Kara Akrep (*Androctonus crassicauda*) Venomunun *Leishmania tropica* Promastigotları Üzerindeki In Vitro Etkinliği

In Vitro Efficacy of the Venome of Black Scorpion (*Androctonus crassicauda*) on *Leishmania tropica* Promastigotes

Fadile YILDIZ ZEYREK¹(ID), Şahin TOPRAK²(ID), Sinem ÖKTEM OKULLU³(ID), Gülcan GÜRSES⁴(ID), Nebiye YENTÜR DONI¹(ID), Özgür KURT³(ID)

¹ Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

¹ Harran University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Şanlıurfa, Turkey.

² Harran Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa.

² Harran University Faculty of Arts and Science, Department of Biology, Şanlıurfa, Turkey.

³ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

³ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Turkey.

⁴ Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Bölümü, Şanlıurfa.

⁴ Harran University Health Services Vocational School, Department of Medical Laboratory Techniques, Şanlıurfa, Turkey.

*Bu çalışma Harran Üniversitesi'nin Bilimsel Araştırma Proje Fonu (BAP Proje Numarası: 19338) tarafından desteklenmiştir.

Makale Atfı: Yıldız Zeyrek F, Toprak Ş, Öktem Okullu S, Gürses G, Yentür Doni N, Kurt Ö. Kara akrep (*Androctonus crassicauda*) venomunun *Leishmania tropica* promastigotları üzerindeki in vitro etkinliği. Mikrobiyol Bul 2021;55(4):635-641.

ÖZ

Akrep venomu, karmaşık protein içeriğiyle güçlü nörotoksik etkiler gösteren ve bu şekilde akrebin avını yakalayıp sindirmesinde önemli rol oynayan bir maddedir. Akrep sokan insanların vücudunda kısa süre içinde hayatı tehdit eden sistemik etkiler oluşabilmekte; deride kızarıklık, ağrı, yanma ve şişlik sonrası karın ağrısı, bulantı, kusma, çift görme görülebilmekte, hasta komaya girebilmektedir. Akrep venomunun antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, içerdiği bazı bileşiklerin güçlü antibakteriyel ve antifungal etkiler gösterebildiği de bilinmektedir. *Leishmania* cinsi protozoonların neden olduğu; hastalarda deri, mukoza ve ölümcül iç organ tutulumuna yol açabilen leishmaniyazis, dünyada yaygın görülen vektör kökenli paraziter enfeksiyonlardandır. Leishmaniyazis tedavisinde yeni ilaçlara gereksinim vardır, zira son çalışmalarda yıllardır kullanılmakta olan antimon bileşiklerine dirençli *Leishmania* suşlarının geliştiği bildirilmektedir. *Leishmania* suşlarının, akrep venomunda da olduğu bilinen, antimikrobiyal etkili iyon kanalı inhibitörü peptitlere duyarlı olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada ülkemizdeki *Androctonus crassicauda* türü akreplerden elde edilen özütlerdeki anti-leishmanial etkinliğin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, *A.crassicauda* venomu içeren özütün farklı dilüsyonları ile standart tedavide kullanılan meglumin antimonatın laboratuvarımızda sıvı azottan çıkarılarak önce NNN sonra RPMI-1640 besiyerinde çoğaltılan *Leishmania tropica* promastigotları üzerindeki etkileri in vitro koşullarda karşılaştırılarak ölçülmüştür. Ayrıca, özütün insan hücreleri için öldürücü olup olmadığı XTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. Deneyler sonunda yarı- maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) değeri, akrep venomu için 18.12 µg/ml (17.33-18.94), meglumin antimonat için ise 8.411 µg/ml (7.922- 8.927) olarak belirlenmiştir. Bu ön

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Fadile Yıldız Zeyrek, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye. E-posta (E-mail): fadilezeyrek@hotmail.com

çalışma, akrep venomunun *L.tropica* promastigotları üzerinde, meglumin antimonata kıyasla daha yüksek dozda da olsa, öldürücü olabildiğini göstermiştir. Sonraki aşamada venom içeriğindeki bileşiklerin ayrıştırılıp anti-leishmanial etkili proteinlerin belirlenmesiyle leşmanyazis için yeni ilaç adayları daha özgün çalışmalarla belirlenebilecektir.

Anahtar kelimeler: *Leishmania*; *Androctonus crassicauda*; venom; in vitro; tedavi.

ABSTRACT

Scorpion venom is a substance that shows strong neurotoxic effects with its complex protein content and thus plays an important role for the scorpion in catching and digesting the hunt. Human body stung by a scorpion can show life-threatening systemic effects in a short time, ranging from erythema, pain, edema and local fever to abdominal pain, nausea and vomiting, diplopia and even coma. Scorpion venom is known to possess antimicrobial activity, and some of its compounds have potent antibacterial and antifungal activities. Leishmaniasis is a common vector-borne parasitic infection caused by *Leishmania* sp. protozoa and can lead skin, mucosa and fatal internal organs involvement in patients. There is a need for new drugs in the treatment of leishmaniasis, because it has been documented lately that there is a growing resistance against antimonial compounds which have been used in its treatment for decades. *Leishmania* species are known to be susceptible to antimicrobial peptides that act as ion-channel inhibitors, which are known to be present in scorpion venom. In this study, it was aimed to investigate the anti-leishmanial activity of scorpion venom extract obtained from *Androctonus crassicauda* species in our country. In this context, *Leishmania tropica* promastigotes which were thawed from liquid nitrogen in our laboratory and first grown in NNN and then RPMI-1640 media, were exposed to different dilutions of the extract containing *A.crassicauda* venom and meglumine antimonate used in the standard treatment of leishmaniasis and the efficacies on the promastigotes were compared and measured in vitro. This was followed by XTT cell viability test, which assessed whether anti-leishmanial dose of the extract was lethal for human cells or not. Trials showed that the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of the venom extract and meglumine antimonate were 18.12 µg/ml (17.33-18.94) and 8.411 µg/ml (7.922-8.927), respectively. This preliminary study showed that scorpion venom can be lethal on *L.tropica* promastigotes in vitro, on relatively higher doses compared to meglumine antimonate. Next step will be to determine the anti-leishmanial proteins in the extract and thus to identify new drug candidates with more specific studies.

Keywords: *Leishmania*; *Androctonus crassicauda*; venom; in vitro; treatment.

GİRİŞ

Akrepler, Arthropoda şubesi altındaki *Scorpiones* takımını oluşturan vücutları sert kitin tabakasıyla kaplı ve kıvrık kuyruğunda zehirli iğnesi bulunan, 13-220 mm boylarında eklem bacaklılardır. Hastalık etkeni taşımazlar ve korunma amacıyla insanları sokarak zehirlenme ve ölümlere yol açabilirler^{1,2}. Akrep sokması hemen her olguda yoğun ağrıya neden olsa da dünya üzerinde yaşadığı tahmin edilen 18 familya ve yaklaşık 1500 akrep türünden çoğu Buthidae familyasından 50 kadar türün insanlarda en ölümcül zehirlenmeler oluşturabildiği ve tıbbi açıdan önemli olduğu bilinmektedir^{3,4}. Akrep sokmasında önce deride kızarıklık, ağrı, yanma ve şişlik oluşumu ile sonrasında bulantı, kusma, tansiyon değişiklikleri ve çift görme görülebilmektedir. Bazen hipovolemi, böbrek yetmezliği ve komaya kadar giden ciddi sistemik etkiler oluşabilmektedir^{5,6}. Ülkemizde bulunan *Androctonus crassicauda* ve *Leiurus quinquestriatus* türleri ile sistemik zehirlenme belirtileri olduğu bildirilmektedir⁵. Olgular en sık Güneydoğu Anadolu ve Ege Bölgesi'nden bildirilmektedir; Ege Bölgesi'ndeki olgulara sıklıkla sistemik etkilere yol açmayan Meso-

buthus gibbosus, Güneydoğu Anadolu'daki olgulara çoğunlukla *A.crassicauda* neden olmaktadır^{1,2}. Zehirli akrelerin venomu birçok canlı için toksik protein ve peptitlerden oluşmaktadır⁷. Bunlar arasında iyon kanalları üzerine agonist ve antagonist etkiler gösteren disülfid köprülerle bağlanmış 2-8 kDa'lık antibakteriyel ve antifungal etkilere sahip peptitler yer alır^{8,9}. Bu peptitlerin *Leishmania* türleri gibi iyon kanalı blokleri ajanlara duyarlı olduğu bilinen protozoonlara karşı da etkili olduğu düşünülmektedir¹⁰. Güney Amerika'da yaşayan *Tityus discrepans* türü akrebin venomunun *Leishmania mexicana* üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir¹¹. Leyşmanyazis tedavisinde kullanılacak yeni ilaçlara gereksinim vardır, zira tedavide uzun süredir başarıyla kullanılan antimon bileşiklerine (meglumin antimonat, sodyum stiboglukonat) karşı direnç geliştirmiş *Leishmania* suşlarının saptandığı bildirilmektedir¹². Memeli ve omurgasızlarda bulunan çok sayıda antimikrobiyal peptidin *Leishmania* türlerine karşı etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu bağlamda ülkemizde Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan *A.crassicauda* venomunun anti-leishmanial etkinliğinin araştırılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür. Bu çalışmada, söz konusu akrep venomunun ülkemizde görülen leyşmanyazis olgularının çoğundan sorumlu olan *Leishmania tropica*'ya karşı etkinliğinin, meglumin antimonat ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ülkemizde yaşayan bir hastanın deri lezyonundan izole edilen ve araştırma laboratuvarında sıvı azotta -196°C'de saklanan *L.tropica* izolatu (MHOM/TR/2012/CBCL-LT) çözdürüldükten sonra önce Novy-McNeal-Nicolle (NNN) besiyerinde, sonra da çok sayıda promastigot elde edebilmek için "Rosswell Park Memorial Institute (RPMI)"-1640 besiyerinde çoğaltıldı. Manisa-Celal Bayar Üniversitesi Araştırma Laboratuvarına nakledilen izolatu RPMI-1640 besiyerindeki kültürüne burada da devam edildi; içinde %10 fetal sıgır serumu (FCS) içeren (RPMI)-1640 besiyerine ayrıca %1 penisilin-streptomisin (penisilin, 10000 ünite/ml-streptomisin, 10 mg/ml) ve %1 gentamisin (gentamisin, 50 mg/ml) eklendi. Ekim sonrası kültürler 25°C'de etüvde inkübe edildi.

Çalışmada anti-leishmanial etkinliği araştırılan, Şanlıurfa'da doğal olarak yayılım gösteren kara akrep (*Androctonus crassicauda*, Oliver 1807) venomu, aynı bölgedeki doğadan toplanarak ve Sağlık Bakanlığı bünyesinde akredite olan Harran Üniversitesi Biyolojik Etkinlik Analiz Laboratuvarında yetiştirilmiş akreplerden temin edildi. Akrep venomu, 12 volt elektrik üreten sağım cihazı kullanılarak steril ortamda her iki cinsiyetteki (erkek-dişi) akreplerden sağıldı.

Çalışma kapsamındaki in vitro testler, 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarında gerçekleştirildi. *A.crassicauda* venomunun *L.tropica* (MHOM/TR/2012/CBCL-LT) üzerindeki anti-leishmanial etkinliği mikropalak dilüsyon yöntemi ile ölçüldü ve XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid) hücre canlılık testi ile hücrelerin canlılık yüzdeleri saptandı. Kontrol grubu olarak Leishmaniasis tedavisinde günümüzde kullanılan antimon bileşiklerinden meglumin antimonat kullanıldı. *A.crassicauda* venomu ve meglumin antimonat için %50 üremeyi durduran doz (IC50 değerleri) Graphpad

Prism 8 programının “log (inhibitor) vs. normalized response - Variable slope” denklemi ile hesaplandı.

Çalışmanın başında kuyucukların her birine *L.tropica* promastigotlarının kültürü için kullanılan 100 µl RPMI 1640 besiyeri (%10 FCS + %1 penisilin/streptomisin + %1 gentamisin) eklendi. Daha sonra 100 µl meglumin antimonat standart uygulanan 20 mg/kg/ml dozunda kendi sırasındaki kuyucuklara eklenmiş ve ilk kuyucuktan 100 µl alınıp seri sulandırmalarla 500, 250, 125, 50 ve 25 µg/ml’lik dilüsyonlar oluşturuldu. Daha sonra boş kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara mililitresinde 106 promastigot içeren süspansiyondan 100 µl eklendi. Bunu takiben de 100 µl akrep venomu eklendi, sonrasında ilk kuyucuktan 100 µl alınıp seri sulandırmalarla 500, 250, 125, 50 ve 25 µg/ml olacak şekilde dilüsyonlar oluşturuldu. Dilüsyonların tamamlanması sonrası hücre kültür plağının çevresi parafinle kaplandı; plak 48 saat süre ile 25°C’de inkübe edildi.

İstatistiksel Analiz

İki grubun arasındaki farklılıkların araştırılmasında ki kare testi ile istatistiksel analizler yapıldı ve iki grup arasındaki fark $p < 0.05$ olması anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

XTT analizleri sonucunda kontrol grubu olan meglumin antimonatın IC_{50} değeri 8.411 µg/ml (7.922-8.927), akrep serumunun ise 18.12 µg/ml (17.33-18.94) olarak belirlenmiştir (Tablo I, Şekil 1).

TARTIŞMA

Bu ön çalışmanın sonuçları, ülkemizde soktuğu insanlarda hayatı tehdit eden sistemik etkiler oluşturabilen *A.crassicauda* venomunun ülkemizden izole edilmiş *L.tropica* izolatu üzerinde meglumin antimonata göre daha yüksek dozlarda olsa da, inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Önceden yapılmış benzer tek çalışmanın, *L.mexicana* promastigotlarıyla yapılmış in vitro bir çalışma olduğu saptanmış ve çalışmada, Güney Amerika’ya özgü zehirli bir akrep olan *Tityus discrepans*’ın venomunun etkili olduğu, %50

Tablo I. Akrep Serumunun *Leishmania tropica* İzolatlarında Anti-leishmanial Aktivitesinin XTT Bulgularına göre Canlılık Yüzdeleri

Glucantim (µg/ml)	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12
	0	0	0	0	11	38	63	81
	0	0	0	0	7	36	66	84
	0	0	0	0	9	35	61	79
Akrep Serum (µg/ml)	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.91
	0	0	0	0	26	58	85	100
	0	0	0	0	21	60	81	100
	0	0	0	0	24	62	84	100
	0	0	0	0	27	59	82	100

Şekil 1. *Leishmania tropica* izolatlarında meglumin antimonat ve akrep serumunun ilaç konsantrasyonu/promastigot canlılığı oranları.

inhibitör dozunun (IC_{50}) 0.4 μ g/ml olduğu belirlenmiştir. Bu değer, çalışmamızda 18.12 μ g/ml olarak hesaplanmış olup meglumin antimonattan de yüksek bulunmuştur. Dozun yükselmesinin in vivo deneylerde yan etki riskini yükseltip yükseltmediği daha sonraki çalışmalarda araştırılacaktır.

Akrep sokması insanlarda çoğunlukla sokma yerinde ağrı, ödem gibi yerel etkilere yol açmakla birlikte zehirli türlerin sokmalarında sistemik alerjik reaksiyonlar oluşabilmekte, ölümcül böbrek yetmezliği gibi tablolar görülebilmektedir⁶. Venom içeriğindeki bazı protein ve peptitlerin sahip olduğu antimikrobiyal etkiler uzun süredir bilinmektedir. Bugüne

dek akrep venomundan imcroporin, vejovine, Kn2-7 (peptit) ve opisin gibi çok sayıda antimikrobiyal etkili peptit elde edilmiştir. Bunlar arasında yer alan vejovine, hastane enfeksiyonu etkeni metisiline dirençli çok sayıda gram-negatif bakterinin (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* ve *Acinetobacter baumannii*) üremesini düşük minimal inhibitör konsantrasyon değerlerinde engellediği belirlenmiştir. Ayrıca fare çalışmalarında vejovinin *Staphylococcus aureus* hücre duvarındaki lipoteikoik aside güçlü bir şekilde bağlanabildiği gösterilmiştir¹³. Benzer şekilde, akrep venomundaki bileşiklerin antifungal etkileri önceki çalışmalarda bildirilmiştir¹⁴.

Leyşmanyazis, insanlarda farklı klinik tablolarla ortaya çıkan ve tüm dünyada 98 ülkede 350 milyon üzerinde insanı tehdit eden yaygın bir enfeksiyondur ve kamçılılar sınıfında yer alan *Leishmania* cinsi protozoonlarla oluşur. İnsanlarda sıklıkla deri tutulumu ile kendini gösteren leyşmanyazis, mukoza ve deri tutulumu yanında tedavi edilmediğinde ölümcül olabilen iç organ tutulumuyla da ortaya çıkabilmektedir. Leyşmanyazis tedavisinde uzun yıllardır 5-değerlikli antimon bileşikleri (sodyum stiboglukonat ve meglumin antimonat) kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin doğrudan *Leishmania*'ya bağlanarak toksik etkilerle parazite zarar verdiği düşünülmektedir. Son yıllarda başta Hindistan olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde antimon bileşiklerine karşı direnç gelişmiş *Leishmania* izolatlarının saptandığı bildirilmekte, tedavi edilemeyen hastalar artmaktadır¹². Bu bakımdan birçok araştırma merkezinde *Leishmania* türlerine karşı etkili ve güvenilir ilaçlar geliştirilmesi için çalışmalar yürütülmektedir. *Leishmania*'ların glibenklamid gibi iyon kanalı inhibitörü ajanlara duyarlı olduğu bildirildiğinden, bu tarz proteinler içerdiği bilinen akrep venomuna karşı da duyarlı olmaları beklenebilir¹⁰. Nitekim *Leishmania* türleriyle yakın akraba olan bir diğer kamçılı *Trypanosoma cruzi*'yle yapılan yeni bir çalışmada, *Tityus serrulatus* adlı akrebin venomunun anti-paraziter etkileri yanında immün sistem üzerinde düzenleyici etkiler de gösterdiği belirlenmiştir¹⁵.

Bu ön çalışmada, ülkemizde sık rastlanan kutanöz leishmaniasisin önde gelen etkeni *L.tropica*'nın klinik bir izolatıyla ülkemizde bulunan akrep türlerinden *A.crassicauda* venomunun anti-leishmanial etkinliği olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuçlar, venomun meglumin antimonata göre daha yüksek doz gerektirse de *L.tropica* promastigotları üzerinde üremeyi durdurucu etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Bundan sonraki aşamalarda venom içeriğindeki protein ve peptitlerin ayrıştırılarak anti-leishmanial etkili olanların saptanması, bunların klinik örneklerden izole edilmiş diğer *Leishmania* türlerinde denenmesi ve hayvan deneyleriyle in vivo koşullarda bu sonuçların değerlendirilmesi planlanmaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Helvacı S, Özcel MA, Daldal N. Zehirli artropodlar, pp: 363-434 Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektörler. 1997. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 13, İzmir.
2. Özkan Ö, Filazi A. *Androctonus crassicauda* (Oliver 1807) Türü akreplerden değişik yöntemlerle elde edilen venomların farelerde akut LD50 miktarlarının belirlenmesi. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2004; 28(1): 50-3.
3. Bawaskar HS, Bawaskar HP. Scorpion Sting: update. J Assoc Physicians India 2012; 60: 46-53.
4. Michael ES, Victor F. High-level systematics and phylogeny of the extant scorpions (*Scorpiones*: *Orthosterni*). Euscorpius 2003; 11: 1-175.
5. Gümüştekin M, Sarıçoban B, Gürkan MA. Antivenomlar ve uygulama ilkeleri. DEU Tıp Derg 2019; 34(1): 73-83.
6. Güngör Ö, Ganidağlı B, Törün Gİ, Şenel E, Akkuş G, Erken E, et al. Akrep sokması sonrası akut böbrek hasarı. Turk Neph Dial Transpl 2017; 26(1): 124-6.
7. Kuhn-Nentwig L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. Cell Mol Life Sci 2003; 60(12): 2651-68.
8. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. Biochem J 2001; 359(Pt 1): 35-45.
9. Zeng XC, Corzo G, Hahin R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. IUBMB Life 2005; 57(1): 13-21.
10. Ponte-Sucré A, Campos Y, Fernandez M, Moll H, Mendoza-Leon A. *Leishmania* sp.: growth and survival are impaired by ion channel blockers. Exp Parasitol 1998; 88(1): 11-9.
11. Borges A, Silva S, Op den Camp HJ, Velasco E, Alvarez M, Alfonso MJ, et al. In vitro leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. Parasitol Res 2006; 99(2): 167-73.
12. Sundar S, Singh A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. Parasitology 2018; 145(4): 481-9.
13. Samy RP, Stiles BG, Franco OL, Sethi G, Lim LHK . Animal venoms as antimicrobial agents. Biochem Pharmacol 2017; 134: 127-38
14. Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, et al. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. Eur J Biochem 2002; 269: 4799-810.
15. Pimentel PMO, de Assis DRR, Lopez MG, Barroso A, Brant F, Leite PG, et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom as a potential drug source for Chagas' disease: Trypanocidal and immunomodulatory activity. Clin Immunol 2021; 226: 108713.