ve 3,2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kuyruk uzunlukları sırasıyla; $7,46 \pm 1,66 \mu\text{m}$, $13,02 \pm 3,80 \mu\text{m}$, $21,08 \pm 9,57 \mu\text{m}$, $25,78 \pm 12,24 \mu\text{m}$, $38,32 \pm 17,05 \mu\text{m}$ ve $42,31 \pm 19,07 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun kuyruk uzunluğu $37,22 \pm 14,76 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın gözlenmediği bulunmuştur ($p \geq 0,05$). 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$, 3,2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda ve pozitif kontrol grubunda kuyruk uzunlukları kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.10.)

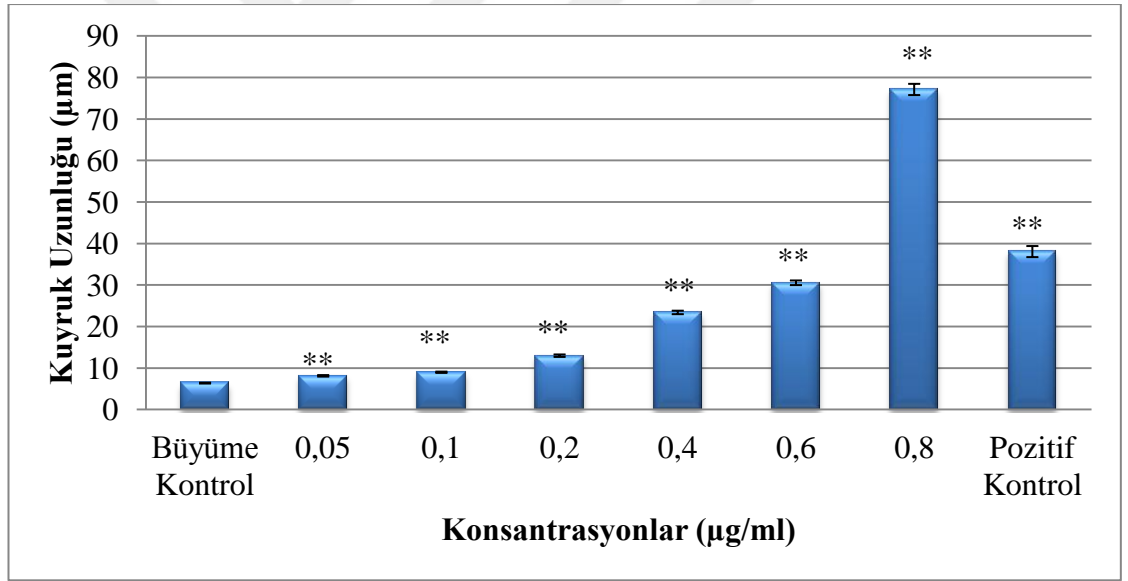


Şekil 4.10. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$

4.4.1.3 A549 hücre hattında *Vipera Ammodytes* zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları

Vipera Ammodytes zehiri ile muamele edilen A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk uzunluğu $6,36 \pm 1,43 \mu\text{m}$ olarak saptanmıştır. $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$ ve $0,8 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kuyruk uzunlukları sırasıyla; $8,10 \pm 2,56 \mu\text{m}$, $8,97 \pm 2,15 \mu\text{m}$, $12,96 \pm 4,16 \mu\text{m}$, $23,38 \pm 5,94 \mu\text{m}$, $30,52 \pm 7,91 \mu\text{m}$ ve $77,08 \pm 13,53 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir.

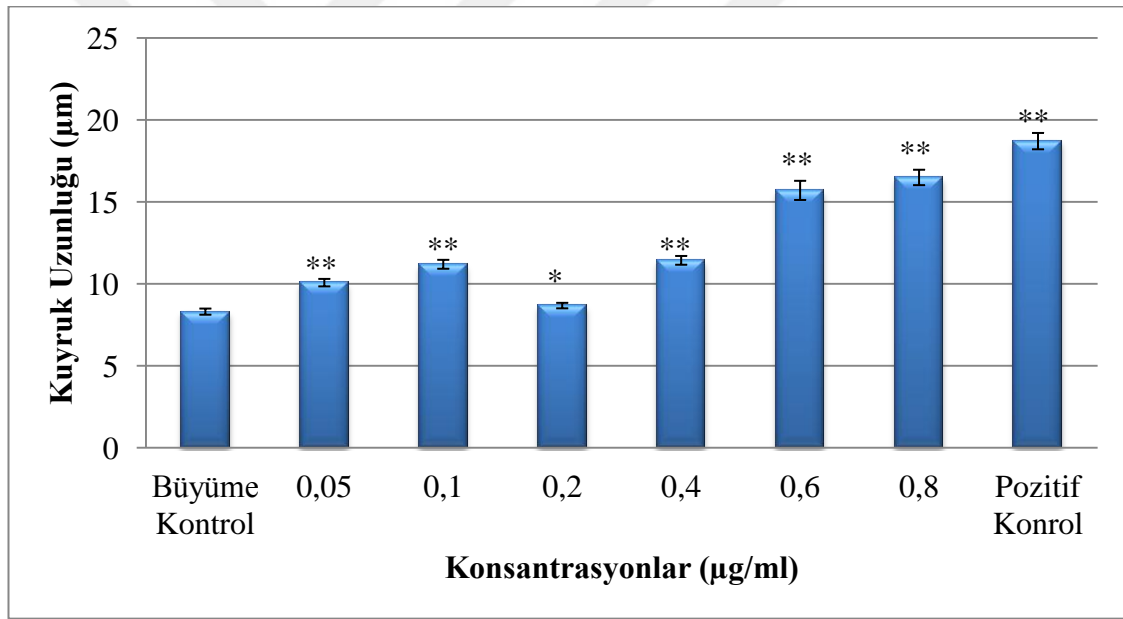
Ayrıca pozitif kontrol grubunun kuyruk uzunluğu $38,03 \pm 18,81 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$ ve $0,8 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarında ve pozitif kontrol grubunda kuyruk uzunlukları kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.11.)



Şekil 4.11. A549 hücre hattında *Vipera Ammodytes* zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$

4.4.1.4. Beas-2B hücre hattında *Vipera Ammodytes* zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları

Vipera Ammodytes zehiri ile muamele edilen Beas-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk uzunluğu $8,31 \pm 2,64 \mu\text{m}$ olarak saptanmıştır. $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$ ve $0,8 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kuyruk uzunlukları sırasıyla; $10,08 \pm 3,21 \mu\text{m}$, $11,2 \pm 3,83 \mu\text{m}$, $8,68 \pm 2,37 \mu\text{m}$, $11,44 \pm 3,77 \mu\text{m}$, $15,71 \pm 8,24 \mu\text{m}$ ve $16,5 \pm 6,618 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun kuyruk uzunluğu $18,71 \pm 7,03 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. $0,2 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlendiği bulunmuştur ($p < 0,05$). $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$ ve $0,8 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarında ve pozitif kontrol grubunda kuyruk uzunlukları kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.12.)



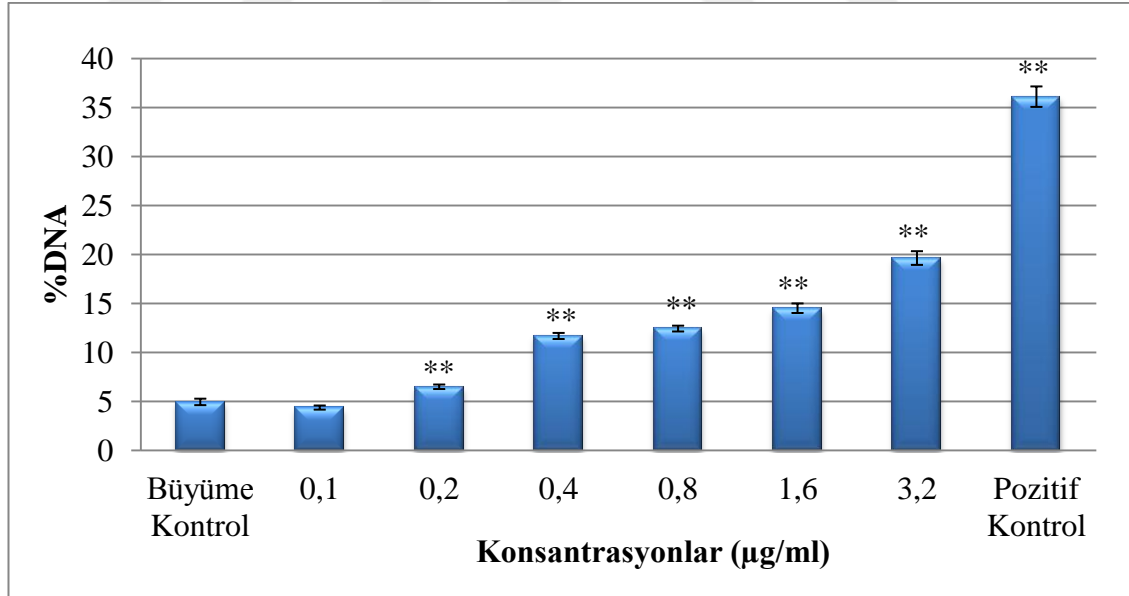
Şekil 4.12. Beas-2B hücre hattında *Vipera Ammodytes* zehiri için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$

4.4.2. Kuyruk % DNA bulguları

Montivipera xanthina ve *Vipera ammodytes* zehirleri A549 ve Beas-2B hücre hatlarına çeşitli konsantrasyonlarda 24 saat muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA sonuçları Çizelge 4.8 de verilmiştir. Kuyruk % DNA verileri istatistiksel analizleri Mann Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.4.2.1. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen kuyruk % DNA bulguları

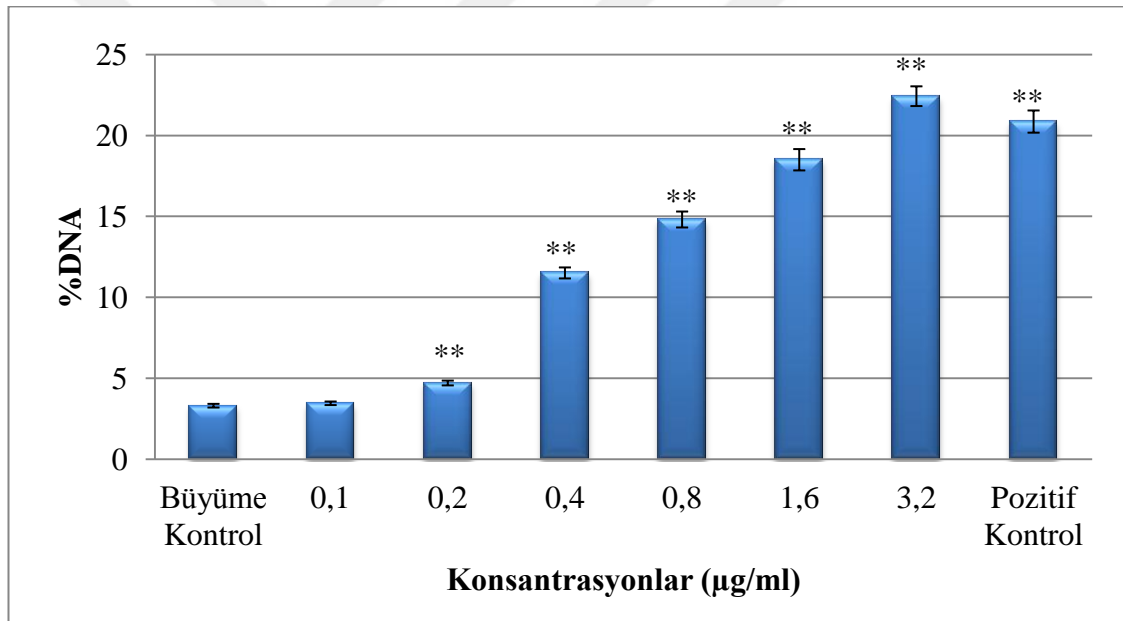
Montivipera xanthina zehri ile muamele edilen A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk % DNA $4,94 \pm 1,88$ olarak saptanmıştır. 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$ ve 3,2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kuyruk % DNA sırasıyla; $4,36 \pm 2,97$, $6,48 \pm 3,25$, $11,67 \pm 4,40$, $12,43 \pm 4,19$, $14,51 \pm 7,06$ ve $19,63 \pm 9,91$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun kuyruk % DNA $36,11 \pm 14,74$ olarak ölçülmüştür. 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$, 3,2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda ve pozitif kontrol grubunda kuyruk % DNA, kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.13.)



Şekil 4.13. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen kuyruk % DNA verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$

4.4.2.2. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen kuyruk % DNA bulguları

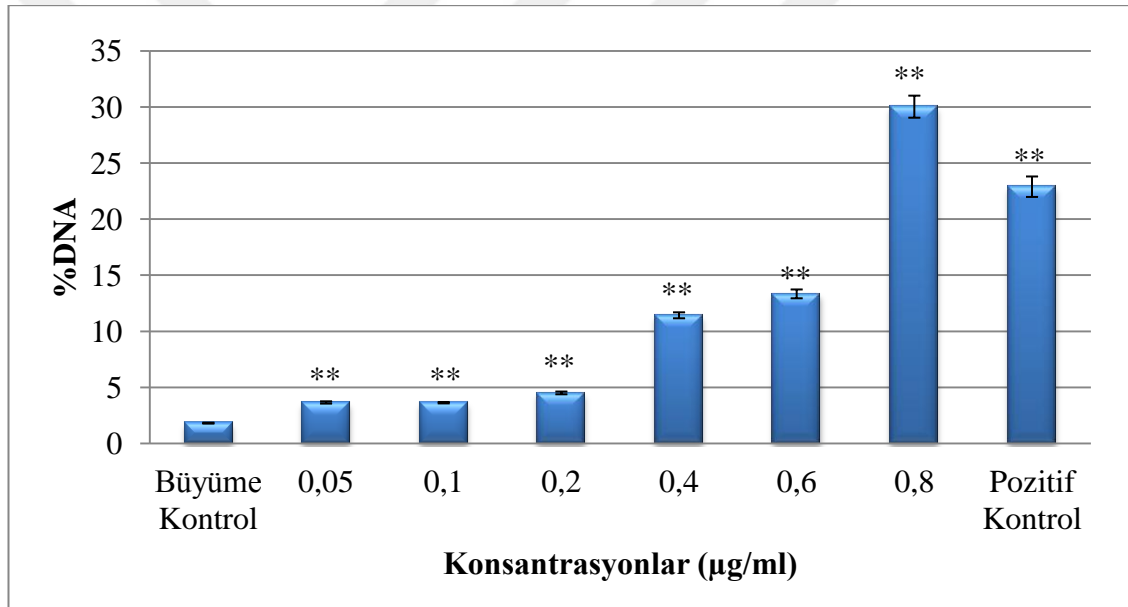
Montivipera xanthina zehri ile muamele edilen Beas-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk % DNA $3,31 \pm 1,6$ olarak saptanmıştır. 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$ ve 3,2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kuyruk % DNA sırasıyla; $3,46 \pm 1,6$, $4,71 \pm 2,09$, $11,51 \pm 4,84$, $14,81 \pm 6,98$, $18,509 \pm 9,342$ ve $22,43 \pm 8,65$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun kuyruk % DNA $20,86 \pm 9,66$ olarak ölçülmüştür. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın gözlenmediği bulunmuştur ($p \geq 0,05$). 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$, 3,2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda ve pozitif kontrol grubunda kuyruk % DNA, kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.14)



Şekil 4.14. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen kuyruk % DNA verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$

4.4.2.3. A549 hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen kuyruk % DNA bulguları

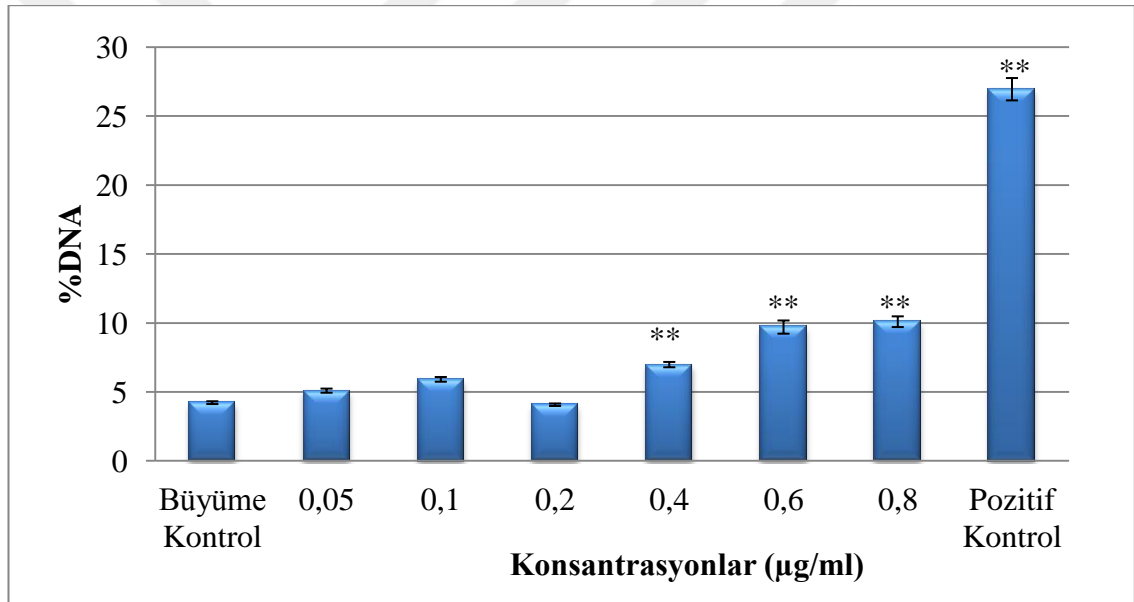
Vipera Ammodytes zehiri ile muamele edilen A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk % DNA $1,81 \pm 0,61$ olarak saptanmıştır. $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$ ve $0,8 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kuyruk % DNA sırasıyla; $3,65 \pm 1,41$, $3,63 \pm 0,87$, $4,5 \pm 1,73$, $11,42 \pm 3,75$, $13,33 \pm 5,56$ ve $30,02 \pm 9,84$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun kuyruk % DNA $22,88 \pm 12,86$ olarak ölçülmüştür. $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$, $0,8 \mu\text{g/ml}$, konsantrasyonlarda ve pozitif kontrol grubunda kuyruk % DNA, kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.15.)



Şekil 4.15. A549 hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen kuyruk % DNA verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$

4.4.2.4. Beas-2B hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen kuyruk % DNA bulguları

Vipera Ammodytes zehiri ile muamele edilen Beas-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk % DNA $4,22 \pm 1,44$ olarak saptanmıştır. $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$ ve $0,8 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda kuyruk % DNA sırasıyla; $5,09 \pm 2,11$, $5,91 \pm 2,42$, $4,07 \pm 1,29$, $6,98 \pm 2,73$, $9,7 \pm 6,75$ ve $10,09 \pm 5,48$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun kuyruk % DNA $26,95 \pm 11,43$ olarak ölçülmüştür. $0,2 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmediği bulunmuştur ($p \geq 0,05$). $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,8 \mu\text{g/ml}$, konsantrasyonlarda ve pozitif kontrol grubunda kuyruk % DNA, kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.16.)



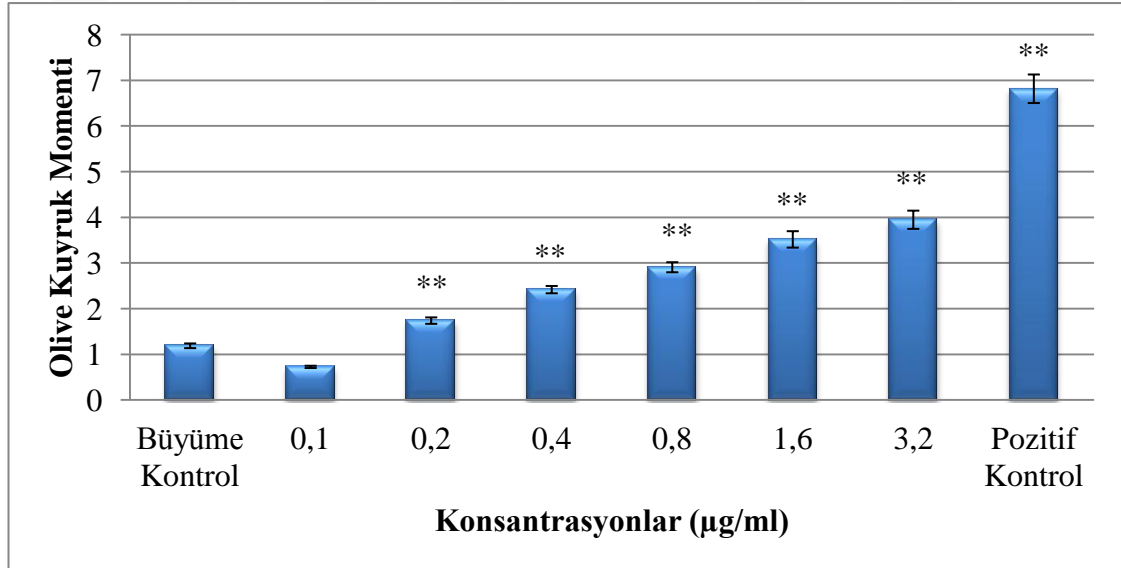
Şekil 4.16. Beas-2B hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen kuyruk % DNA verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$

4.4.3. Olive kuyruk momenti bulguları

Montivipera xanthina ve *Vipera ammodytes* zehirleri A549 ve Beas-2B hücre hatlarına çeşitli konsantrasyonlarda 24 saat muamele edilmesi sonucunda elde edilen olive kuyruk momenti sonuçları Çizelge 4.9 da verilmiştir. Olive kuyruk momenti verileri istatistiksel analizleri Mann Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.4.3.1. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları

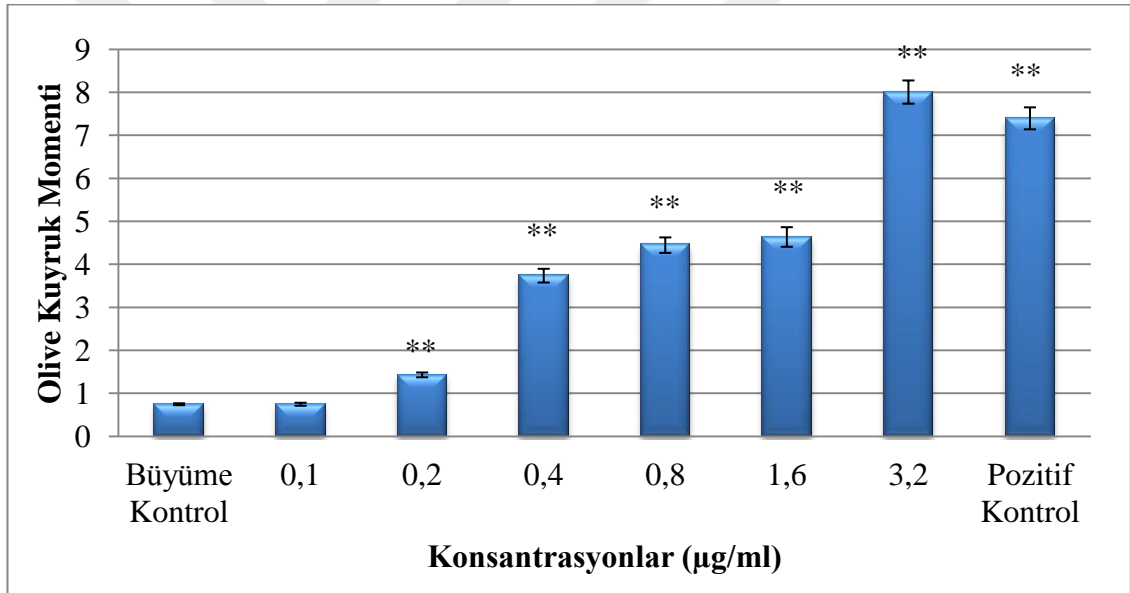
Montivipera xanthina zehri ile muamele edilen A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda olive kuyruk momenti $1,19 \pm 0,72$ olarak saptanmıştır. 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$ ve 3,2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda olive kuyruk momenti sırasıyla; $0,72 \pm 0,35$, $1,74 \pm 1,00$, $2,42 \pm 1,19$, $2,91 \pm 1,6$, $3,52 \pm 2,55$ ve $3,95 \pm 2,89$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun olive kuyruk momenti $6,81 \pm 4,409$ olarak ölçülmüştür. 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,8 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$, 3,2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda ve pozitif kontrol grubunda olive kuyruk momenti, kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.17.)



Şekil 4.17. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$

4.4.3.2. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları

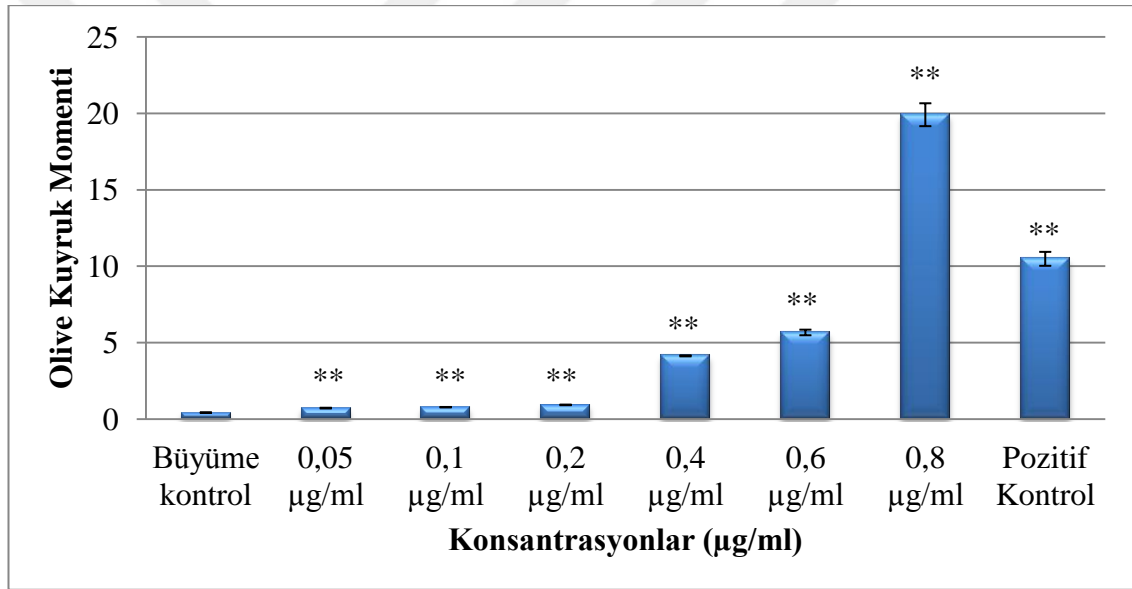
Montivipera xanthina zehiri ile muamele edilen Beas-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda olive kuyruk momenti $0,75 \pm 0,32$ olarak saptanmıştır. $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,8 \mu\text{g/ml}$, $1,6 \mu\text{g/ml}$ ve $3,2 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda olive kuyruk momenti sırasıyla; $0,75 \pm 0,49$, $1,43 \pm 0,79$, $3,74 \pm 2,27$, $4,45 \pm 2,55$, $4,64 \pm 3,23$ ve $8,01 \pm 3,91$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun olive kuyruk momenti $7,39 \pm 3,60$ olarak ölçülmüştür. $0,1 \mu\text{g/ml}$ 'lik dozda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmediği bulunmuştur ($p \geq 0,05$). $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,8 \mu\text{g/ml}$, $1,6 \mu\text{g/ml}$, $3,2 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda ve pozitif kontrol grubunda olive kuyruk momenti, kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.18.)



Şekil 4.18. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$

4.4.2.3. A549 hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları

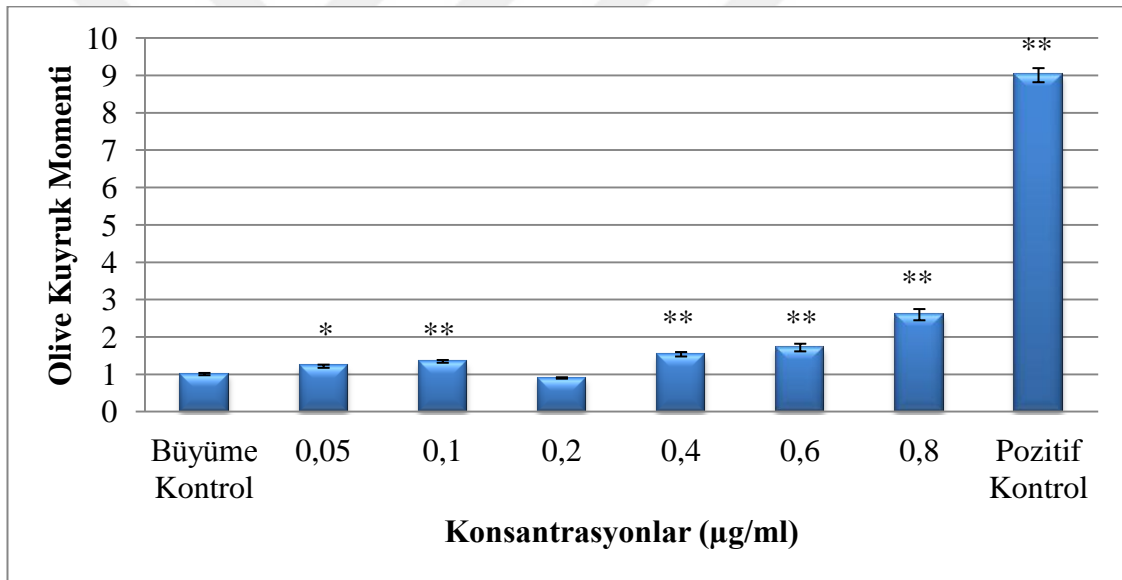
Vipera Ammodytes zehri ile muamele edilen A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda olive kuyruk momenti $0,41 \pm 0,132$ olarak saptanmıştır. $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$ ve $0,8 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda olive kuyruk momenti sırasıyla; $0,71 \pm 0,33$, $0,77 \pm 0,21$, $0,92 \pm 0,28$, $4,13 \pm 0,48$, $5,66 \pm 2,58$ ve $19,91 \pm 7,49$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun olive kuyruk momenti $10,47 \pm 6,43$ olarak ölçülmüştür. $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$, $0,8 \mu\text{g/ml}$, konsantrasyonlarda ve pozitif kontrol grubunda olive kuyruk momenti, kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.19.)



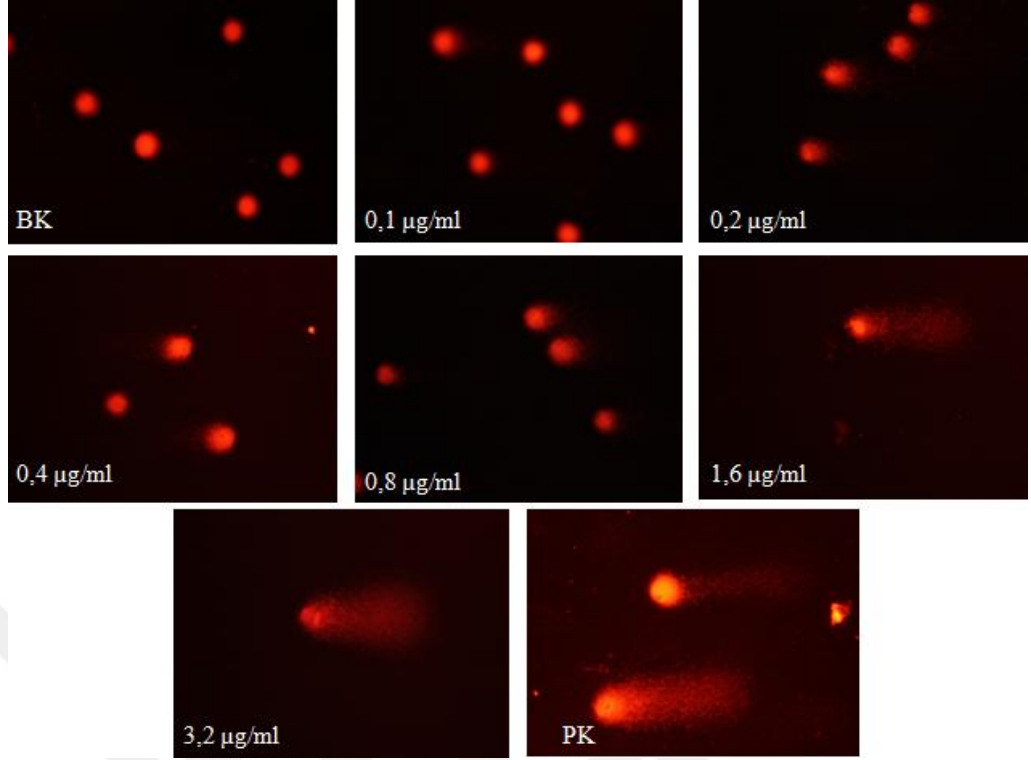
Şekil 4.19. A549 hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$

4.4.2.4. Beas-2B hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları

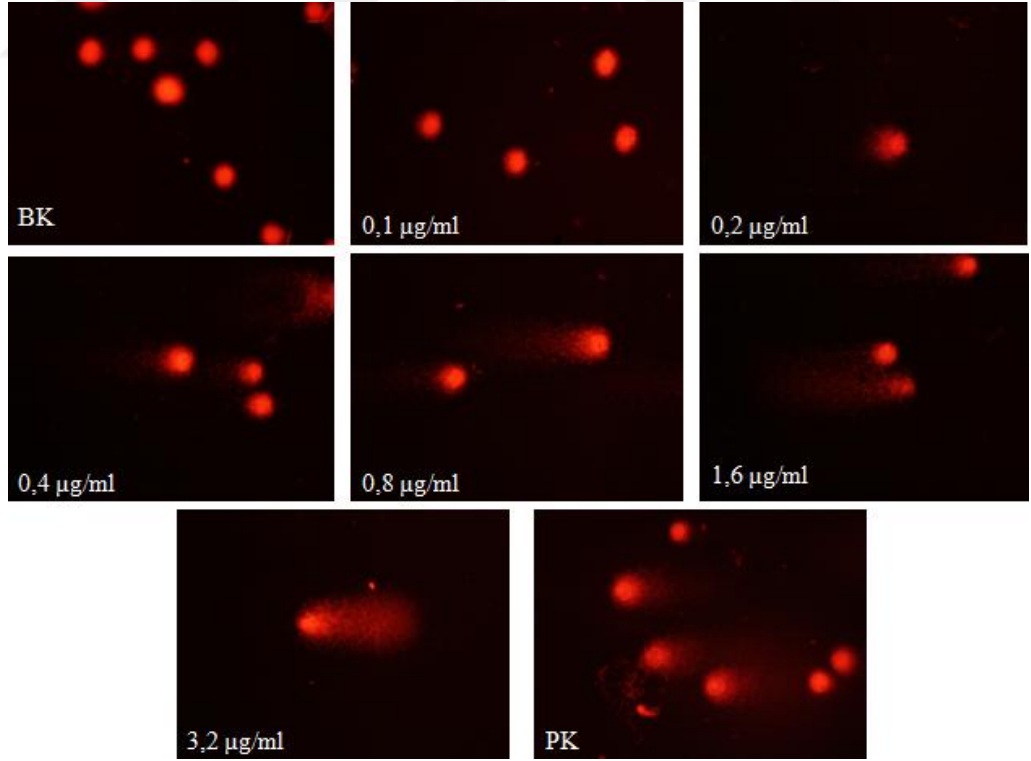
Vipera Ammodytes zehiri ile muamele edilen Beas-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda olive kuyruk momenti $1,01 \pm 0,43$ olarak saptanmıştır. $0,05 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,2 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$ ve $0,8 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda olive kuyruk momenti sırasıyla; $1,22 \pm 0,60$, $1,35 \pm 0,52$, $0,90 \pm 0,26$, $1,54 \pm 0,84$, $1,72 \pm 1,44$ ve $2,60 \pm 2,12$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun olive kuyruk momenti $9,00 \pm 2,66$ olarak ölçülmüştür. $0,05 \mu\text{g/ml}$, konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlendiği bulunmuştur ($p \leq 0,05$). $0,1 \mu\text{g/ml}$, $0,4 \mu\text{g/ml}$, $0,6 \mu\text{g/ml}$, $0,8 \mu\text{g/ml}$, konsantrasyonlarında ve pozitif kontrol grubunda olive kuyruk momenti, kontrol grubuna göre istatistikî olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.20.)



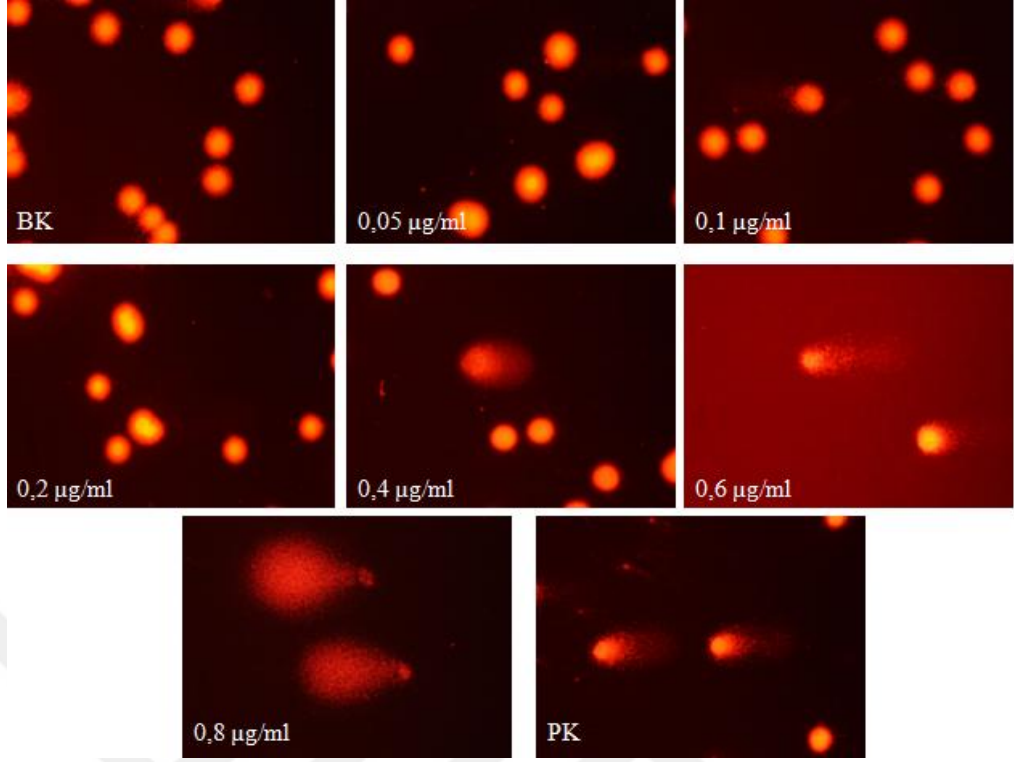
Şekil 4.20. Beas-2B hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen olive kuyruk momenti verileri; Hata çubuklarında standart hatalar belirtilmiştir; ** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$



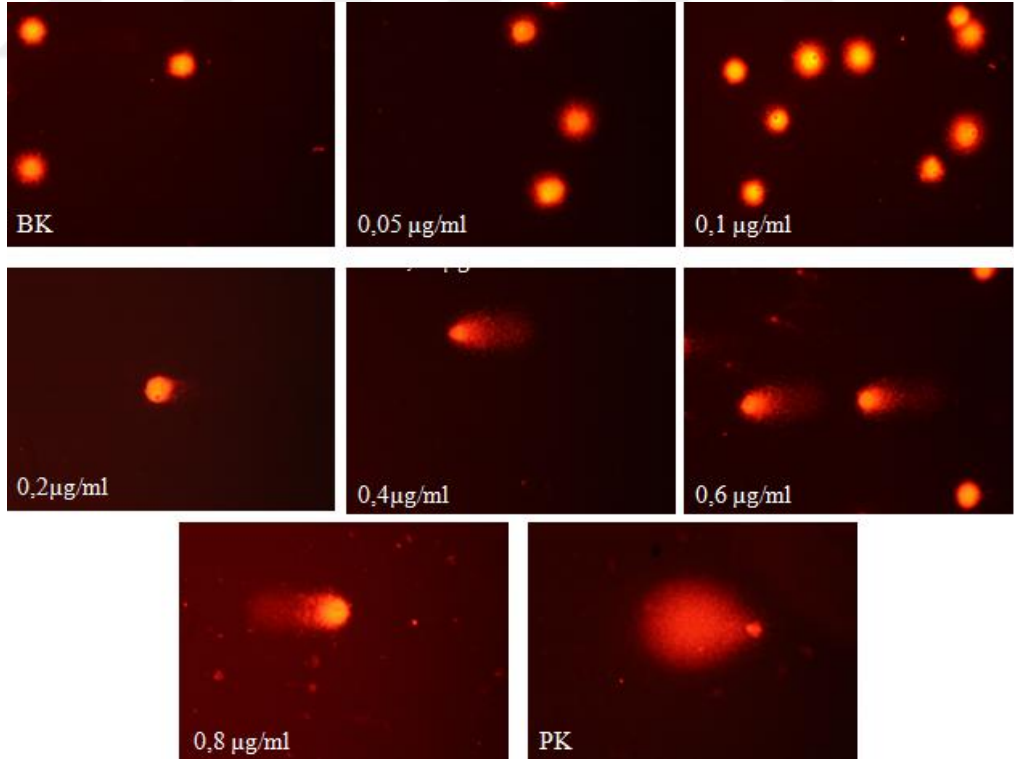
Şekil 4.21. Komet testi sonunda A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için çeşitli konsantrasyonlardaki florasan mikroskop görüntüleri



Şekil 4.22. Komet testi sonunda Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için çeşitli konsantrasyonlardaki florasan mikroskop görüntüleri



Şekil 4.23. Komet testi sonunda A549 hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için çeşitli konsantrasyonlardaki florasan mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.24 Komet testi sonunda Beas-2B hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için çeşitli konsantrasyonlardaki florasan mikroskop görüntüleri

Çizelge 4.7. A549 ve Beas-2B hücre hatlarında *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehiri için Kuyruk uzunluğu sonuçları

Kuyruk uzunluğu bulguları	<i>Montivipera xanthina</i> A549	<i>Montivipera xanthina</i> Beas-2B
Büyüme kontrol	6,15 ± 1,36	6,72 ± 1,46
0,1 µg/ml	6,68 ± 1,69	7,46 ± 1,66
0,2 µg/ml	9,03 ± 2,53	13,2 ± 3,8
0,4 µg/ml	12,20 ± 4,02	21,08 ± 9,57
0,8 µg/ml	16,13 ± 5,11	25,78 ± 12,24
1,6 µg/ml	24,02 ± 10,07	38,32 ± 17,05
3,2 µg/ml	36,54 ± 18,06	42,31 ± 19,07
Pozitif Kontrol	37,36 ± 12,29	37,22 ± 14,76
Kuyruk uzunluğu bulguları	<i>Vipera ammodytes</i> A549	<i>Vipera ammodytes</i> Beas-2B
Büyüme kontrol	6,36 ± 1,43	8,31 ± 2,64
0,05 µg/ml	8,10 ± 2,56	10,08 ± 3,21
0,1 µg/ml	8,97 ± 2,15	11,2 ± 3,83
0,2 µg/ml	12,96 ± 4,16	8,68 ± 2,37
0,4 µg/ml	23,38 ± 5,94	11,44 ± 3,77
0,6 µg/ml	30,52 ± 7,91	15,71 ± 8,24
0,8 µg/ml	77,08 ± 13,53	16,5 ± 6,61
Pozitif Kontrol	38,03 ± 18,81	18,71 ± 7,03

Çizelge 4.8. A549 ve Beas-2B hücre hatlarında *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehiri için Kuyruk % DNA sonuçları

% DNA	<i>Montivipera xanthina</i> A549	<i>Montivipera xanthina</i> Beas-2B
Büyüme kontrol	4,94 ± 1,88	3,31 ± 1,60
0,1 µg/ml	4,36 ± 2,97	3,46 ± 1,60
0,2 µg/ml	6,48 ± 3,25	4,76 ± 2,09
0,4 µg/ml	11,67 ± 4,40	11,51 ± 4,84
0,8 µg/ml	12,43 ± 4,19	14,81 ± 6,98
1,6 µg/ml	14,51 ± 7,06	18,50 ± 9,34
3,2 µg/ml	19,63 ± 9,91	22,43 ± 8,65
Pozitif Kontrol	36,11 ± 14,74	20,86 ± 9,66
% DNA	<i>Vipera ammodytes</i> A549	<i>Vipera ammodytes</i> Beas-2B
Büyüme kontrol	1,81 ± 0,61	4,22 ± 1,44
0,05 µg/ml	3,65 ± 1,41	5,09 ± 2,11
0,1 µg/ml	3,63 ± 0,87	5,91 ± 2,42
0,2 µg/ml	4,50 ± 1,73	4,07 ± 1,29
0,4 µg/ml	11,42 ± 3,75	6,98 ± 2,73
0,6 µg/ml	13,33 ± 5,56	9,7 ± 4,75
0,8 µg/ml	30,02 ± 9,84	10,09 ± 5,48
Pozitif Kontrol	22,88 ± 12,86	26,95 ± 11,43

Çizelge 4.9. A549 ve Beas-2B hücre hatlarında *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehiri için Olive Kuyruk Momenti sonuçları

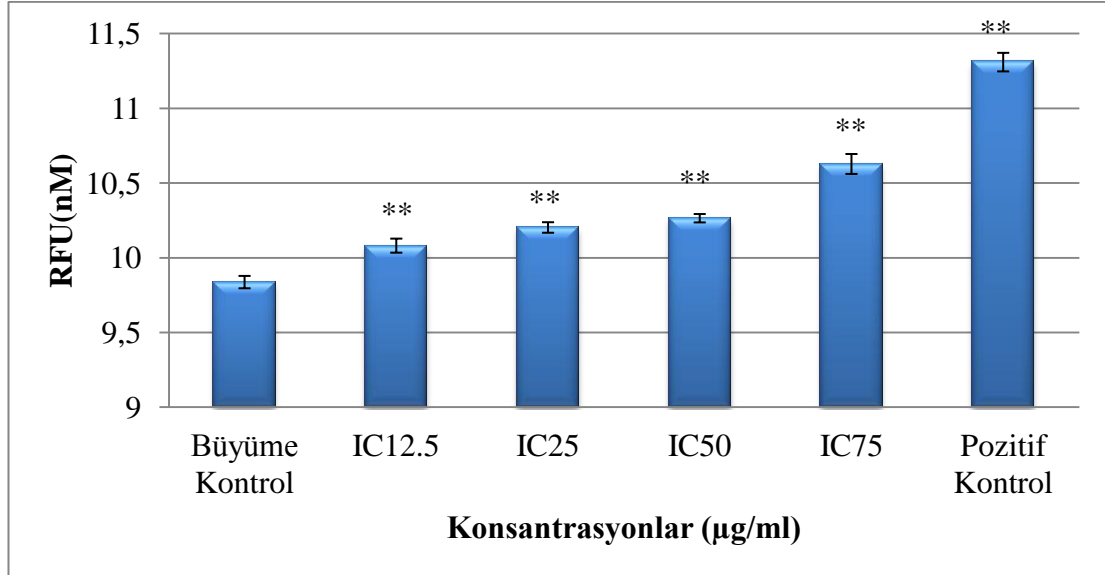
Olive Kuyruk Momenti	<i>Montivipera xanthina</i> A549	<i>Montivipera xanthina</i> Beas-2B
Büyüme kontrol	1,19 ± 0,72	0,75 ± 0,32
0,1 µg/ml	0,72 ± 0,35	0,75 ± 0,49
0,2 µg/ml	1,74 ± 1,00	1,43 ± 0,79
0,4 µg/ml	2,42 ± 1,19	3,74 ± 2,27
0,8 µg/ml	2,91 ± 1,60	4,45 ± 2,55
1,6 µg/ml	3,52 ± 2,55	4,64 ± 3,23
3,2 µg/ml	3,95 ± 2,89	8,01 ± 3,91
Pozitif Kontrol	6,81 ± 4,40	7,39 ± 3,60
Olive Kuyruk Momenti	<i>Vipera ammodytes</i> A549	<i>Vipera ammodytes</i> Beas-2B
Büyüme kontrol	0,41 ± 0,13	1,01 ± 0,43
0,05 µg/ml	0,71 ± 0,33	1,22 ± 0,6
0,1 µg/ml	0,77 ± 0,21	1,35 ± 0,52
0,2 µg/ml	0,92 ± 0,28	0,90 ± 0,26
0,4 µg/ml	4,13 ± 0,48	1,54 ± 0,84
0,6 µg/ml	5,66 ± 2,58	1,72 ± 1,44
0,8 µg/ml	19,91 ± 7,49	2,60 ± 2,12
Pozitif Kontrol	10,47 ± 6,43	9,00 ± 2,66

4.5. ROS Testi Bulguları

A549 ve Beas-2B hücre hatların, (XTT sonuçlarından elde edilen, $IC_{12,5}$, IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarında) *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* türlerinden elde edilen zehirler ile muamele edilmiş ve 6 saat sonraki hücre içi ROS seviyeleri ölçülmüştür. (Çizelge 4.10)

4.5.1. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen ROS testi sonuçları

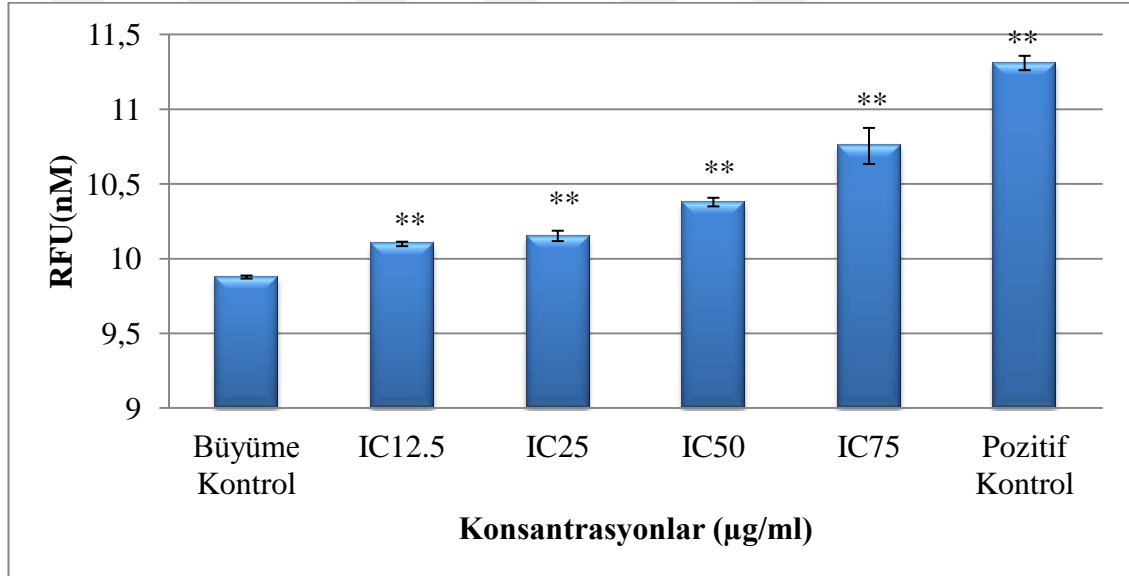
A549 hücrelerinin *Montivipera xanthina* zehiri ile 6 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ortalama ROS değeri $9,83 \pm 0,04$ şeklindedir. $IC_{12,5}$, IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarının bu hücre hattına 6 saat muamele edilmesi sonucundaki ortalama ROS değerleri sırasıyla; $10,08 \pm 0,04$, $10,20 \pm 0,03$, $10,26 \pm 0,028$ ve $10,62 \pm 0,06$ şeklindedir. Pozitif kontrol ise $11,30 \pm 0,06$ olarak saptanmıştır. A549 hücre hattına ait ROS testi bulguları şekil 4.16.'da ve Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri IC_{75} ($2,33 \mu\text{g/ml}$), IC_{50} ($1,55 \mu\text{g/ml}$) ve IC_{25} ($0,77 \mu\text{g/ml}$) ve $IC_{12,5}$ ($0,38 \mu\text{g/ml}$) konsantrasyon grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında konsantrasyon artışına göre ortalama hücre içi ROS seviyesini istatistikî olarak anlamlı şekilde yükselttiği görülmüştür ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.25.)



Şekil 4.25. A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri IC_{75} ($2,33 \mu\text{g/ml}$) , IC_{50} ($1,55 \mu\text{g/ml}$) ve IC_{25} ($0,77 \mu\text{g/ml}$) ve $IC_{12,5}$ ($0,38 \mu\text{g/ml}$) konsantrasyon gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması ** $p \leq 0,001$

4.5.2. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri için elde edilen ROS testi sonuçları

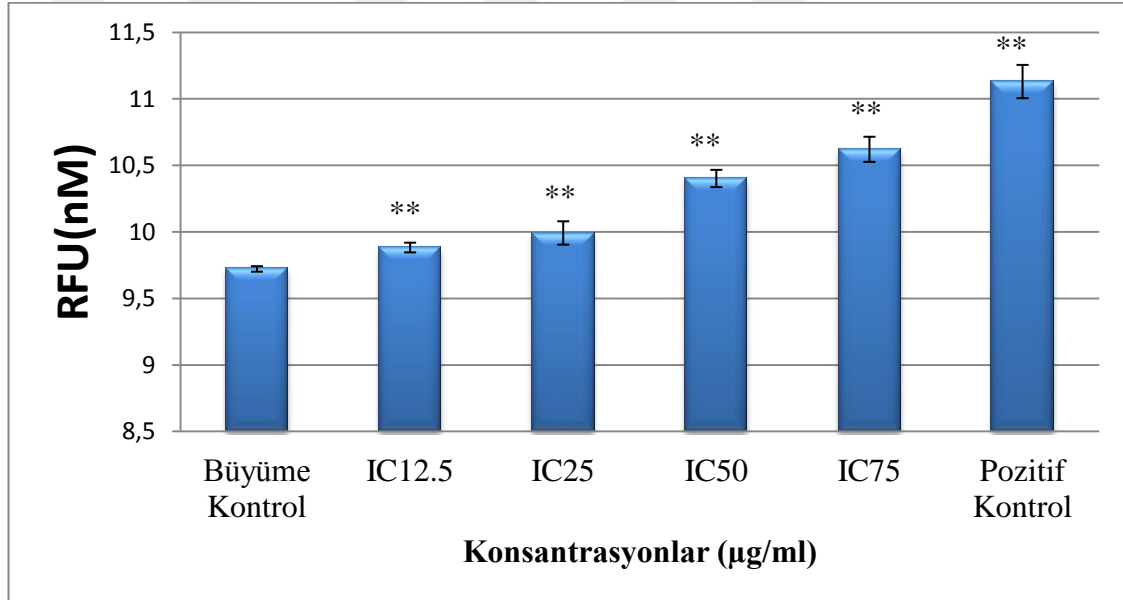
Beas-2B hücre hattına *Montivipera xanthina* zehiri 6 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ROS değeri $9,87 \pm 0,01$ şeklindedir. $IC_{12,5}$, IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarının bu hücre hattına 6 saat muamele edilmesi sonucundaki ROS değerleri sırasıyla $10,09 \pm 0,01$, $10,15 \pm 0,03$, $10,37 \pm 0,02$ ve $10,75 \pm 0,012$ şeklindedir. Pozitif kontrol ise $11,30 \pm 0,04$ olarak saptanmıştır. Beas-2B hücre hattına ait ROS testi bulguları şekil 4.17.'da ve Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri IC_{75} ($3,23 \mu\text{g/ml}$) , IC_{50} ($2,15 \mu\text{g/ml}$) ve IC_{25} ($1,07 \mu\text{g/ml}$) ve $IC_{12,5}$ ($0,53 \mu\text{g/ml}$) konsantrasyon grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında konsantrasyon artışına göre ortalama hücre içi ROS seviyesini istatistikî olarak anlamlı şekilde yükselttiği görülmüştür ($p \leq 0,001$) (Şekil 4.26.)



Şekil 4.26. Beas-2B hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri IC_{75} ($3,23 \mu\text{g/ml}$) , IC_{50} ($2,15 \mu\text{g/ml}$) ve IC_{25} ($1,07 \mu\text{g/ml}$) ve $IC_{12,5}$ ($0,53 \mu\text{g/ml}$) konsantrasyon gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması ** $p \leq 0,001$

4.5.3. A549 hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen ROS testi bulguları

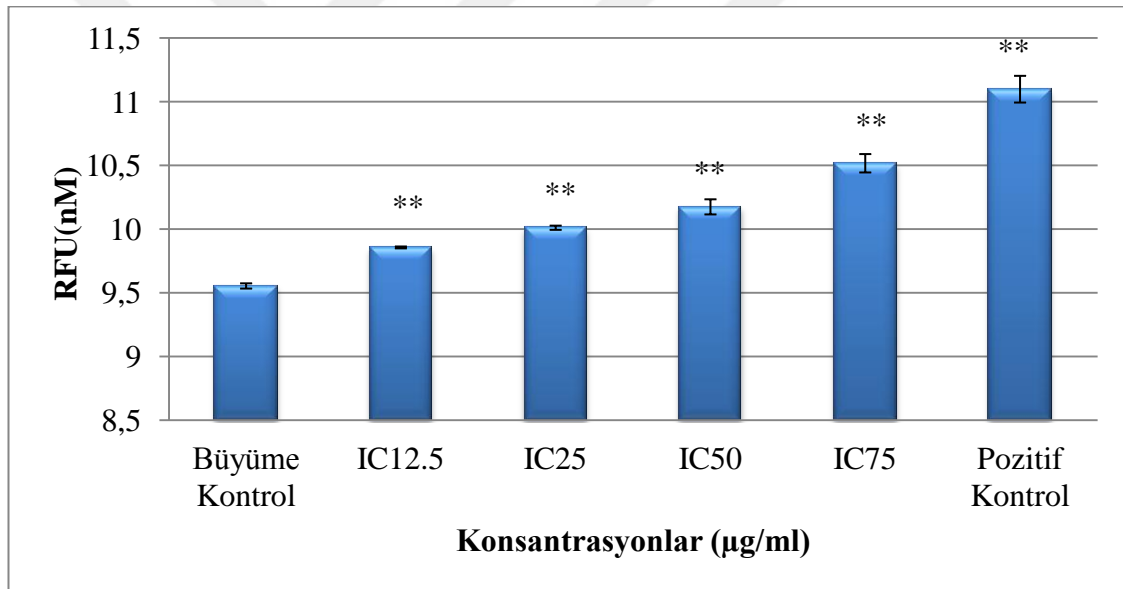
A549 hücre hattına *Vipera ammodytes* zehiri 6 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ROS değeri $9,72 \pm 0,20$ şeklindedir. $IC_{12,5}$, IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarının bu hücre hattına 6 saat muamele edilmesi sonucundaki ROS değerleri sırasıyla $9,88 \pm 0,03$, $9,99 \pm 0,08$, $10,40 \pm 0,07$ ve $10,62 \pm 0,05$ şeklindedir. Pozitif kontrol ise $11,13 \pm 0,12$ olarak saptanmıştır. A549 hücre hattına ait ROS testi bulguları şekil 4.18.'da ve Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir. A549 hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri IC_{75} ($0,644 \mu\text{g/ml}$) ve IC_{50} ($0,429 \mu\text{g/ml}$) IC_{25} ($0,214 \mu\text{g/ml}$) $IC_{12,5}$ ($0,107 \mu\text{g/ml}$) konsantrasyon grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında konsantrasyonartışına göre ortalama hücre içi ROS seviyesini istatistikî olarak anlamlı şekilde yükselttiği görülmüştür ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.27.)



Şekil 4.27. A549 hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri IC_{75} ($0,644 \mu\text{g/ml}$) , IC_{50} ($0,429 \mu\text{g/ml}$) ve IC_{25} ($0,214 \mu\text{g/ml}$) ve $IC_{12,5}$ ($0,107 \mu\text{g/ml}$) konsantrasyon gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması ** $p \leq 0,001$

4.5.4. Beas-2B hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri için elde edilen ROS testi bulguları

Beas-2B hücre hattına *Vipera ammodytes* zehiri 6 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ROS değeri $9,55 \pm 0,02$ şeklindedir. $IC_{12,5}$, IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarının bu hücre hattına 6 saat muamele edilmesi sonucundaki ROS değerleri sırasıyla $9,85 \pm 0,01$, $10,01 \pm 0,16$, $10,17 \pm 0,15$ ve $10,51 \pm 0,07$ şeklindedir. Pozitif kontrol ise $11,09 \pm 0,10$ olarak saptanmıştır. Beas-2B hücre hattına ait ROS testi bulguları şekil 4.19.'da ve Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir. Beas-2B hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri IC_{75} (0,846 $\mu\text{g/ml}$), IC_{50} (0,564 $\mu\text{g/ml}$), IC_{25} (0,282 $\mu\text{g/ml}$) ve $IC_{12,5}$ (0,141 $\mu\text{g/ml}$) konsantrasyon grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında konsantrasyon artışına göre ortalama hücre içi ROS seviyesini istatistikî olarak anlamlı şekilde yükselttiği görülmüştür ($p \leq 0,001$). (Şekil 4.28.)



Şekil 4.28. Beas-2B hücre hattında *Vipera ammodytes* zehiri IC_{75} (0,846 $\mu\text{g/ml}$), IC_{50} (0,564 $\mu\text{g/ml}$) ve IC_{25} (0,282 $\mu\text{g/ml}$) ve $IC_{12,5}$ (0,141 $\mu\text{g/ml}$) konsantrasyon gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması ** $p \leq 0,001$

Çizelge 4.10. *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarındaki ROS testi sonuçları

Dozlar	<i>Montivipera xanthina</i> zehiri		<i>Vipera ammodytes</i> zehiri	
	A549	Beas-2B	A549	Beas-2B
Büyüme Kontrol	9,83 ± 0,41**	9,87 ± 0,01**	9,72 ± 0,02**	9,55 ± 0,02**
IC ₇₅	10,62 ± 0,06**	10,75 ± 0,12**	10,62 ± 0,09**	10,51 ± 0,07**
IC ₅₀	10,26 ± 0,028**	10,37 ± 0,02**	10,40 ± 0,06**	10,17 ± 0,05**
IC ₂₅	10,20 ± 0,03**	10,15 ± 0,03**	9,99 ± 0,08**	10,01 ± 0,01**
IC _{12,5}	10,08 ± 0,04**	10,09 ± 0,01**	9,88 ± 0,03**	9,85 ± 0,01**
Pozitif Kontrol	11,30 ± 0,06**	11,30 ± 0,04**	11,13 ± 0,12**	11,39 ± 0,10**

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanserin son yıllarda giderek artması ve kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerin birçok yan etkisinin olması kanser tedavisinde doğal yollardan elde edilen anti kanser ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalara hız kazandırmıştır. Bu anlamda birçok bitki ve hayvandan elde edilen bileşikler, antikanser araştırmalarda kullanılmaktadır. Özellikle hayvanlar aleminde, farklı hayvan gruplarında çok sayıda zehirli hayvanın varlığı bilinmektedir. Moleküler biyoloji ve biyoteknolojinin gelişmesine paralel olarak zehirler üzerine yapılan antikanser çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Bu anlamda antikanser çalışmalarda akrep, arı, örümcek ve yılan zehirleri kullanılmaktadır.

Yılan zehirleri biyolojik aktif madde içeriği açısından çok geniş bir spektruma olup bu zehirlerinden izole edilen maddelerin kanda agregasyon, kalp durması, hemoliz gibi etkiler yanında sitotoksik ve antikanser etkilere sahip olabileceğine dair çeşitli veriler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar yılan zehirlerinin anti kanser etkilerinin genel olarak yapılarında bulundukları L-aminoasit oksidazlar, fosfolipaz A₂, lektinler, metalloproteinazlar ve disintegrinler gibi birçok madde tarafından sağlandığına işaret etmektedir (Calderon ve ark. 2014).

Gebrim ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada *Bothrops jararaca* türünde izole edilen fosfolipaz A₂ benzeri BthTX-I peptidinin B16F10 fare melanoma hücrelerinde, SKBR3 insan meme adenokarsinoma hücrelerinde ve insan lenfoblastik T hücre lösemi hattında sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir. Sonuç olarak yılan zehirinden saflaştırılan bu fosfolipaz A₂ benzeri maddenin kanserli hücre hatları üzerine sitotoksik etki ettiği ve kansere karşı yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde kullanılabileceği rapor edilmiştir.

De Vieira ve ark. (2008) *Bothrops jararaca* türünün zehirinden elde edilen L-aminoasit oksidaz türevi olan BjarLAAO-I peptidinin Ehrlich ascites tümörünün gelişimini inhibe ettiğini ve böylece farelerin hayatta kalma sürelerinin uzadığını bildirmiştir. Samel ve ark. (2006) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise *Vipera berus* zehirinden elde edilen l-amino oksidazın Hela hücrelerinde düşük

konsantrasyonlarda apoptoza, K562 hücre hattında da yüksek konsantrasyonlarda nekroza sebep olarak sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır.

Trimeresurus stejneger türünden izole edilen TSV-DM adı verilen metalloproteinazın ECV304 kanser hücre hattında hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiş ve hücre morfolojisinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Wan ve ark. 2006). Başka bir çalışmada *Bothrops leucurus* dan elde edilmiş bir metalloproteinaz olan leucurolysin-B T98 (p53 mutant malignant glioblastoma), U87 ve RT2 (p53- wild type malignant glioblastoma), MCF7 (meme kanseri), EAC (Ehrlich ascites kanseri) ve UACC (melanoma) hücre hatlarında apoptoza sebep olduğu gösterilmiştir (Gabriel ve ark. 2012).

Bunun yanında *Agkistrodon halys* türünün zehirinden saflaştırılan L-amino asit oksidazın L1210 (fare lenfotik lösemi), MOLT-4 (insan T-cell lösemi), RPMI1788 (insan hematopietik hücresi), HL60 (insan promyelositik hücresi) ve HeLa (İnsan epitheloid karsinoma) hücre hatlarında sitotoksik etkisinin olduğu ve bu hücrelerde apoptoza sebep olduğu bildirilmiştir (Sung Min ve Kim 1996).

Bu tez çalışmasında *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* türlerine ait zehirlerin sitotoksik etkileri XTT ve klonojenik test yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. XTT testi sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, *Montivipera xanthina* ait zehir için A549 ve Beas-2B hücre hatlarındaki IC50 değerleri sırasıyla $1,553 \pm 0,578 \mu\text{g/ml}$ ve $2,156 \pm 0,853 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. XTT sonucunda elde edilen IC50 değerleri açısından Beas-2B ve A549 hücre hatları arasında istatistikî olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). *Vipera ammodytes* zehri için ise A549 ve Beas-2B hücre hatlarındaki IC50 değerleri sırasıyla $0,429 \pm 0,018 \mu\text{g/ml}$ ve $0,564 \pm 0,150 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar karşılaştırıldığında Beas-2B ve A549 hücre hatları arasında IC50 eğeri açısından istatistikî olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Sonuç olarak XTT testi ile belirlenen IC50 değerleri açısından *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* türlerinden elde edilen zehirler sağlıklı ve kanserli hücreler üzerinde anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

Bununla birlikte *Vipera ammodytes* türünden elde edilen zehir *Montivipera xanthina* türünden elde edilen zehire kıyasla hem A549 hem de Beas-2b hücre hatlarında daha yüksek oranda sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$).

Klonojenik test verileri incelendiğinde *Montivipera xanthina* zehiri ile Beas-2B hücreleri üzerinde yapılan denemeler sonucunda IC50 değeri $2,457 \pm 0,169$ $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer A549 hücrelerinde ise $2,112 \pm 0,116$ $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. A549 hücre hattında artan zehir konsantrasyonlarına ($0,4\mu\text{g/ml}$, $0,6$ $\mu\text{g/ml}$ $0,8$ $\mu\text{g/ml}$, $1,6$ $\mu\text{g/ml}$, $2,4$ $\mu\text{g/ml}$ ve $3,2$ $\mu\text{g/ml}$) maruz kalan hücrelerde canlılık oranlarının istatistikî açıdan anlamlı bir azalış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Aynı şekilde sağlıklı Beas-2B hücre hattında artan konsantrasyonlarda ($0,4$ $\mu\text{g/ml}$ $0,8$ $\mu\text{g/ml}$. $1,2$ $\mu\text{g/ml}$, $1,6$ $\mu\text{g/ml}$, ve $3,2$ $\mu\text{g/ml}$) hücrelerin canlılık oranlarında anlamlı bir azalışın olduğu saptanmıştır. *Montivipera xanthina* zehiri için yapılan klonojenik test sonucunda elde edilen IC50 değerleri açısından, Beas-2B ve A549 hücre hatları karşılaştırıldığında istatistikî olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Vipera ammodytes türü zehiri için yapılan klonojenik test sonuçlarına bakıldığında sağlıklı Beas-2B hücreleri üzerinde yapılan denemeler sonucunda IC50 değeri $0,473 \pm 0,094$ $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. A549 hücre hattındaki IC50 değeri ise $0,448 \pm 0,087$ $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. *Vipera ammodytes* zehiri için yapılan klonojenik test sonuçları incelendiğinde IC50 değerleri açısından Beas-2B ve A549 hücre hatları arasında istatistikî olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. ($p>0,05$).

Klonojenik test sonuçları değerlendirildiğinde hem *Montivipera xanthina* hem de *Vipera ammodytes* türlerinden elde edilen yılan zehirlerinin sağlıklı ve kanserli hücrelerin koloni oluşturabilme yetenekleri üzerine olan etkileri açısından istatistikî olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Viperidae familyasına ait diğer yılan türlerinde yapılmış araştırmalarda sitotoksik etkilerinin genel olarak zehir içeriğindeki L-aminoasit oksidazlar, fosfolipaz A₂, lektinler, metolloproteinazlar ve disintegrinler gibi enzimlerden kaynaklandığı saptanmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan iki yılan türünün de viperidea familyasına

ait olması gözlemlenen sitotoksik etkilerinin zehir içeriğinde bulunabilecek bu ve benzeri enzimlerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir

Yılan zehirlerinin sitotoksik etkileri yanında genotoksik etkiye sahip olabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Zabiola ve ark. (2014) *Bothrops moojeni* türünün zehrinin Vero hücre hattında genotoksik etkilerini komet ve mikronukleus testleri ile araştırmışlar ve konsantrasyona ile zamana bağlı olarak genetik hasar oranlarının arttığını rapor etmişlerdir. Yazarlar ayrıca bu genetik hasarların kullanılan zehrin yapısında bulunan kompleks kimyasal karışımları nedeniyle ortaya çıkmış olabileceğini ve özellikle L-amino oksidazın, L-amino asitleri oksidatif deaminasyonuna sebep olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bunun yanında L amino oksidaz, oksidatif strese sebep olan ve aynı zamanda potansiyel mutajen olan; alfa keto asitler, amonyak ve hidrojen peroksit gibi maddelerin oluşumuna sebep olabileceği belirtmişlerdir.

Bunun yanında, *Bothrops moojeni* türüne ait yılanlardan elde edilen zehrin, bir inflamatuvar medyatör olan nitrik oksit oluşumunu indüklediği ve bu nitrik oksitinin de superoksitler ve oksijenle etkileşime girerek DNA üzerinde genotoksik etkilere yol açabileceği gösterilmiştir (Wu ve ark. 2006, Nascimento ve ark. 2010).

Viperidae familyasına ait olan *Crotalus durissus terrificus* zehiri ve bu zehirden izole edilen crotoxin, crotapotin ve CBPLA₂ lerin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri komet ve mikronukleus testleri ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda 3 µg/ml den yüksek konsantrasyonlarda DNA kırık oranlarında ve mikronukleus frekanslarında anlamlı artışlar olduğu bildirilmiştir (Marcussi ve ark. 2011).

Marcussi ve ark. (2013) *Bothrops jararacussu*, *Bothrops brazili* ve *Bothrops atrox* türlerinin zehirleri ve bu zehirlerden elde edilen BthTX-I myotoksin, BthTX-II myotoksin,, BjussuMP-II metalloproteaz ve BatxLAAO L-amino asit oksidaz toksinlerin insan lenfosit hücreleri üzerindeki etkilerini genotoksik etkileri komet ve mikronukleus testleriyle araştırmışlardır. Komet testi sonuçları bu toksinlerin ve zehirlerin 5 µg/ml nin üzerindeki konsantrasyonlarda DNA kırıklarını indüklediğini

göstermiştir. Benzer şekilde yılan zehirlerinin ve bunlardan izole edilen toksinlerin mikronükleus oluşumunu indüklediği gösterilmiştir.

Vipoxin *Vipera ammodytes meridionalis* zehirinden izole edilen fosfolipaz A₂ türevi bir nörotoksik maddedir. HepG2 hücrelerini üzerine yapılan bir çalışmada vipoxin subuniteleri ve vipoxinin genotoksik etkileri komet testiyle araştırılmış ve hem vipoxin hem de alt ünitelerinin genotoksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Doumanov 2015).

Bu tez çalışmasında *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin yol açabileceği olası DNA hasarlarını belirlemek için yaygın kullanılan test yöntemlerinden biri olan alkali komet testinden yararlanılmıştır.

Montivipera xanthina zehiri için 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,8 µg/ml, 1,6 µg/ml, ve 3,2 µg/ml'lik konsantrasyonlara maruz bırakılan sağlıklı Beas-2B ve kanserli A549 hücre hattında komet testi uygulanmıştır. *Vipera ammodytes* türünden elde edilen zehirin ise 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,6 µg/ml ve 0,8 µg/ml'lik konsantrasyonları ile muamele edilmiş sağlıklı Beas-2B ve kanserli A549 hücre hattında DNA hasar miktarları komet testi ile ölçülmüştür. Komet testinde DNA hasarlarının analizinde ise kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA miktarı ve olive kuyruk momenti parametreleri değerlendirilmiştir.

Montivipera xanthina A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehiri konsantrasyona bağlı olarak kuyruk uzunluğunu kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (p<0,05). Aynı konsantrasyonlara maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında da artan konsantrasyona bağlı olarak kuyruk uzunluğunu kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir (p<0,05).

Montivipera xanthina zehiri için A549 ve Beas-2B hücre hatları kıyaslandığında 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,8 µg/ml, 1,6 µg/ml'lik konsantrasyonlarda kuyruk uzunluğunun istatistikî olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görülmüştür. Beas-2B hücre hattında bu aynı dozlarda belirlenen kuyruk uzunluğunun A549 hücre hattına kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır.

Montivipera xanthina zehirine 0,1 µg/ml 0,2 µg/ml 0,4 µg/ml, 0,8 µg/ml, 1,6 µg/ml, ve 3,2 µg/ml'lik konsantrasyonlarda maruz bırakılan A549 hücre hattında konsantrasyona bağlı olarak kuyruk % DNA miktarları kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (p<0,05). Benzer şekilde aynı Beas-2B hücre hattında da kuyruk % DNA miktarları da konsantrasyona bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (p<0,05).

Montivipera xanthina zehiri için A549 ve Beas-2B hücre hattı kıyaslandığında 0,1 µg/ml ve 0,2 µg/ml'lik dozlarda A549 hücre hattında belirlenen kuyruk % DNA miktarının Beas-2B hücre hattına göre fazla olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte kuyruk % DNA miktarlarının 0,8 µg/ml ve 1,6 µg/ml'lik konsantrasyonlarda Beas-2B hücre hattında A549 hücre hattına kıyasla daha fazla olduğu ve bu farklılığın istatistikî olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p<0,05).

Komet testinde ölçülen son parametre olan olive kuyruk momenti değerleri incelendiğine A549 hücre hattında *Montivipera xanthina* zehirinin konsantrasyona bağlı olarak olive kuyruk momenti bulguları kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (p<0,05). *Montivipera xanthina* zehirinin benzer şekilde BEAS-2B hücrelerinde de artan konsantrasyona bağlı olarak olive kuyruk momenti değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (p<0,05).

Montivipera xanthina zehiri için A549 ve Beas-2B hücre hattı kıyaslandığında 0,4 µg/ml, 0,8 µg/ml, 1,6 µg/ml ve 3,2 µg/ml'lik ve konsantrasyonlarda Beas-2B hücre hattında olive kuyruk momenti değerlerinin A549 hücre hattına kıyasla daha yüksek olmasına rağmen istatistikî olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görülmüştür (p<0,05).

Çalışmamızda kullandığımız ikinci yılan türü olan *Vipera ammodytes* zehirine maruz bırakılan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde de benzer sonuçlar alınmıştır. 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml 0,2 µg/ml 0,4 µg/ml, 0,6 µg/ml ve 0,8 µg/ml'lik konsantrasyonlarda maruz bırakılan kanserli A549 hücre hattında konsantrasyona bağlı olarak kuyruk uzunluğunu kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (p<0,05). Aynı

konsantrasyonlarda sağlıklı Beas-2B hücre hattında da kuyruk uzunluğunu değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

Vipera ammodytes zehiri açısından A549 ve Beas-2B hücre hatları kıyaslandığında 0,05 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda Beas-2B hücre hattında kuyruk uzunlukları miktarında A549 hücre hattına göre fazla ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,6 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda A549 hücre hattında kuyruk uzunlukları Beas-2B hücre hattına kıyasla daha fazla olduğu ve istatistikî olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Vipera ammodytes zehirinin hem A549 hem de Beas-2B hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak kuyruk % DNA miktarları kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

Vipera ammodytes zehiri için A549 ve Beas-2B hücre hattı kıyaslandığında 0,05 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda Beas-2B hücre hattında kuyruk % DNA miktarları A549 hücre hattına göre fazla ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,6 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda A549 hücre hattında kuyruk % DNA miktarları Beas-2B hücre hattına kıyasla daha fazla olduğu ve istatistikî olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Vipera ammodytes zehiri ile yürütülen deneylerde olive kuyruk momenti değerlerinin hem A549 hem de Beas-2B hücrelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

Vipera ammodytes zehiri için A549 ve Beas-2B hücre hattı kıyaslandığında 0,05 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda Beas-2B hücre hattında belirlenen olive kuyruk momenti değerlerinin A549 hücre hattına göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek olduğu bulunmuştur. 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,6 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda A549 hücre hattında olive kuyruk momenti miktarları Beas-2B hücre hattına kıyasla daha fazla olduğu ve istatistikî olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Yapılan literatür taramaları viperidae familyasına ait türlerden elde edilen zehirlerin genotoksik etkilerinin zehirin bileşiminde bulunan fosfalipazA₂ benzeri enzimlerin, metalloproteinazların ve L-amino asit oksidazlar gibi enzimler sonucunda oluşabileceğini göstermiştir. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen komet testleri sonucunda A549 ve Beas-2B hücre gözlenen DNA hasarlarının da çalışmamızda kullandığımız viperidae familyasına ait iki tür olan *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinde bulunan benzer bileşenler sebebiyle meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili olarak bu iki türe ait zehir içeriklerinin detaylı olarak çıkarılması ile daha özgün çalışmaların yapılabilmesi mümkün olabilecektir.

Hücre ölümüne yol açan mekanizmalardan biri de hücre içerisinde serbest oksijen radikallerinin artmasıdır. Yılan zehirleri içerisinde bulunan enzimatik veya non enzimatik yapılarla hücre içerisindeki ROS seviyelerine etki edebildikleri bilinmektedir. Bu tez çalışmasında da *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* türlerinin zehirleri tarafından A549 ve Beas-2B hücrelerinin içinde oluşturduğu serbest radikallerin seviyeleri DFC-DA maddesi kullanılarak yapılan ROS testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. ROS testi için A549 hemde Beas-2B hücre hatlarında XTT testinde belirlenen IC_{12,5}, IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ konsantrasyonlar kullanılmıştır. 6 saatlik uygulama sonunda hücre içi reaktif oksijen miktarları ölçülmüştür.

Montivipera xanthina türünden elde edilen zehirin, A549 hücre hattında IC_{12,5}, IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ konsantrasyonlarında RFU değerleri hesaplanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla RFU değerlerinde artış görülmüş ve bu artış tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Aynı zehirin Beas-2B hücre hatındaki IC_{12,5}, IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (p<0,05). A549 ve Beas-2B hücre hatları birbirleriyle kıyaslandığında iki hücre hattı arasında ROS oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p≥0,05).

Vipera ammodytes türünden elde edilen zehirin, A549 hücre hattında IC_{12,5}, IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ konsantrasyonlarında RFU değerleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla

artış görülmüş ve bu artış tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Aynı zehirin Beas-2B hücre hattındaki sonuçları incelendiğinde RFU değerlerinde tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). A549 ve Beas-2B hücre hatları birbirleriyle kıyaslandığında iki hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p \geq 0,05$).

Viperidae familyasına ait türlerin zehir bileşiminde bulunan L aminoasit oksidaz ve disintegrinler gibi enzimlerin hücre içi ROS seviyelerini arttırdığı yapılan çeşitli literatür çalışmalarında görülmüştür. Örneğin, Al Asmari ve ark. (2016) yaptığı çalışmada *Bitis arietans*, *Cerastes Gasperettii*, *Echis Coloratus*, ve *Echis pyramidum* türlerinin zehirlerinin HCT-8 (çekum adenokarsinomu) ve MDA-MB-231 (meme kanseri) hücre hatlarında serbest reaktif oksijen miktarlarını kontrol gruplarına göre yükselttiğini ve bu serbest reaktif oksijen değerlerinin yükselmesinde zehir içeriğinde bulunan L aminoasit oksidaz enzimini etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Serbest reaktif oksijen değerlerinin yükselmesi hücrelerde apoptoza sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada ise *Macrovipera lebetina turanica* zehirinin insan nöroblastoma hücreleri olan SK-N-MC ve SK-N-SH üzerine ROS seviyelerinin arttırdığını ve mitokondrial zar potansiyelini etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca bu zehirin hücreleri apoptoza sürüklediğini ve pro-apoptotik proteinlerin regülasyonu artırdığı ve Bcl2 gibi anti apoptotik proteinlerini regülasyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Park ve ark. 2009)

Macrovipera lebetina zehirinden izole edilen bir disintegrin olan lebeinin ise insan melonama hücre hatları olan SK-MEL-28 ve LU-1205 hücrelerinde ROS seviyeleri üzerine etkileri araştırılmış ve lebeinin'in LU-1205 hücre hattında ROS seviyesini artırdığı, SK-MEL-28 hücre hattında ise ROS oluşumlarını inhibe ettiği bildirilmiştir (Hammouda ve ark. 2016).

Sonuç olarak *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* türlerinin zehirlerinin kanser tedavisinde kullanılabilme potansiyellerini araştırmak amacıyla Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvarında yürütülen bu ön

çalışmada her iki yılan zehirinin de sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiş olmakla birlikte sağlıklı ve kanser hücre hatlarındaki etki açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte çalışmamızda kullanılan zehirler yılanlardan total olarak elde edildikleri şekilleri ile kullanılmıştır. *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* zehirlerinin biyokimyasal içeriklerinin daha detaylı belirlenmesi ve ilave test yöntemleri ile hücre hatlarının kullanılacağı yeni çalışmaların yapılması gerekli görülmektedir. Böylece bu zehirlerden izole edilebilecek toksinlerin kanser ve sağlıklı hücreler üzerindeki olası seçici sitotoksik ve genotoksik etkilerinin ve bu etkilere ait mekanizmalarının daha detaylı bir biçimde ortaya konulması mümkün olabilecektir. Bunun yanında ülkemizde biyolojik çeşitlilik ve ekolojik açıdan bu iki türün önemli olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle biyolojik değerleri yanında antikanser ilaç geliştirebilme potansiyeli açısından bir kaynak konumunda olan *Montivipera xanthina* ve *Vipera ammodytes* türlerinin popülasyonlarının korunması adına gerekli önlemlerin alınması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akkaya, A., Uğurtaş, İ. 2012.** Rediscovery of *Vipera ammodytes* (LINNAEUS, 1758) at Uludağ-Bursa, Turkey, after 62 years. *Herpetozoa*, 24(3/4): 181-185.
- Al-Asmari, K.A., Riyasdeen, A., Al-Shahrani, M.H., Islam, M. 2016.** Snake venom causes apoptosis by increasing the reactive oxygen species in colorectal and breast cancer cell lines. *Onco Targets and Therapy*, (9): 6485–6498.
- Ali, M.A.A.M. 2012.** Studies on Bee Venom and Its Medical Uses. *International Journal of Advancements in Research & Technology*, 1(2): 2278-7763.
- Anindita, D., Chatterjee, U., Das, M., Vedasiromoni, J.R., Gomes, A. 2007.** Venom of Indian monocellate cobra and Russell's viper show anticancer activity in experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, (111): 681–684.
- Anonim 2017 a** Sağlık Bakanlığı Türkiye Kanser İstatistikleri Ankara 2017
- Anonim 2017 b** Cosmasie Brillant blue G-250 boyasının (www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/27815?lang=en®ion=TR) Erişim Tarihi 15.05.2017
- Arı, F., Ulukaya, E., Oran, S., Çelikler, S., Öztürk, S., Özel, M.Z. 2015.** Promising anticancer activity of a lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against breast cancer cell lines and genotoxic effect on human lymphocytes. *Cytotechnology*, (67): 531-543.
- Arıkan, H., Göçmen, B., İğci, N., Akman, B. 2014.** Age-Dependent Variations in The Venom Proteins Of *Vipera kaznakovi* Nikolsky, 1909 And *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Viperidae) *Turkish Journal of Zoology*, 38(2): 216-221.
- Arıkan, H., Kumlutaş, Y., Türkozan, O., Baran, İ. 2003.** Electrophoretic patterns of some viper venoms from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, (27): 239-242.
- Arunmozhiarasi, A., Cher, C.D., Lim, K., Koh, D.C., Howells, D.W., Jeyaseela, K. 2009.** A Secretory Phospholipase A2-Mediated Neuroprotection And Anti-Apoptosis. *BMC Neuroscience*, (10): 120
- Batchelor, W.B., Tolleson, T.R., Huang, Y., Larsen, R.L., Mantell R.M., Dillard, P., Davidian, M., Zhang, D., Cantor, W.J., Sketch, M.H., Ohman E.M., Zidar, J.P., Gretler, D., DiBattiste, P.M., Tchong, J.E., Califf, R.M., Harrington, R.A. 2002.** Randomized COMparison of Platelet Inhibition With Abciximab, TiRofiban and Eptifibatide During Percutaneous Coronary Intervention in Acute Coronary Syndromes: The COMPARE Trial. *Circulation*, (106): 1470–1476.
- Bernardini, S., Stefano, C., Sergio, F., Paolo, L., Stefano, R. 1996.** Effect Of Ammodytin L From The Venom Of *Vipera Ammodytes* On *Xenopus Laevis* Differentiated Muscle Fibres And Regenerating Limbs. *Toxicon*, (34): 81-90.

Bogdanov, S. 2014. Composition, Health, Medicine: A Review. *Bee Product Science*, www.bee-hexagon.net-(2017)-.

Boldrini-França, J., Corrêa-Netto, C., Silva, M. M. S., Rodrigues, R. S., Torre, P. D. L., Pérez, A., Soares, A. M., Zingali, R. B., Nogueira, R. A., Rodrigues, V. M., Sanz, L., Calvete, J. J. 2010. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *Journal of Proteomics*, (73): 1758–1776.

Bradbury, M.W., Deane, R. 1993. Permeability of the blood-brain barrier to lead. *Neurotoxicology*, 14(2-3): 131-6.

Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, (72): 248-254.

Bragi, B.J., Fox, J.W. 1994. Hemorrhagic Metalloproteinases From Snake Venoms *Pharmacology & Therapeutics*, (62): 325-372.

Budak, A., Göçmen, B. 2008. Herpetoloji. Ege Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi Yayın No: 194, 226 s., İzmir.

Calderon, L.A., Sobrinho, J.C., Zaqueo, K.D., de Moura, A.A., Grabner, A.N., Mazzi, M.V., Marcussi, S., Nomizo, A., Fernandes, C.F.C., Zuliani, J.P., Carvalho, B.M.A., da Silva, S.L., Stábeli, R.G., Soares, A.M. 2014. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *BioMed Research International*, 2014(2014): 19. California.

Calvete, J.J., Juárez, P., Sanz, L. 2007. Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(11): 1405–1414.

Castro, H.C., Zingali, R.B., Albuquerque, M.G., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C.R. 2004. Snake Venom Thrombin-Like Enzymes: From Reptilase To Now. *Cellular And Molecular Life Sciences*, (61): 843–856.

Celikler-Kasimogulları, S., Oran, S., Arı, F., Ulukaya, E., Aztopal, N., Sarimahmut, M., Öztürk, S. 2014. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt in vitro. *Turkish Journal of Biology*, (38): 940-947.

Chippaux, J.P. 2012. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Design, Development and Therapy*, (6): 165–173.

Chippaux, J.P., Williams, V., White, J. 1991. Snake Venom Variability: Methods Of Study, Results And Interpretation. *Toxicon*, (29): 1279-1303.

Cohen, O., Kronman, C., Chitlaru, T., Ordentlich, A., Velan, B., Shafferman, A. 2001. 795 Effect Of Chemical Modification Of Recombinant Human Acetylcholinesterase By Polyethylene Glycol On Its Circulatory Longevity. *Biochemical Journal*, (357): 795-802.

Daltry, J. C., Wüster, W., Thorpe, R.S. 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature*, 379(6565): 537–540.

De Vieira Santos, M.M., Sant’Ana, C.D., Giglio, J.R., Da Silva, R.J., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Fecchio, D. 2008. Antitumoural Effect of an L-Amino Acid Oxidase Isolated from *Bothrops jararaca* Snake Venom. *Journal Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology*, (102): 533–542.

Deshane, J., Garner, C.C., Sontheimer, H. 2003. Chlorotoxin Inhibits Glioma Cell Invasion via MatrixMetalloproteinase-2. *The Journal Of Biological Chemistry*, (278): 4135–4144.

Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. 2010. Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroferez” Yöntemi İle DNA Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2): 77- 89.

Doumanov, J., Mladenova, K., Topouzova-Hristova, T., Stoitsova, S., Petrova, S. 2015. Effects of vipoxin and its components on HepG2 cells. *Toxicon*, 94(2015): 36-44.

Du Plessisa, L.H., Elgara, D. Du Plessis, J.L. 2008. Southern African scorpion toxins: An overview. *Toxicon*, (51): 1–9.

Du, X.Y., Sim, D.S., Lee, W.H., Zhang, Y. 2006. Blood cells as targets of snake toxins. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, (36): 414–421.

Ece, F., Hürkal, T.K. 2010. Akciğer Kanserinden Korunma: Akciğer Kanserinde Tedavi Ve Bakım, Editörler: Aydın, A., Can, G., İpomet Matbaacılık- İstanbul, 13-23.

Erdamar, H., Hacıevliyagil Kazancı, F., Gök, S. 2015. Kanserde Biyokimyasal Değişiklikler. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, (3): 430-438.

Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sanchez, E.F., Richardson, M., Fox, J.W., Gutierrez, J.M. 2011. Role of Collagens and Perlecan in Microvascular Stability: Exploring the Mechanism of Capillary Vessel Damage by Snake Venom Metalloproteinases. *PLoS One*, 6(12): e28017.

Escoubas, P. 2006. Mass spectrometry in toxinology: a 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. *Toxicon*, (47): 609–613.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5): 359-86.

Fox, J.W., Serrano, M.T. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45(8): 969–985.

Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Van Bree, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 339p.

Fry, B.G., Winkel, K.D., Wickramaratna, J.C., Hodgson, W.C., Wüster, W. 2003. Effectiveness of Snake Antivenom: Species and Regional Venom Variation and Its Clinical Impact. *Journal of Toxicology–Toxin Reviews*, 22(1): 23–34.

Furtado, M.F.D., Travaglia-Cardoso, S.R., Rocha, M.M.T. 2006. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). *Toxicon*, (48): 401–410.

Gabriel, L.M., Sanchez, E.F., Silva, S.G., Santos, R.G. 2012. Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18(1): 24-33.

Gajski, G., Cimboraz-Zovko, T., Rak, S., Osmak, M., Garaj-Vrhovac, V. 2015. Antitumour action on human glioblastoma A1235 cells through cooperation of bee venom and cisplatin. *Cytotechnology*, 68(4): 1197-205.

Gao, L., SHAN, B., CHEN, J., LIU, J., SONG, D., ZHU, B. 2005. a Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, (3): 369–376.

Gao, L., YU, S., WU, Y., SHAN B. 2007. Effect of Spider Venom on Cell Apoptosis and Necrosis Rates in MCF-7 Cells. *DNA And Cell Biology*, 26(7): 485–489.

Gao, L., Zhang, J., Liu, X., Zhao, M., Li, L., Liu, X., Zhao, B. 2013. Effect of spider venom on inhibition proliferation of TE13 cells in vivo and in vitro. *Thoracic Cancer*, 4(3): 306–311.

Gao, Rong., Zhang, Y., Gopalakrishnakone, P. 2008. Purification and N-terminal sequence of a serine proteinase-like protein (BMK-CBP) from the venom of the Chinese scorpion (*Buthus martensii* Karsch). *Toxicon*, (52): 348–353.

Gao, W., Starkov, V.G., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.N., Lin, Z., Bi, R. 2005. Isolation And Preliminary Crystallographic Studies Of Two New Phospholipases A2 From *Vipera Nikolskii* Venom. *Acta Crystallographica Section F*, (61): 189-192.

Gaspar, D., Salomé Veiga, A., Castanho, M.A.R.B. 2013. From antimicrobial to anticancer peptides. *Frontiers in Microbiology*, 4(294).

Gebrim, L.C., Marcussi, S., Menaldo, D.L., De Menezes Auro Nomizo, C.S.R., Hamaguchi, A., Silveira-Lacerda, E.P., Homsí-Brandeburgo, M.I., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Rodrigues, V.M. 2009. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49nphospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals*, 37(2009): 222-229.

Ghavami, S., Asoodeh, A., Klonisch, T., Halayko, A.J., Kadkhoda, K., Krocak, T.J., Gibson, S.B., Booy, E.P., Naderi-Manesh, H., Los, M. 2008. Brevinin-2R1 semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(3): 1005-1022.

Gibbs, H.L., Sanz, L., Calvete, J.J. 2009. Snake Population Venomics: Proteomics-Based Analyses of Individual Variation Reveals Significant Gene Regulation Effects on Venom Protein Expression in *Sistrurus Rattlesnakes*. *Journal of Molecular Evolution*, 68(2): 113-125.

Girish K.S., Kemparaju, K. 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*, (80): 1921–1943.

Gomes, A., Giri, B., Kole, L., Saha, A., Debnath, A., Gomes, A. 2007.b A crystalline compound (BM-ANF1) from the Indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract, induced antiproliferation and apoptosis in leukemic and hepatoma cell line involving cell cycle proteins. *Toxicon*, 50(6): 835-849.

Gomes, A., Pushpak, B., Roshnara, M., Ajoy, K., Biswas, S., Chandra, D., Biplab, G. 2010. Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian Journal Of Experimental Biology*, (48): 93-103.

Gomes, A., Giri, B., Saha, A., Mishra, R., Dasgupta, S.C., Debnath, A. 2007.a. Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(7): 579-93.

Goswami, P.K., Samant, M., Srivastava, R.S. 2014. Snake Venom, Anti-Snake Venom & Potential Of Snake Venom. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 6(5): 4-7.

Goudet, C., Cheng-Wu, C., Jan, T. 2002. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*, (40): 1239–1258.

Göçmen, B., Arıkan, H., Mermer, A., Langerwerf, B., Bahar, H. 2006. Morphological, Hemipenial and Venom Electrophoresis Comparisons of the Levantine Viper, *Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758), from Cyprus and Southern Anatolia. *Turkish Journal of Zoology*, (30): 225-234.

Göçmen, B., Arıkan, H., Özbel, Y., Mermer, A., Çiçek, K. 2006. b Clinical, Physiological and Serological Observations of a Human Following a Venomous Bite by *Macrovipera lebetina* (Reptilia: Serpentes). *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30 (2): 158-162.

Guo, J., Zuo, L., Liu, J., Hu, X., Li, C., Zhao, Y., Gao, L. 2010. Effect of P38 MAPK on the apoptosis of human lung adenocarcinoma cell induced by the spider venom. *Thoracic Cancer*, 1(2): 77-82.

Gupta, D.S., Gomes, A., Debnath, A., Saha, A., Gomes, A. 2010. Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: Through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chemico-Biological Interactions*, (183): 293-303.

Gustavo, N., Liliana, S., Luciana, S., Gilson, F., Michael, R., Karla, E., Markus, K., Celia, G., Alexei, N., Flavia, de R., Johannes, E., Eladio, S. 2011. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1810): 683-694.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Angulo, Y., Calvete, J.J. 2009. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics*, (72): 165-182.

Hait, W.N., Grais, L., Benz, C., Cadman, C. 1985. Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: Phenothiazines and melittin. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 14(3): 202-205.

Hammouda, M.B., Montenegro, M.F., Sánchez-del-Campo, L., Zakraoui, O., Aloui, Z., Riahi-Chebbi, I., Karoui, H., Rodríguez-López, J.N., Essafi-Benkhadir, K. 2016. Lebein, A Snake Venom Disintegrin, Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells. *Toxins*, 8(7): 206.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5): 646-74.

Hashimoto, S., Jingt, Y., Kawazoe, N., Mast, Y., Nakajo, S., Yoshida, T., Kuroiwal, Y., Nakaya, K. 1997. Bufalin Reduces The Level Of Topoisomerase II In Human Leukemia Cells And Affects The Cytotoxicity Of Anticancer Drugs. *Leukemia Research*, 21(9): 875-883.

Isabel, M., Alba, T., Gustavo, P., Ticiania P., Ramon, M., Clarissa, M., Antonio, J., Alexandre, B., Marcos, T., Helena, M., Soraya, S., Alice, M. 2013. Bothrops leucurus venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. *Toxicon*, (61): 38–46.

İğci, N. 2010. Koca Engerek, *Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758)'nın Güneydoğu Anadolu Ve Kıbrıs Alt Türlerinin Zehirlerinin Proteomik Ve Spektroskopik Yöntemlerle Karşılaştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üni., Biyoteknoloji Enstitüsü.

Jokhio, R., Ansari, A.F. 2005. Cobra Snake Venom reduces significantly tissue nucleic acid levels in Human Breast Cancer. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 55(2): 71-3.

Juan, C.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. 2009. Venoms, venomics, antivenomics. *Federation of European Biochemical Societies*, (583): 1736–1743. *Cardiology. Cardiovascular Drug Reviews*, 25(4): 301–315.

Junqueira-de, A.L.M., Ho, P.L. 2002. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene*, 299(1-2): 279–291.

Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieland, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P., Kin, R.M. 2011. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS Journal*, 278(23): 4544–4576.

Karim, E., Farshad, S., Hosein, V., Abas, Z., Farzad, K., Hadi, R. 2014. Anticancer Activity of Cobra Venom Polypeptide, Cytotoxin-II, against Human Breast Adenocarcinoma Cell Line (MCF-7) via the Induction of Apoptosis. *Journal of Breast Cancer*, 17(4): 314-322.

Kemparaju, K., Girish, K.S. 2006. Snake Venom Hyaluronidase: A Therapeutic Target. *Cell Biochemistry And Function*, 24(1): 7–12.

Keskin, S., 2010. Akciğer Kanserinin Biyolojisi Ve Terapötik İlişkiler: Akciğer Kanserinde Tedavi Ve Bakım, Editörler: Aydın, A., Can, G., İpomet Matbaacılık-İstanbul, 7-12.

Ko, W.S., Park, T.Y., Park, C., Kim, Y.H., Yoon, H.J., Lee, S.Y., Hong, S.H., Choi, B., Lee, Y.T., Choi, Y.H. 2005. Induction Of Apoptosis By Chan Su, A Traditional Chinese Medicine in Human Bladder Carcinoma T24 Cells. *Oncology Reports*, (14): 475-480.

Lee G.L., Hait, W.N. 1985. Inhibition Of Growth Of C6 Astrocytoma Cells By Inhibitors Of Calmodulin. *Life Sciences*, 36(4): 347-354.

Lewis, R.J., Garcia, M.L. 2003. Therapeutic Potential Of Venom Peptides. *Nature*, (2): 790-802.

Liliana Soroceanu, Timothy J. Manning Jr, and Harald Sontheimer 1999. Modulation of Glioma Cell Migration and Invasion Using Cl2 and K1 Ion Channel Blockers. *The Journal of Neuroscience*, 19(14): 5942–5954.

Liu, S., Yu, M., He, Y., Xiao, L., Wang, F., Song, C., Sun, S., Ling, C., Xu, Z. 2008. Melittin Prevents Liver Cancer Cell Metastasis Through Inhibition of the Rac1-Dependent Pathway. *Hepatology*, 47(6): 1964-73.

Lokeshwar, V.B., Selzer, M.G. 2008. Hyaluronidase: Both a tumor promoter and suppressor. *Seminars in Cancer Biology*, 18(4): 281–287.

Lui, C.C., Hao, D., Zhang, Q., An, J., Zhao, J., Chen, B., Zhang, L., Yang, H. 2016. Biotoxins for Cancer Therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(12): 4753-4758.

Mackessy, S.P. 2009. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. CRC Press, Colorado, United States, 528s.

Marcussi, S., Santos, P.R.S., Menaldo, Danilo L., Silveira, L.B., Santos-Filho, N.A., Mazzi, M.V., da Silva, S.L., Stábeli, R.G., Antunes, L.M.G., Soares, A.M. 2011. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. *Mutation Research*, 724 (2011): 59– 63.

Marcussi, S., Stábeli, R.G., Santos-Filho, N.A., Menaldo, D.L., Silva Pereira, L.L., Zuliani, J.P., Calderon, L.A., da Silva, S.L., Antunes, L.M., Soares, A.M. 2013. Genotoxic effect of Bothrops snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. *Toxicon*, (65): 9-14.

Marcussi, S., Santos, P.R., Menaldo, D.L., Silveira, L.B., Santos-Filho, N.A., Mazzi, M.V., da Silva, S.L., Stábeli, R.G., Antunes, L.M., Soares, A.M. 2011. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. *Mutation Research*, (22749): 59-63.

Mohamed, K., Danny, M., Gamal, B. 2013. Enhanced anticancer efficacy of snake venom combined with silica nanoparticles in a murine model of human multiple myeloma: Molecular targets for cell cycle arrest and apoptosis induction. *Cellular Immunology*, (284): 129–138.

Moon, D.O., Park, S.Y., Heo, M.S., Ki-Cheon, K., Park, C., Ko, W.S., Choi, Y.H., Kim, G.Y. 2006. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *International Immunopharmacology*, 6(12): 1796–1807.

Nascimento, N.G., Sampaio, M.C., Olivo, R.A., Teixeira, C. 2010. Contribution of mast cells to the oedema induced by Bothrops moojeni snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*, 55(2010): 343–352.

Newman, D.J., Cragg, G.M. 2007. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, 70(3): 461-477.

Ojeda, P.G., Wang, C.K., Craik, D.J. 2015. Chlorotoxin: Structure, Activity, and Potential Uses in Cancer Therapy. *PeptideScience*, 106(1).

Ortiz, E., Briones, G.G., Schwartz, E.F., Possani, L.D. 2015. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, (93): 125-135.

Özgün, O.M., İğci, N., Yalçın, H.T., Göçmen, B., Nalbantsoy, A. 2015. Screening of cytotoxic and antimicrobial activity potential of Anatolian Macrovipera lebetina obtusa (Ophidia: Viperidae) crude venom. *Frontiers in Life Science*, 8(4): 363–370.

Panfoli, I., Calzia, D., Ravera, S., Morelli, A. 2010. Inhibition of Hemorrhagic Snake Venom Components: Old and New Approaches. *Toxins*, (2): 417-427.

Park, M.H., Son, D.J., Kwak, D.H., Song, H.S., Oh, K.W., Yoo, H.S., Lee, Y.M., Song, M.J., Hong, J.T. 2009. Snake Venom Toxin Inhibits Cell Growth through Induction of Apoptosis in Neuroblastoma Cells. *Archives of Pharmacal Research*, 32(11): 1545-1554.

Partha, P., Roy, S., Chattopadhyay, S., Pal, T.K. 2015. Medicinal value of animal venom for treatment of Cancer in Humans - A Review. *World Scientific News*, (22): 128-144.

Polis, G.A. 1990. The Biology of Scorpions. Stanford University Press, Palo Alto.

Qin, C., He, B., Dai, W., Zhang, H., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., Wang, G., Yin, L., Zhang, Q. 2014. Inhibition of metastatic tumor growth and metastasis via targeting metastatic breast cancer by chlorotoxin-modified liposomes. *Molecular Pharmaceutics*, 11(10): 3233-41.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araujo, H.S. 2006. Snake venom metalloproteases — structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C (142): 328–346.

Rodrigues, E.G., Dobroff, A.S.S., Cavarsan, C.F., Paschoalin, T., Nimrichter, L., Mortara, R.A., Santos, E.L., Fázio, M.A., Miranda, A., Daffre, S., Travassos, L.R. 2008. Effective Topical Treatment of Subcutaneous Murine B16F10-Nex2 Melanoma By the Antimicrobial Peptide Gomesin. *Neoplasia*, (10): 61–68.

Rodrigues, R.S., Izidoro, L.F., De Oliveira, R.J.Jr., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Rodrigues, V.M. 2009. Snake Venom Phospholipases A2: A New Class Of Antitumor Agents. *Protein & Peptide Letters*, (16): 894-898.

Samel, M., Trummal, K., Siigur, E., Siigur, J. 2012. Effect Of Huvec Apoptosis Inducing Proteinase From Vipera Lebetina Venom (Vlaip) On Viability Of Cancer Cells And On Platelet Aggregationq. *Toxicon*, (60): 648–655.

Samel, M., Vija, H., Rönholm, G., Siigur, J., Kalkkinen, Ni., Siigur, E. 2006. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from Vipera berus berus (common viper) venom. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764(4): 707-714.

Sanz, L., Ayvazyan, N., Calvete, J.J. 2008. Snake venomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei*. *Journal of Proteomics*, (71): 198–209.

Sara, L., Roberto, C., Courtney, L, Amanda, H., Amber, A., Montamas, S., Elda S., 2015. Inhibition of pancreatic tumoral cells by snake venom disintegrins. *Toxicon*, (93): 136-143.

Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., and Boyd, M.R. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**:4827–4833

Shao, J.H., Cui, Y., Zhao, M., Wub, C., Liu, Y., Zhang, J. 2014. Purification, characterization, and bioactivity of a newanalgesic-antitumor peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*, (53): 89–96.

Sheng Z. J., Qin, C. J., Wei, C.W., Miao, L.C., Hua, Z.G., Rui, C., Lin, L., Cai, W.M. 2015. The Effect of Aerobic Exercise and Macrothele raven Venom on Tumor-bearing Mice. *International Journal of Sports Medicine*, (36): 93–100.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2016. Cancer Statistics 2016. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, (66): 7–30.

Soroceanu, L., Gillespie, Y., Khazaeli, M.B., Sontheimer, H. 1998. Use of Chlorotoxin for Targeting of Primary Brain Tumors. *Cancer Research*, (58): 4871-4879.

Sung-Min, S., Doo-Sik, K. 1996. Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, (224): 134–13.

Topyıldız, H., Sibel, H. 2012. Histopathological effects of *Montivipera xanthina* venom on rats. *Turkish Journal of Zoology*, 36(4): 517-525.
Toxicon, (50): 835–849.

Turhan, E. 2010. Akciğer Kanserine Genel Bakış: Akciğer Kanserinde Tedavi Ve Bakım, Editörler: Aydınler, A., Can, G., İpomet Matbaacılık- İstanbul, 1-6.

Veiseh, M., Gabikian, P., Bahrami, S., Veiseh, O., Zhang, M., Hackman, R.C., Ravanpay, A.C., Stroud, M.R., Kusuma, Y., Hansen, S.J., Kwok, D., Munoz, N.M., Sze, R.W., Grady, W.M., Greenberg, N.M., Ellenbogen, R.G., Olson, J.M. 2007. Tumor Paint: A Chlorotoxin: Cy5.5 Bioconjugate for Intraoperative Visualization of Cancer Foci. *Cancer Research*, 67(14).

Vetter, I., Davis, J.L., Rash, L.D., Anangi, R., Mobli, M., Alewood, P.F., Lewis, R. J., King, G.F. 2010. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino Acids*, 40(1): 15-28.

Vyas, V.K., Brahmabhatt, K., Bhatt, H., Parmar, U. 2013. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*, 3(2): 156-162.

Wan, S.G., Jin, Y., Lee, W.H., Zhang, Y. 2006. A snake venom metalloproteinase that inhibited cell proliferation and induced morphological changes of ECV304 cells. *Toxicon*, (47): 480–489.

Wu, X., Takenaka, K., Sonoda, E. 2006. Critical Roles for Polymerase δ in Cellular Tolerance to Nitric Oxide -Induced DNA Damage. *Cancer Research*, (66): 748-754.

Yalçın, T., Özen, Ö., Göçmen, B., Nalbantsoy, A. 2014. Effect of Ottoman Viper (*Montivipera xanthina* (Gray, 1849)) Venom on Various Cancer Cells and on Microorganisms. *Cytotechnology*, (66): 87–94.

Yang, S.H., Chien, C.M., Lu, M.C., Lu, Y.J., Wu Shinne, Z.Z., Lin, R. 2005. Cardiotoxin 3 Induces Apoptosis In K562 Cells Through A Mitochondrial-Mediated Pathway. *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology*, (32): 515–520.

Yun, H.R., Yoo, H.S., Shin, D.Y., Hong, S.H., Kim, J.H., Cho, C.K., Choi, Y.H. 2009. Apoptosis Induction of Human Lung Carcinoma Cells by Chan Su (*Venenum Bufonis*) Through Activation of Caspases. *Journal of Acupuncture Meridian Studies*, 2(3): 210–217.

Zeymer, U., Wienbergen, H. 2007. A Review of Clinical Trials with Eptifibatid in Cardiology. *Cardiovascular Drug Reviews*, 25 (4); 301–315

Zhonghua, L., Zhao, Y., Li, J., Xu, S., Liu, C., Zhu, Y., Liang, S. 2012. The venom of the spider *Macrothele raveni* induces apoptosis in the myelogenous leukemia K562 cell line. *Leukemia Research*, (36): 1063– 1066.

Zobiole, N.N., Caon, T., Bertol, J.W., de Souza Pereira, C.A., Okubo, B.M., Moreno, S.E., De Sousa Cardozo, F.T.G. 2014. In vitro and in vivo genotoxic evaluation of *Bothrops moojeni* snake venom. *Pharmaceutical Biology*, 53(6): 930–934.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Huzeyfe HURİYET
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa / 1991
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Bursa Atatürk Anadolu Lisesi/2005-2009
Lisans : Uludağ Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü/ 2009-2014
Yüksek Lisans : U.Ü. F.B.E. Biyoloji A.B.D. Genel Biyoloji Bilim Dalı/ 2014-2017.
İletişim : huzobio@gmail.com