



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü
(HÜBTAM)



Sayı : E-61851058-020-329527
Konu : Akrep zehirinin içerik ve biyolojik
aktivite analizleri ekte verilmiştir.

24.04.2024

BİLİM VE TEKNOLOJİ UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
MÜDÜRLÜĞÜ (HÜBTAM)

Akrep zehirinin içerik ve biyolojik aktivite analizleri ekte verilmiştir.

Doç. Dr. İsmail KOYUNCU
Müdür

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : *BS4639ZP1T* Pin Kodu : 64372

Belge Takip Adresi : https://ebys.harran.edu.tr/envision/Validate_Doc.aspx?eD=BS4639ZP1T&eS=329527

Adres: Harran Üniversitesi Osmanbey Yerleşkesi ŞANLIURFA
Telefon: 1255 Faks: 3183541
e-Posta: humel@harran.edu.tr Web: <http://www.harran.edu.tr/>
Kep Adresi: harranuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Reşat DİKME
Unvanı: Müdür Yardımcısı
Tel No: 0414 318 2326





HARRAN ÜNİVERSİTESİ
BİLİM ve TEKNOLOJİ UYGULAMA ve ARAŞTIRMA MERKEZİ
(HÜBTAM)

Osmanbey Kampüsü 63300 ŞANLIURFA
(0414) 318 30 00 Dahili: 1255 <http://hubtam.harran.edu.tr>



Akrep Zehir Analiz Raporu

Evrak kayıt No	2024-5		
Ürünün Tam Adı	AKREP ZEHİRİ		
Firmanın Adı	MFY ORTAKLAR GRUP LDT ŞTİ		
Ürün Yetkilisi	Dilek DAĞLI Taylan YAVUZ		
Numunenin Geliş Tarihi	12.02.2024		
Numunenin Geliş Sebebi	Akrep zehir içerik ve biyolojik aktivite analizi,		
Numune Bilgisi	Akrep zehiri, 1 ml beyaz renkte sıvı		
Numune saflığı	%100		
Akrep türü	<i>Androctonus crassicauda</i> 		
Yapılan analizler	1. Akrep Zehirinin Proteomik Yapısının İncelenmesi 2. Akrep Zehirinin Metabolit Profilinin İncelenmesi 3. Akrep Zehrinin Normal Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkinliğinin Analizi		
Değerlendirme	Akrep zehirinin içerik ve biyolojik aktivite analizleri ekte verilmiştir.		
Tarih 24.04.2024	Analizi Yapan Uzman. Bio. Özgür YÜKSEKDAĞ 		Sorumlu/Yetkili Doç.Dr.İsmail KOYUNCU 

Bu analiz raporunun hiçbir kısmı tek başına ve ayrı ayrı kullanılamaz. İznimiz alınmadan çoğaltılamaz ve yayınlanamaz. Bu rapordaki sonuçlar yalnızca analiz edilen numuneye aittir.

Akrep zehirinin SDS-PAGE ile görüntülenmesi

Akrep zehir örneklerinin, protein konsantrasyonları modifiye Bradford assay yöntemi (BioRad, ABD) kullanılarak ölçüldü. Ölçümlerin doğruluğu ve proteinlerin kalitesi SDS-PAGE analizi yapılarak doğrulandı. Akrep zehrinin elektroforetik ayrımı, indirgeme koşulları altında %4-12 akrilamidden oluşan dikey elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

FASP yöntemi ile proteinlerin trypsin ile kesimleri ve peptitlerin eldesi

FASP kesimi için 300 ng protein üzerine 300 µl 8M üre solüsyonu eklenerek özel mikrosantrifüj tüplere yerleştirilen 30 kDa'lık membran filtre üzerine aktarıldı. 14000xg'de oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edildi ve filtre altında kalan kısım atıldı. Filtre üzerine 200 µl 8M üre solüsyonu eklendi ve tekrar santrifüj edildi. İyodoasetamid (IAA) solüsyonu filtre üzerine eklenerek 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası santrifüj yapıldı. Bu işlem sonrası örneklerin üzerine 3 kez 100µl 8M üre solüsyonu eklendi ve santrifüj edildi. Ardından yıkama adımı için 3 kez 100µl 50mM Amonyum Bikarbonat (AmBic) solüsyonu eklenerek santrifüj tekrarlandı. Filtre temiz mikrosantrifüj tüpe alınarak üzerine Tripsin enzimi ve 50mM AmBic solüsyonu eklendi, 37°C'de gece boyu kesime tabi tutuldu. Kesim sonrası örnekler üzerine 2 kez 40µl 50mM AmBic solüsyonu ve bir kez 50µl 0.5M NaCl solüsyonu eklendi, peptitler elüe edilerek temiz mikrosantrifüj tüpler içerisine alındı. SpeedVac vakumlu santrifüj cihazı kullanılarak (Eppendorf, ABD) peptit örnekleri pellet haline getirildi. Kesim sonucunda elde edilen peptitler nLC-MS/MS analizi için 20µl %0,1'lik Formik Asit çözeltisi (FA) içerisinde çözüldü.

Nano-sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (nLC-MS/MS) Analizi

Peptitler, Q-Exactive kütle spektrometresine (Thermo Scientific, ABD) bağlı Ultimate 3000 RSLC nano sistemi (Dionex, Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılarak nLC-MS/MS sistemi ile analiz edildi. Tüm sistem Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) aracılığıyla kontrol edildi. A (%0.1 Formik Asit) ve B (%80 Asetonitril + %0.1 Formik Asit) mobil fazları kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ayrımı yapıldı. Kesilmiş peptitler, bir tuzak (trap) kolonu üzerinden geçirilerek konsantre edildi ve tuzlardan arındırıldı. Daha sonra peptidler bir Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonuna (75 µm x 15 cm x 2 µm, 100 Å çap, Thermo Scientific, CA, ABD) aktarılarak kromatografik ayırılma işlemine tabi tutuldu. Tam tarama MS1 spektrumları aşağıdaki parametrelerle elde edildi: çözünürlük 70.000, tarama aralığı 400-2000 m/z, hedef otomatik kazanç kontrolü (AGC) $3 \times E6$, maksimum enjeksiyon süresi 60 ms, püskürtme voltajı 2.3 kV. MS/MS analizi, ilk on öncü iyonun seçilmesiyle veriye bağlı edinim yoluyla gerçekleştirildi.

Aşağıdaki parametrelerle çarpışma kaynaklı ayrışmadan (yüksek enerjili çarpışmalı ayrışma (higher-energy collisional dissociation- HCD)) oluşan MS2 analizi; çözünürlük 17.500, AGC 1E6; maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2.0 m/z normalleştirildi ve çarpışma enerjisi (NCE) 27. Cihaz, her analizden önce standart bir pozitif kalibratör ile (LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution 88323, Pierce, ABD) kalibre edildi.

nLC-MS/MS Veri Analizi

Ham verilerin analizi ve protein tanımlaması için Proteom Discoverer 2.2 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı ve analizler sırasında aşağıdaki parametreler uygulandı; peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, toleranslı düşük 1, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabit değişiklikler sistein karbamidometilasyonu, kararsız değişiklikler metionin oksidasyonu ve asparajin deaminasyonu. Her protein için tanımlanan minimum özgün peptit sayısı 1 olarak alındı ve elde edilen veriler Uniprot veri tabanında arandı.

AKREP ZEHİRİNİN METABOLİT PROFİLİNİN İNCELENMESİ

Akrep Zehirinin Serbest Amino Asit Profilinin LC-MS/MS Yöntemi ile İncelenmesi

Zehir örneklerinin serbest aminoasit profili, ticari kit protokolü (Bome Triviron, Trimaris-BR130030, Türkiye) uygulanarak hazırlanan örneklerin LC-MS/MS (Shimadzu-8045) ile analiz edilmesi ile yapıldı. Bu kit yönteminde serbest aminoasitlerin analizinde türevli yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemde 100 µL zehir örneği alındıktan sonra, 0.1 M HCl içerisinde hazırlanmış ve 20 adet C13 ve N15 işaretli atomları içeren aminoasitten oluşan iç standart karışımı ile karıştırılır. İkinci aşamada pH'ı dengelemek ve türev reaksiyonun daha verimli gerçekleşmesini sağlamak için propanol içerisinde hazırlanmış bazik özelliğe sahip organik tampon bileşenleri eklenir. Bu aşamada örnek içerisindeki proteinlerin çöktürülmesi de gerçekleşir. Daha sonra karışım üzerine aktif bileşen olarak %5 oranında alkil kloroformat içeren kloroform/izooktan karışımı eklenerek oda sıcaklığında 3 dk bekletilir. Türevlendirilen aminoasitler santrifüj işlemi ile organik solventleri içeren üst faza alınır. LC-MS/MS sistemine bu fazdan 1 µL enjeksiyon yapılır. Ekstraksiyon ve türevlendirme işlemi sonrası esterleştirilen aminoasitlerin molekül ağırlığı arttığı ve daha uçucu hale geldiği için MS cihazında verdiği sinyal de artmaktadır. Kromatografik ayırım ise C18 ters faz dolgu maddesi içeren Trimaris Amino asit LC-MS/MS kolonunda (250mm x 2mm, 3µM) gerçekleştirilmiştir. Mobil faz A içeriği Su: MeOH:1M Amonyum format (85:14:1) ve Mobil faz B içeriği MeOH olarak belirlenmiştir. Amino asit molekülleri ESI (+) iyonizasyon yöntemi ile MRM modunda analiz edildi.

Zehir örneklerinin, karnitin ve açıl karnitin profili, La Marca ve ark. (1) tarafından geliştirilen neonatal tarama yöntemi değiştirilerek değerlendirildi. 100 µl akrep zehri örneği Guthrie kağıtlarına uygulanıp, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra, 3,2 mm'lik diskler halinde kesilerek ve 96'lık plakalara yerleştirildi. Sonrasında her bir kuyucuğa metanol ve 3 mmol/L sulu hidrazin çözeltisinden oluşan 300 µl ekstraksiyon çözeltisi eklenerek, 37°C'de 25 dakika inkübe edilerek örneklerin bütüllenecek şekilde ekstrakte edilmesi sağlandı. Dahili standartlar için, ekstrakte edilen çözeltiye, karnitin ve açıl karnitinin stabil ağır izotop analoglarını [Etiketli Karnitin Standartları Seti B (Cambridge İzotop Laboratuvarları)] eklendi. LC-MS/MS sistemine bu fazdan 1 µL enjeksiyon yapıldı. Toplanan tüm veriler, her bileşenin konsantrasyonunu otomatik olarak hesaplayan Shimadzu Neonatal Yazılımı kullanılarak yeniden işlendi.

AKREP ZEHİRİNİN NORMAL SAĞLIKLI HÜCRELER ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN (IC₅₀) İNCELENMESİ

Çalışmada Kullanılan Hücreler

Çalışmada ATCC'den temin edilen; normal akciğer (BEAS-2B), böbrek epitel (HEK- 293), endotel (HUVEC), normal meme hücresi (CRL-4010) ve prostat normal (PNT1-A) hücreleri kullanıldı. Hücre hatları %10 FBS ve %1 glutamin ile desteklenmiş DMEM-F12 ve RPMI-1640 besi yerlerinde %5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırıldı. Hücrelerin büyümesi ve beslenmesini sağlamak için %10 FBS, %1 L glutamin, %1 penisilin/streptomisin, içeren DMEM F-12 besi ortamı kullanıldı. Yüzeye bağımlı hücreler büyütülürken hücreler yüzeyi tamamen kaplayıncaya kadar rutin olarak 2 günde bir ortamları steril cam pastör pipeti yardımıyla çekilerek ve ardından hücrelerin üzerine taze steril besi ortam eklenerek hücrelerin ortamı değiştirildi. Hücreler, 75 cm³ hücre kültürü kaplarında 37°C' de %5 CO₂' li inkübatörde çoğalmaya bırakıldı.

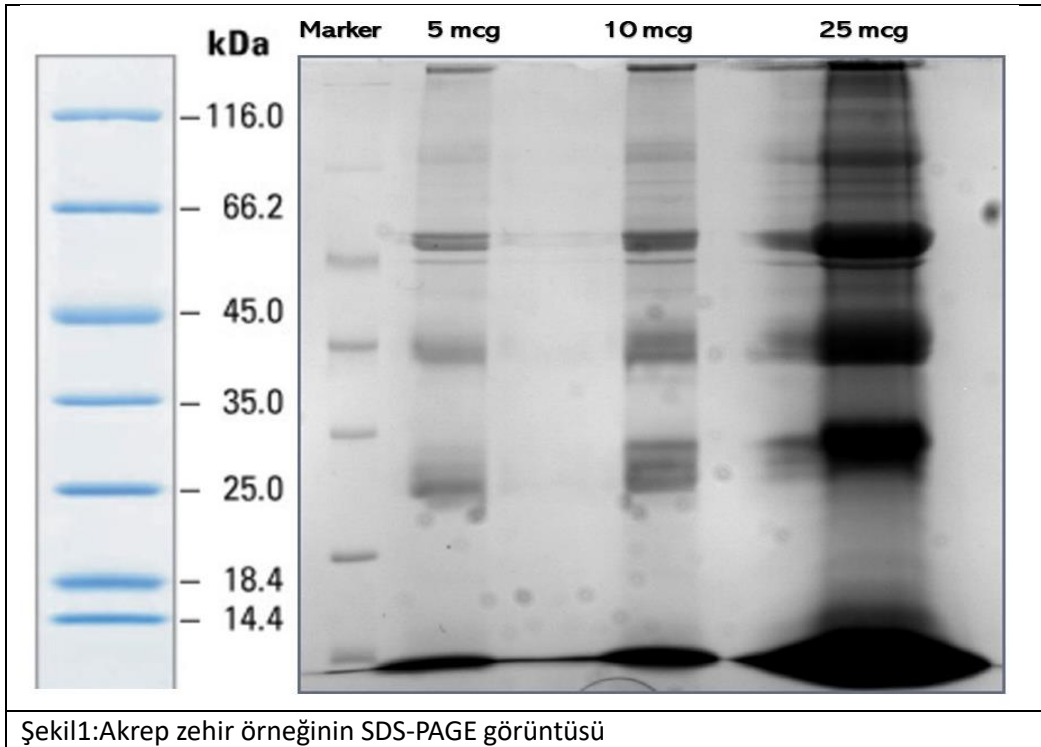
Akrep zehirinin farklı sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT hücre proliferasyon reaktifi kullanılarak incelendi. Hücreler stoktan açılarak 25 cm³ flasklara ekilip, % 80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik süre ardından besi yerleri uzaklaştırılıp ve akrep zehiri 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarında olacak şekilde hücrelere uygulanarak ve sitotoksik dozu (IC₅₀) tespit edildi. Her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklendi ve ardından 24 saatlik inkübasyon süresince %5 CO₂'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde zehirin doza bağlı olarak sitotoksik etkisi incelendi. Inkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri çekilip 200 µl serumsuz besi yeri üzerine 90 µl MTT solüsyonu eklendi ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırılır, formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 470 ve 690 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi.

Kaynaklar

- 1- La Marca G, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Fernandez MR, Donati MA, Zammarchi E. The inclusion of succinylacetone as marker for tyrosinemia type i in expanded newborn screening programs. Rapid Commun Mass Spectrom 2008; 22: 812-818).

AKREP ZEHİRİNİN PROTEOMİK YAPI SONUÇLARI**Akrep zehirinin SDS-PAGE analizleri**

Akrep zehrinin elektroforetik ayrımı, indirgeme koşulları altında %4-12 akrilamidden oluşan dikey elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE görüntüsü şekil-1 'de verilmiştir. Yapılan SDS-Page analizinde zehirde 45-25 kDa ağırlığındaki protein seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmesine rağmen proteinlerin büyük çoğunluğunun 10 kDa altındaki peptidlerden oluştuğu görülmektedir. Elde edilen bu görüntü akrep zehir örneğinin peptidlerce zengin olduğunu göstermiştir.



Şekil1:Akrep zehir örneğinin SDS-PAGE görüntüsü

Akrep Zehirinin Proteomik Profil Analiz Sonucu

Akrep zehir örneğinde bulunan proteinlerin profili nLC-MS/MS analiz yöntemiyle tespit edilerek elde edilen sonuçlar tablo 1 de verildi. Yapılan analizde akrep zehir örneğinde bulunma ihtimali kesin olan proteinler (Master proteinler) verilmiştir. Analiz sonucunda zehir örneğinde 81 master proteinin olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinler içerisinde Toxin Acra II, Sodium channel alpha-toxin Acra4 ve Toxin b subunit alpha gibi peptitlerin bulunması zehir örneğinin yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir.

No	Protein type	Accession	Description	Coverage [%]	# Peptides	# PSMs	# Unique Peptides	# Protein Groups	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score Sequest HT: Sequest HT	# Peptides (by Search Engine): Sequest HT
1.	Master Protein	P80476	Hemocyanin AA6 chain OS=Androctonus australis OX=6858 PE=1 SV=1	50	29	126	9	1	626	71,7	5,82	110,12	29
2.	Master Protein	A0A2I9LP22	Hemocyanin AA6 chain OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=3 SV=1	27	20	95	1	1	627	72	5,77	76,27	20
3.	Master Protein	A0A7T9L322	Hyaluronidase OS=Androctonus crassicauda OX=122909 GN=Hyal PE=2 SV=1	35	15	71	11	1	410	47,5	8,37	62,9	15
4.	Master Protein	POC297	Toxin Acra II-3 OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=2 SV=1	60	3	61	2	1	72	8,1	7,58	50,99	3
5.	Master Protein	P01486	Alpha-toxin Bot11 OS=Buthus occitanus tunetanus OX=6871 PE=1 SV=1	25	3	68	3	1	65	7,5	7,87	44,58	3
6.	Master Protein	POC298	Toxin Acra III-1 OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=2 SV=1	28	2	59	1	1	76	8,8	7,11	42,52	2
7.	Master Protein	A0A1E1WVN1	Putative hemocyanin subunit OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=4 SV=1	27	18	62	12	1	628	72,2	6,55	40,66	18
8.	Master Protein	M1JBC0	Sodium channel alpha-toxin Acra4 OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=1 SV=1	37	4	31	2	1	65	7,1	8,31	34,6	4
9.	Master Protein	A0A1E1WWC5	Putative hemocyanin subunit OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1	17	12	42	9	1	624	71,5	6,19	34,54	12
10.	Master Protein	A0A059UI30	Potassium channel toxin Meg-beta- KTx1 OS=Mesobuthus gibbosus OX=123226 PE=3 SV=1	24	4	38	4	1	91	10,2	8,76	32,05	4
11.	Master Protein	A0A0K0LBX2	Sodium channel blocker AbNaTx2 OS=Androctonus bicolor OX=748906 PE=2 SV=1	10	2	11	1	1	86	9,7	8,31	28,06	2
12.	Master Protein	A0A1E1WVL6	Putative hemocyanin subunit OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1	19	13	54	9	1	637	73,2	6,71	24,77	13
13.	Master Protein	A0A0U4HEU8	Venom protein VP4 OS=Odontobuthus doriae OX=342590 GN=VP4 PE=2 SV=1	15	2	42	1	1	143	16	7,24	22,95	2
14.	Master Protein	P0DPT3	Beta-toxin Am IT OS=Androctonus mauritanicus mauritanicus OX=6860 PE=1 SV=1	25	3	15	3	1	65	7,7	8,62	22,49	3
15.	Master Protein	A0A1E1WVS7	Putative hemocyanin subunit OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=4 SV=1	18	12	34	7	1	632	72,7	5,83	22,07	12

16.	Master Protein	G4V3T9	Neurotoxin BmK AGAP-SYPU2 (Fragment) OS=Mesobuthus martensii OX=34649 PE=1 SV=1	28	3	10	1	1	65	7,2	5,31	20,52	3
17.	Master Protein	P83644	Toxin Lqh4 OS=Leiurus hebraeus OX=6884 PE=1 SV=1	38	4	20	3	1	65	7,2	8,1	19,87	4
18.	Master Protein	M1JMR8	Sodium channel alpha-toxin Acra8 OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=3 SV=1	30	4	13	2	1	66	7,5	8,29	18,75	4
19.	Master Protein	A0A1E1WW95	Putative hemocyanin subunit OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=4 SV=1	23	14	36	8	1	627	72,1	6,33	17,89	14
20.	Master Protein	A0A0K0LBS4	Venom hyaluronidase (Fragment) OS=Androctonus bicolor OX=748906 PE=2 SV=1	26	3	15	2	1	96	10,8	8,56	12,78	3
21.	Master Protein	A0A0K0LBZ4	Potassium channel blocker AbKTx-6 OS=Androctonus bicolor OX=748906 PE=2 SV=1	10	1	16	1	1	91	10,1	8,4	9,2	1
22.	Master Protein	F8THJ4	CRISP3 (Fragment) OS=Hottentotta judaicus OX=6863 PE=2 SV=1	14	4	15	4	1	192	21,2	8,78	8,2	4
23.	Master Protein	M1JB54	Putative sodium channel alpha-toxin Acra7 OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=3 SV=1	18	1	4	1	1	67	7,3	7,58	7,75	1
24.	Master Protein	Q7M487	Hemocyanin chain 3C (Fragment) OS=Androctonus australis OX=6858 PE=1 SV=1	50	1	3	1	1	14	1,7	9,85	6,25	1
25.	Master Protein	T1DPC1	CAP-Lyc-1 OS=Lychas buchari OX=1330406 PE=2 SV=1	2	1	3	1	1	422	47	7,53	5,67	1
26.	Master Protein	A0A2I9LNZ2	Endoplasmic reticulum resident protein 44 OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=4 SV=1	10	5	10	5	1	418	48,3	6,35	5,35	5
27.	Master Protein	A0A1E1WWA7	Putative hemocyanin subunit (Fragment) OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1	14	10	18	6	1	618	71,9	6,18	5,25	10
28.	Master Protein	P86100	Hyaluronidase-1 OS=Mesobuthus martensii OX=34649 PE=1 SV=2	10	5	20	1	1	410	47,4	8,16	5,17	5
29.	Master Protein	A0A2I9LNZ4	Fatty acid binding protein OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=3 SV=1	14	2	6	2	1	131	14,8	5,43	4,58	2
30.	Master Protein	A0A1S5QN46	Carboxypeptidase E OS=Tityus serrulatus OX=6887 PE=2 SV=1	5	3	6	2	1	472	53,8	5,58	3,63	3
31.	Master Protein	D5HR53	Anti-insect Ac4 OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=3 SV=1	10	1	5	1	1	79	8,5	8,31	3,6	1
32.	Master Protein	A0A2I9LNI8	Actin OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=3 SV=1	13	5	7	5	1	376	41,8	5,48	3,58	5
33.	Master Protein	P84646	Alpha-toxin OD1 OS=Odontobuthus doriae OX=342590 PE=1 SV=1	18	2	5	2	1	65	7,2	7,5	3,55	2

34.	Master Protein	A0A0K0LC99	Cellular protein AbCp-54 (Fragment) OS=Androctonus bicolor OX=748906 PE=2 SV=1	38	2	35	1	1	92	10,2	6,29	3,52	2
35.	Master Protein	P01479	Neurotoxin-1" OS=Androctonus australis OX=6858 PE=1 SV=3	11	1	5	1	1	83	9,1	8,12	3,5	1
36.	Master Protein	F1CJ25	Putative angiotensin converting enzyme (Fragment) OS=Hottentotta judaicus OX=6863 PE=2 SV=1	4	1	3	1	1	255	30,5	6,73	2,47	1
37.	Master Protein	A0A143MGR2	Potassium channel toxin meuK3 OS=Mesobuthus eupeus OX=34648 PE=2 SV=1	15	1	3	1	1	59	6,3	8,7	2,22	1
38.	Master Protein	A0A0K0LBQ2	Pradykinin-potentiating peptide-like peptide Bpp-1 OS=Androctonus bicolor OX=748906 PE=2 SV=1	23	3	6	3	1	73	8,5	10,59	2,16	3
39.	Master Protein	A0A0K0LBR9	Chymotrypsin-like protease CIP-2 (Fragment) OS=Androctonus bicolor OX=748906 PE=2 SV=1	8	1	1	1	1	171	18,9	4,74	2,11	1
40.	Master Protein	F1CJ13	Thioredoxin domain-containing protein (Fragment) OS=Hottentotta judaicus OX=6863 PE=2 SV=1	18	5	11	5	1	319	37,2	5,33	2,1	5
41.	Master Protein	A0AA49K9N2	NaTx OS=Tityus melici OX=3026321 PE=2 SV=1	8	1	1	1	1	85	9,3	8,6	2,08	1
42.	Master Protein	A0A1E1WVR2	Putative transferrin OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1	3	2	4	2	1	711	78,7	5,3	1,98	2
43.	Master Protein	A0A1E1WWG5	Hyaluronidase OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1	11	3	7	2	1	402	46,6	8,72	1,88	3
44.	Master Protein	A0A0U1TYH0	Tetraspanin (Fragment) OS=Isometrus maculatus OX=497827 PE=2 SV=1	4	1	3	1	1	239	26,2	6,51	1,82	1
45.	Master Protein	E4VP53	Chymotrypsin-like protease-4 OS=Mesobuthus eupeus OX=34648 PE=2 SV=1	3	1	3	1	1	270	30,4	5,2	1,81	1
46.	Master Protein	A0A0U1U084	MAM domain-containing protein (Fragment) OS=Isometrus maculatus OX=497827 PE=2 SV=1	4	1	1	1	1	178	19,9	8,78	1,79	1
47.	Master Protein	A0A1E1WVL9	Alpha-amylase (Fragment) OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1	1	1	3	1	1	520	59,5	7,33	1,71	1
48.	Master Protein	A0A2I9LNY0	Elongation factor 1-alpha OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=3 SV=1	2	1	3	1	1	462	51	8,97	1,66	1
49.	Master Protein	A0AA50AAI4	Secretory phospholipase A2 isoform X2 OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=2 SV=1	12	3	7	3	1	213	25	6,95	1,64	3
50.	Master Protein	A0A088D9S3	Potassium channel blocker pMeKTx8-1 OS=Mesobuthus eupeus OX=34648 PE=2 SV=1	11	1	3	1	1	61	6,9	8,73	1,62	1
51.	Master Protein	U6JTA2	Cysteine protease OS=Tityus serrulatus OX=6887 GN=atg4a PE=2 SV=1	4	1	1	1	1	408	46,7	5,31	0	1

52.	Master Protein	A0A0U1TZ92	14-3-3 protein epsilon (Fragment) OS=Isometrus maculatus OX=497827 PE=2 SV=1	3	1	1	1	1	250	28,7	4,91	0	1
53.	Master Protein	A0A2I9LP41	Heat shock 70 kDa protein OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=3 SV=1	4	2	3	1	1	645	70,7	5,54	0	2
54.	Master Protein	A0A2I9LPF7	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=3 SV=1	2	1	3	1	1	343	38	9,25	0	1
55.	Master Protein	F1CJ20	Putative hemolysin (Fragment) OS=Hottentotta judaicus OX=6863 PE=2 SV=1	2	1	1	1	1	349	40	7,17	0	1
56.	Master Protein	A0A0U1SF04	Peptidase M14 carboxypeptidase A domain-containing protein (Fragment) OS=Isometrus maculatus OX=497827 PE=2 SV=1	8	2	4	1	1	201	23,1	5,14	0	2
57.	Master Protein	POC2A2	Toxin b subunit alpha (Fragment) OS=Androctonus crassicauda OX=122909 PE=1 SV=1	62	1	9	1	1	26	3,1	4,6	0	1
58.	Master Protein	A0A2I9LP15	peptidylprolyl isomerase OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=4 SV=1	12	2	3	2	1	207	23,6	4,81	0	2
59.	Master Protein	A0A2I9LP74	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=4 SV=1	2	1	3	1	1	347	39	7,23	0	1
60.	Master Protein	A0A2I9LPI8	Ras-related protein Rab-1A OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=4 SV=1	5	1	1	1	1	206	22,8	5,44	0	1
61.	Master Protein	A0A2I9LNV7	Cysteine-rich secretory protein OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=4 SV=1	2	1	1	1	1	418	47,3	6,81	0	1
62.	Master Protein	A0A0U1S886	lysozyme OS=Isometrus maculatus OX=497827 PE=2 SV=1	13	1	4	1	1	143	16,4	7,47	0	1
63.	Master Protein	A0A1E1WVL0	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=4 SV=1	2	1	2	1	1	411	46,8	8,09	0	1
64.	Master Protein	A0A0K0LC76	Cellular protein AbCp-44 (Fragment) OS=Androctonus bicolor OX=748906 PE=2 SV=1	17	2	2	1	1	99	11,3	6,9	0	2
65.	Master Protein	A0A1S5QN36	Xaa-pro aminopeptidase 1c OS=Tityus serrulatus OX=6887 PE=2 SV=1	1	1	3	1	1	667	76,4	5,4	0	1
66.	Master Protein	A0AA49K9R8	phospholipase D (Fragment) OS=Tityus melici OX=3026321 PE=2 SV=1	4	1	1	1	1	410	47,3	8,6	0	1
67.	Master Protein	A0A2I9LPN2	Ubiquitin-ribosomal protein eS31 fusion protein OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=3 SV=1	20	3	5	3	1	156	17,9	9,72	0	3

68.	Master Protein	E4VP21	Chymotrypsin-like protease-1 OS=Mesobuthus eupeus OX=34648 PE=2 SV=1	5	1	3	1	1	264	29,6	5,01	0	1
69.	Master Protein	F1CIX1	Putative alpha-2-macroglobulin (Fragment) OS=Hottentotta judaicus OX=6863 PE=2 SV=1	2	1	2	1	1	266	29,6	4,94	0	1
70.	Master Protein	A0A2I9LP00	Galectin OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=4 SV=1	2	1	3	1	1	465	52,3	6,28	0	1
71.	Master Protein	A0A0K0LC52	Cellular protein AbCp-3 (Fragment) OS=Androctonus bicolor OX=748906 PE=2 SV=1	23	1	1	1	1	64	7,3	11,24	0	1
72.	Master Protein	A0A7S8RFI7	Putative sodium channel toxin Ts37 OS=Tityus serrulatus OX=6887 PE=3 SV=1	8	1	3	1	1	85	9,3	8,27	0	1
73.	Master Protein	Q86BX0	Potassium channel toxin alpha-KTx 15.8 OS=Mesobuthus martensii OX=34649 PE=1 SV=1	15	1	2	1	1	60	6,4	8,7	0	1
74.	Master Protein	A0A2I9LP25	Heat shock 70 kDa protein OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=3 SV=1	6	3	5	2	1	656	72,6	5,34	0	3
75.	Master Protein	A0A0U1TYF8	40S ribosomal protein S19 OS=Isometrus maculatus OX=497827 PE=2 SV=1	5	1	3	1	1	137	15,4	10,35	0	1
76.	Master Protein	A0A2I9LNV5	Cofilin OS=Centruroides hentzi OX=88313 PE=3 SV=1	7	1	2	1	1	148	17	6,57	0	1
77.	Master Protein	P0DL46	Potassium channel toxin alpha-KTx 16.9 OS=Buthus paris OX=1388771 PE=1 SV=1	17	1	2	1	1	36	4,1	8,28	0	1
78.	Master Protein	A0A0U1TZ25	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Isometrus maculatus OX=497827 PE=2 SV=1	13	2	5	2	1	93	11	9,76	0	2
79.	Master Protein	A0A0U1SA67	DUF19 domain-containing protein OS=Isometrus maculatus OX=497827 PE=2 SV=1	7	1	1	1	1	229	25,3	5,44	0	1
80.	Master Protein	A0A088D9U2	Potassium channel blocker pMeKTx28-2 OS=Mesobuthus eupeus OX=34648 PE=2 SV=1	16	1	3	1	1	90	10,3	8,65	0	1
81.	Master Protein	A0A059UHJ2	Uncharacterized protein OS=Mesobuthus gibbosus OX=123226 PE=2 SV=1	10	1	3	1	1	147	16,7	4,61	0	1

Akrep Zehirinin Metabolit Profil Analiz Sonuçları

Akrep zehir örneğinin içerdiği metabolitlerin analizi için zehirde bulunan serbest aminoasit, karnitin ve açıl karnitin türevlerinin analizi LC-MS/MS yöntemiyle yapılmıştır.

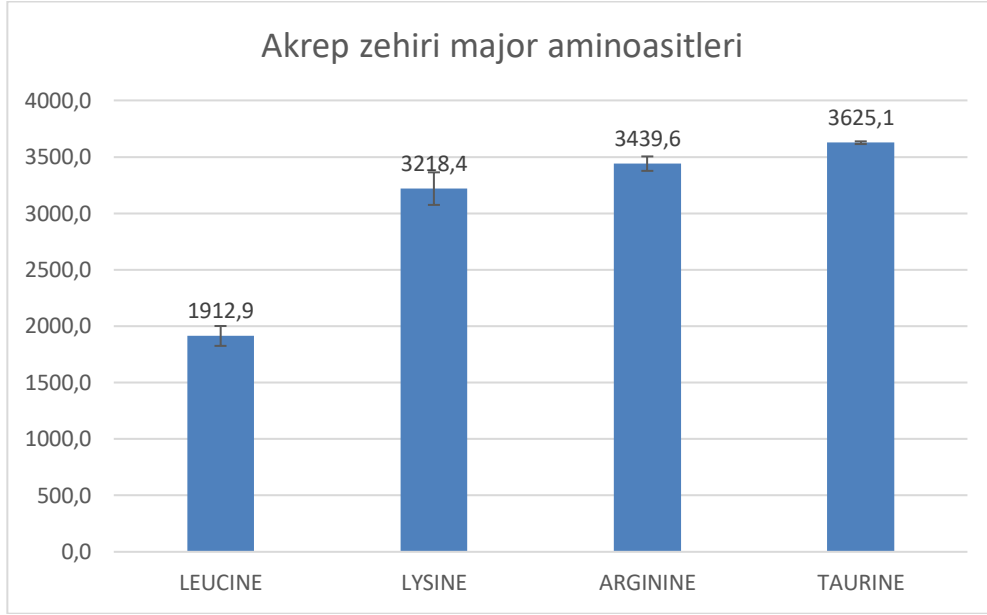
Akrep Zehirinin Serbest Aminoasit Profil Sonuçları

Akrep zehir örneğinin içerdiği serbest aminoasit profili Tablo-2 de verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda zehir örneğinde lizin, arginin, lösin ve taurin gibi aminoasitlerinin yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 1. Akrep zehrinin serbest aminoasit profili

Aminoasit adı	Zehirde Tespit Edilen Miktarı (nmol/L)
ALANINE	570,8
ARGININE	3439,6
ASPARAGINE	167,5
ASPARTIC ACID	4,3
CITRULLINE	157,2
GLUTAMINE	246,7
GLUTAMIC ACID	498,9
GLYCINE	186,8
HISTIDINE	36,1
LEUCINE	1912,9
ISOLEUCINE	162,3
ALLOISOLEUCINE	13,8
LYSINE	3218,4
METHIONINE	714,1
ORNITHINE	4,8
PHENYLALANINE	959,9
PROLINE	804,7
SERINE	414,4
THREONINE	957,9
TRYPTOPHAN	204,7
TYROSINE	172,2
VALINE	412,1
ALPHAAMINOADIPIC ACID	0,2
ALPHAAMINOPIMELIC ACID	0,0
ANSERINE	2,2
ARGININOSUCCINIC ACID	6,5
ALPHAAMINOBTYRIC ACID	6,6
BETAAMINOISOBUTYRIC ACID	35,4
GAMMAMINOBTYRIC ACID	224,2
BETA-ALANINE	6,7
SARCOSINE	22,6
CYSTATHIONINE	1,3
THIAPROLINE	25,3
1-METHYLHISTIDINE	0,8

3-METHYLHISTIDINE	1,7
HYDROXYLYSINE	4,7
HYDROXYPROLINE	690,9
CYSTINE	0,4
HOMOCYSTINE	0,0
SEROTONIN	0,1
HISTAMINE	2,2
ETANOLAMINE	549,3
PHOSPHOETANOLAMINE	240,1
5-OH-TRP	18,2
TAURINE	3625,1

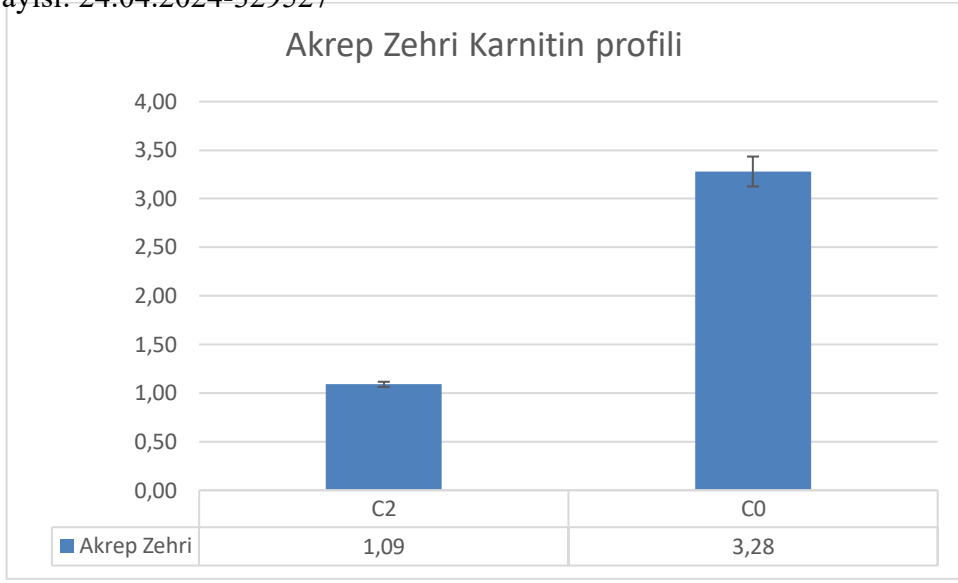


Şekil 2. Akrep zehrinin serbest aminoasit profilinin LC-MS/MS ile incelenmesi sonucu elde edilen sonuçların grafik gösterimi (nmol/L)

Zehir örneğin içerdiği karnitin ve açıl karnitin türevleri profil sonuçları tablo 3 de verildi. . LC/MS MS sonuçlarına göre; akrep zehirinin ; C0 (serbest karnitin) ve C2 (asetil karnitin) serbest karnitin ve açıl karnitin içerdiği tespit edilmiştir.

Tablo 3. Akrep zehirinin serbest karnitin-Açıl Karnitin profili

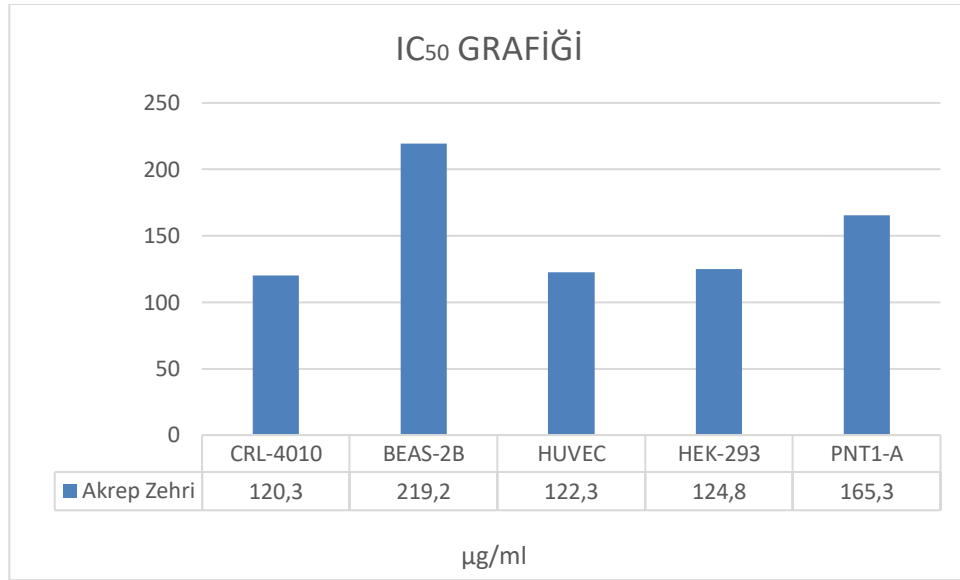
Karnitin adı	Zehirde Tespit Edilen Miktarı (umol/L)
C0 (serbest karnitin)	3,3
C2 (asetil karnitin)	1,1
C3 (Propiyonil Karnitin)	0,0
C4 (bütil karnitin)	0,0
C4DC (metil malonil karnitin)	0,0
C5 (isoyaleril karnitin)	0,0
C5:1 (tigil karnitin)	0,0
C5OH (isoyaleril karnitin)	0,0
C5DC (glutaril karnitin)	0,0
C6 (hekzanoil karnitin)	0,1
C6DC (adipil karnitin)	0,0
C8 (oktanoil karnitin)	0,0
C8:1(oktenoil karnitin)	0,0
C8DC(suberil karnitin)	0,0
C10 (dekanoil karnitin)	0,0
C10:1 (dekenoil karnitin)	0,0
C10DC (sebasil karnitin)	0,2
C12 (dodecanoil karnitin)	0,0
C14 (miyristoil karnitin)	0,0
C14:1	0,0
C14:2	0,0
C16 (palmitoil karnitin)	0,0
C16:1 (palmitoleil karnitin)	0,0
C18 (steraoil karnitin)	0,0
C18:1(oleil karnitin)	0,0
C18:2 (linoleil karnitin)	0,0
C18:1 OH (hidroksiOleil karnitin)	0,0



Şekil 9. Akrep zehirinin serbest karnitin-açıl karnitin profilinin LC-MS/MS ile incelenmesi sonucu elde edilen sonuçların grafik gösterimi ($\mu\text{mol/L}$)

Akrep zehrinin çeşitli normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri MTT metodu ile incelendikten sonra IC₅₀ değerleri belirlenip tüm sonuçlar Şekil 1’de gösterilmiştir. Hücre canlılığının değişimi doza bağlı olarak incelendi. Akrep zehri hücrelere 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarında uygulandıktan 24 saat sonra sitotoksik etkileri incelendi. Akrep zehri ilave edilmeyen (0µM) kontrol grubu hücrelerinin canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edildi ve diğer örneklerle ait canlılık değerleri oransal olarak absorbans değerlerinden hesaplandı (Graph Pad Prism 9.5.0). Akrep zehrinin IC₅₀ değerleri incelendiğinde yüksek dozlarda sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

HÜCRE HATTI	CRL-4010	BEAS-2B	HUVEC	HEK-293	PNT1-A
IC ₅₀ (µg/ml)	120,3	219,2	122,3	124,8	165,3



Şekil 10. Akrep zehrinin normal hücre hatları üzerindeki IC₅₀ değerlerinin grafik gösterimi