



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TÜRKİYE’DE BULUNUNAN ARI IRKLARINDAN
ELDE EDİLECEK ARI ZEHİRİ BİLEŞİMİNİN ANALİZİ
VE ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN İNVİTRO
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Sinem PEHLİVAN

**VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ender YARSAN

ANKARA

2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’DE BULUNUNAN ARI IRKLARINDAN ELDE
EDİLECEK ARI ZEHİRİ BİLEŞİMİNİN ANALİZİ VE
ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN İNVİTRO OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Sinem PEHLİVAN

**VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ender YARSAN

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü’nün 21L0239011 proje numaralı Öncelikli Alan Lisansüstü Tez Projesi (Doktora)” ve YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Bursu “Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları” alt alanı kapsamında desteklenmiştir.

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Türkiye’de Bulunan Arı Irklarından Elde Edilecek Arı Zehiri Bileşiminin Analizi ve Antikanserojen Etkilerinin İnVitro Olarak Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sinem PEHLİVAN

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalında
Sinem PEHLİVAN tarafından hazırlanan “Türkiye’de Bulunan Arı Irklarından Elde
Edilecek Arı Zehiri Bileşiminin Analizi ve Antikanserojen Etkilerinin İnVitro Olarak
Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alına jüri kararı, Ankara Sağlık Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Türkiye’de Arıcılık	3
1.1.1. Türkiye’de Bulunan Arı Irkları	4
1.2. Apiterapi	6
1.3. Arı Zehiri	10
1.3.1. Fiziksel Özellikleri	12
1.3.2. Bileşimi ve Farmakolojik Özellikleri	13
1.3.3. Melittin	16
1.3.3.1. Moleküler Yapısı	16
1.3.3.2. Farmakolojik Özellikleri	17
1.3.3.2.1. Antikanserojenik Etki	20
1.3.4. Arılardan Zehirin Toplanması	23
1.3.5. İçerik Tayini	25
1.3.5.1. Doğruluk (Accuracy)	26
1.3.5.2. Kesinlik (Precision)	27
1.3.5.3. Seçicilik	27
1.3.5.4. Doğrusallık (Linearity)	27
1.3.5.5. Aralık	28
1.4. Kanser	28
1.4.1. Kolorektal Adenokarsinoma	31
1.4.2. Glioblastoma Multiforme	33
1.4.3. Kanser Sağaltımı	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
2.1. Gereç	37
2.1.1. Kimyasal Malzemeler	37
2.1.2. Sarf Malzemeler	38
2.1.3. Kullanılan Cihazlar	39
2.2. Yöntem	39
2.2.1. Arı Zehirlerinin Toplanması	39
2.2.2. HPLC Analiz Yöntemi	40
2.2.3. Arı Zehirlerinin Hücre Kültürü için Hazırlanması	41
2.2.4. Hücre Kültürünün Hazırlanması	41
2.2.4.1 Hücrelerin Çözünmesi ve Kültürü	41
2.2.4.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması	42

2.2.4.3. Kùltür Kabındaki Hùcrelerin 96 Kuyucuklu Pleytlere Aktarılması	43
2.2.5. Arı Zehirlerinin Hùcelere Uygulanmak Üzere Hazırlanması	44
2.2.6. Hùcelere Arı Zehirlerinin Uygulanması	44
2.2.7. MTT, Nùtral Kırmızı ve LDH Analiz Yùntemleri	45
2.2.7.1 MTT Analizi	45
2.2.7.2. Nùtral Kırmızı Analizi	46
2.2.7.3. LDH Analizi	47
2.2.7.4. Sitotoksisite Değerlendirilmesi	48
3.BULGULAR	49
3.1.Yùksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	49
3.1.1. Arı Zehiri İçerik Analizi Sonuçları	49
3.2. Hùcrelerin Morfolojik İncelenmesi	50
3.3. MTT, Nùtral Kırmızı ve LDH Analiz Sonuçları	53
3.3.1. MTT Analizi	53
3.3.2. Nùtral Kırmızı Analizi	56
3.3.3. LDH Analizi	58
4. TARTIŞMA	64
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
ÖZET	75
SUMMARY	76
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	93

ÖNSÖZ

Arı zehri, arıların abdomenleri içerisinde bulunan zehir bezlerinden salgılanıp, zehir torbalarında biriken, sıvı ve açık renkli bir maddedir. İçeriğinde ki melittin, apamin, histamin, hyaluronidaz, fosfolipaz A2 gibi aktif biyolojik maddeler sayesinde tamamlayıcı tıp uygulamalarında koruyucu ve tedavi edici amaçlarla kullanılmaktadır.

Günümüzde kanser sağaltımında cerrahi girişimler, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri kullanılmakta, bu tedaviler ile birlikte hastalar tamamlayıcı tıp uygulamalarından da yararlanabilmektedir. Apiterapi olarak bilinen arı ve arı ürünlerinin koruyucu ve/veya tedavi edici amaçlarla kullanılması da tamamlayıcı tedavi yöntemlerinden bir tanesidir.

Çalışmamızda Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde bulunan bal arılarından (*Apis mellifera* L.) elde edilen zehirlerin bileşimleri ve içerik miktarları uygun HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemi ile belirlendi. Uygun çözücüler kullanılarak hazırlanan arı zehirleri hücre kültüründe Kolorektal Adenokarsinoma (Caco-2) ve Glioblastoma Multiforme (T98G) hücrelerine uygulandı. Her bir arı zehrinin hücrelerin canlılığı üzerine etkisi zaman ve konsantrasyona bağlı olarak ayrı ayrı değerlendirildi. Bu tez çalışmasının, arı zehirlerinin, içeriklerindeki madde miktarına göre değişmekle birlikte, potansiyel bir antikanserojen ajan olduğunun literatürde gösterilmesine önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ve doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden değerli danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Ender YARSAN'a, değerli bilgileri sayesinde hücre kültürünü öğrenmemi sağlayan ve tez çalışmamda kullandığım Caco-2 hücre hattının temin edilmesini sağlayan tez izleme komitesi üyesi Sayın Doç. Dr. Begüm

YURDAKÖK DİKMEN'e ve tez izleme komitesi üyesi Sayın Doç. Dr. Mert PEKCAN'a; anlayışı ve değerli bilgileriyle yardımlarını benden esirgemeyen Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Müdürü Sayın Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT'e; doktora eğitimim ve özellikle tez çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Dr. Sedat SEVİN'e ve Kimyager Süreyya KARAASLAN'a tüm destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim sürecinde tanışmış olduğum ve dostluğunu her daim hissettiğim, laboratuvar bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üy. Pınar ARSLAN'a, manevi destekleri ve arkadaşlıklarından dolayı Veteriner Hekim Cansu ÖNCÜ ALGAN'a ve Veteriner Hekim Muhammet Haydar UYSAL'a, yardımları için, sevgili dostum, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör. Yeliz KAYA KARTAL'a, Dr. Karl Michael LUX'a ve Uzm. Veteriner Hekim Recep UYAR'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması süreci başta olmak üzere her zaman sonsuz sabrı ve anlayışı ile destekçim olan sevgili eşim Veteriner Hekim Burak PEHLİVAN'a; ulaştığım her başarıda emeği olup bu günlere gelmemi sağlayan; annem Esmâ Esin BAŞÇİFTÇİ, dedem Cengiz BAŞÇİFTÇİ, kardeşim Enis ŞENTÜRK başta olmak üzere aileme ve hayatta olmasa da her daim yanımda olduğunu, benimle gurur duyduğunu hissettiğim babam Sami ŞENTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Bu doktora tez çalışması YÖK 100/2000 Doktora Bursu "Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları" burs programı ve "21L0239011" numaralı "Öncelikli Alan Lisansüstü Tez Projesi (Doktora)" kapsamında Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir. T.C. Yükseköğretim Kurulu'na ve T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Bax	Bcl-2-İlişkili X Protein
Bcl-2,	B-Hücreli Lenfoma-2
Ca	Kalsiyum
CD	Farklılaşma Antijeni
CE	Kapillar Elektroforez
Cyt C	Sitokrom-C
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DR	Ölüm Reseptörü
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FAP	Familial Adenomatöz Polipozis
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gram
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HNPCC	Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanser
Hz	Hertz
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
HSV	Herpes Simpleks Virüs
IC50	İnhibitör Konsantrasyon 50
K	Potasyum
kg	Kilogram
LC	Sıvı Kromatografisi
MALDI-TOF	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanlı

MAPK	Mitojen İle Aktive Olan Protein Kinazlar
M.Ö	Milattan Önce
MCD	Mast Hücre Degranülasyon
mg	Miligram
mL	Mililitre
MS	Kütle Spektrofotometresi
Mt DNA	Mitokondriyal DNA
nm	Nanometre
NF—KB	Nükleer Faktör-Kappa B
NO	Nitrik Oksit
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PDA	Fotodiod Dizi Dedektörü
PDGFR	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktör Reseptörü
pH	Hidrojen Potansiyeli
PLA2	Fosfolipaz A2
ppm	Milyonda bir birim (mg/kg)
p53	protein 53
RP	Ters Faz
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
TLR	Toll-Benzeri Reseptör
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNF-R	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer
UPLC	Ultra Performans Sıvı Kromatografisi
UV	Ultra Viyole
V	Volt
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VWD	Değişken Dalga Boyu Dedektörü
Yy	Yüzyıl
µg	Mikrogram

μL	Mikrolitre
μm	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad Derece
%	Yüzde



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Yakın doğu bal arısı ırklarının dağılımı	5
Şekil 1.2. Bal arısı zehir aktarma aparatının yapısı	11
Şekil 1.3. Arı zehiri biyokimyasallarının hücredeki fizyopatolojik etkileri	12
Şekil 1.4. Apaminin kimyasal yapısı	14
Şekil 1.5. Melittinin kimyasal yapısı	16
Şekil 1.6. Amfipatik α -sarmal peptidlerin olası gözenek oluşturma basamakları	18
Şekil 1.7. Melittinin antiinflamatuvar etki mekanizması	20
Şekil 1.8. Arı zehiri ve melittinin antikanser etki mekanizmaları	21
Şekil 1.9. Elektroşok yöntemi	24
Şekil 1.10. DNA hasarının kaynakları ve sonuçları	30
Şekil 2.1. Arı zehirinin toplanması ve cam yüzeyden kazınması	40
Şekil 3.1. Afyon ilinden elde edilen arı zehirinin HPLC kromotogramı	50
Şekil 3.2. Farklı illere ait arı zehirlerinin Caco-2 hücrelerine uygulanmasından 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda oluşan morfolojik görünüm	51
Şekil 3.3. Farklı illere ait arı zehirlerinin T98G hücrelerine uygulanmasından 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda oluşan morfolojik görünüm	52

Şekil 3.4. Arı zehirlerinin bazı konsantrasyonlarında Caco-2 ve T98G hücrelerinin, MTT analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevaplarının karşılaştırılması	55
Şekil 3.5. Arı zehirlerinin bazı konsantrasyonlarında Caco-2 ve T98G hücrelerinin, Nötral Kırmızı analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevaplarının karşılaştırılması	57
Şekil 3.6. Arı zehirlerinin bazı konsantrasyonlarında Caco-2 ve T98G hücrelerinin, LDH analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevaplarının karşılaştırılması	59
Şekil 3.7. Caco-2 hücrelerinde MTT, Nötral Kırmızı ve LDH analizleri ile doza göre belirlenen yüzde sitotoksosite değerleri arasındaki ilişki	60
Şekil 3.8. T98G hücrelerinde MTT, Nötral Kırmızı ve LDH analizleri ile doza göre belirlenen yüzde sitotoksosite değerleri arasındaki ilişki	61
Şekil 3.9. Arı zehirlerinin farklı apamin, melittin ve fosfolipaz A2 miktarları ve hücrelerin IC ₅₀ (µg/mL) değerleri	62

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Arı zehiri bileşimindeki maddeler	13
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	38
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	38
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cihazlar	39
Çizelge 2.4. Caco-2 ve T98G hücrelerine uygulanan arı zehiri doz aralıkları	45
Çizelge 3.1. İllere göre apamin, fosfolipaz a2 ve melittin miktarları (%)	49
Çizelge 3.2. MTT analiz sonuçlarına göre Caco-2 ve T98G hücreleri için bulunan IC50 değerleri	54
Çizelge 3.3. Nötral Kırmızı analizi sonuçlarına göre Caco-2 ve T98G hücreleri için bulunan IC50 değerleri	56
Çizelge 3.4. LDH analizi sonuçlarına göre Caco2 ve T98G hücreleri için bulunan IC50 değerleri	58

1. GİRİŞ

Arıcılık, bitkisel kaynakların, arının, iş gücünün, teknik bilginin birlikte kullanılmasıyla yapılan sosyoekonomik bir hayvancılık faaliyeti olup tarihinin insanlık tarihi kadar eskiye dayandığı düşünülmektedir (Burucu ve Gülse Bal, 2018; Parlakay ve ark., 2008). İspanya, İtalya, Eski Mısır'da uzun yıllardır yapıldığını gösterir kanıtlar bulunmakta, Anadolu'da arıcılık yapıldığını gösteren belgelerin Milattan Önce (M.Ö) 1300'lü yıllara ait olduğu düşünülmektedir (Koday ve Karadağ, 2020; Sıralı, 2017).

Günümüzde arıcılık, dünya çapında yapılan, yaygın bir tarımsal faaliyet. Dört mevsimin yaşanması, farklı iklim özelliklerinin görülmesi ve tarımsal üretim çeşitliliği gibi avantajları bakımından Türkiye, arıcılık faaliyetlerinde oldukça önemli bir potansiyele sahiptir (Sancak ve ark., 2013). Son yıllarda artan koloni sayısı sayesinde koloni varlığı bakımından dünyada ön sıralarda yer almaktadır (Karlidağ ve Köseman, 2015).

Bal arıları (*Apis mellifera* L.), çiçekli bitkilerin tozlaşmasını sağlayarak meyve ve tohum oluşmasında etkin rol oynamakta, birçok kültür bitkisinde bal arısı kolonilerinin kullanımı ile tohumların kalite ve miktar bakımından veriminde önemli artış sağlanmaktadır (Sıralı ve Cınbirtoğlu, 2018; Svensson, 1991). Arıcılık faaliyetleri sonucu bal, bal mumu, propolis gibi birçok değerli ürün elde edilebilmekte, bu ürünler beslenme, sağlığın korunması ve hastalıkların sağaltımı amacıyla da uzun yıllardır kullanılmaktadır (Fıratlı ve ark., 2000). Başta bal olmak üzere birçok arı ürünü içeriğindeki biyolojik maddeler sayesinde sağlık yönüyle oldukça değerlidir (Altıntaş ve Bektaş, 2019).

Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre geleneksel tıp; fiziksel ve ruhsal hastalıklardan korunma, bu hastalıklara tanı koyma, hastalıkları iyileştirme veya tedavi etmenin yanı sıra sağlığın iyi sürdürülmesinde kullanılan, farklı kültürlerle

özgü teori, inanç ve tecrübelerle dayalı, açıklaması yapılabilen veya yapılamayan, bilgi, beceri ve uygulamalar bütünüdür (WHO, 2000). Geleneksel tıp, çeşitli tedavi yöntemlerinden oluşmakta ve bu uygulamalardan biri olan apiterapi; bal arısı ürünlerinin sağlık amaçlı kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Tarihinin antik medeniyetler dönemine dek uzandığı bilinen apiterapi uygulamaları üzerine son yıllarda ülkemizde de yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Aydın ve Tekeoğlu, 2018; Sevin ve Yarsan, 2021; Türedi, 2021).

Yüksek mortalitesi ile kanser, dünya çapında önemli bir hastalıktır (Liu ve ark., 2014). Günümüzde kanser vakalarında ve kansere bağlı ölüm oranlarındaki önemli artış, sağlık ve ekonomik açıdan problemler oluşturmuş, yeni ilaçlar ve stratejilerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur.

Modern tıptaki önemli gelişmelerin yanı sıra bitkisel ve hayvansal kaynaklı ilaçlar da kanser ve birçok hastalıktan korunmada ve hastalıkların tedavisinde büyük rol oynamaktadır (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2013). Apiterapi ile tamamlayıcı ve alternatif tıp alanında başta bal, polen, propolis, arı sütü ve arı zehiri olmak üzere çeşitli arı ürünlerinin tedavide kullanımına odaklanılmaktadır (Münstedt ve Männle, 2020). Yapılan çalışmalarla arı ürünlerinin çeşitli rahatsızlıklar üzerinde tedavi edici özelliklerinin olduğu ortaya konulmuştur (Baek ve ark., 2006; Gebaraa ve ark., 2003; Subrahmanyam, 1991).

Apiterapide kullanılan arı ürünleri içerisinde, arı zehiri ayrı bir öneme sahiptir (Sıralı, 2021). Biyotoksinler; bazı canlıların zehir bezlerinden sentezlenen ve salgılanan, içeriğinde farmakolojik bakımdan aktif ve potansiyel terapötik değere sahip bileşenler içeren maddelerdir (Liu ve ark., 2016). Son yıllarda biyotoksinler gibi doğal ürünlerin kanser tedavisinde kullanımına dair geniş kapsamlı çalışmalar yapılmıştır (Lee ve ark., 2015; Zheng ve ark., 2015).

1.1. Türkiye’de Arıcılık

Anadolu’da, dünyadaki ilk kentsel yerleşim merkezi olan Çatalhöyük’te, M.Ö 7000-8000 yıllarında arıcılığın yapıldığına dair duvar resimleri bulunmuş, burada yaşamış uygarlıklarda bal arıları ve arıcılık faaliyetleri kültürün önemli bir parçasını oluşturmuştur (Akkaya ve Alkan, 2007). Asya ve Avrupa kıtalarını birbirine bağlayan bir köprü konumundaki Türkiye, coğrafi konumu ve sahip olduğu doğal zenginlikleri, farklı coğrafi bölgelerindeki iklim özellikleri ve bitki çeşitliliği ile farklı arı gen kaynaklarına sahip, arıcılık potansiyeli yüksek ülkelerden birisidir (Kekeçoğlu ve ark., 2007).

Arıcılık, bal arılarının yaşam biçimleri ve ürün oluşturmak amacıyla ham maddelerini doğadan toplamaları nedeniyle doğaya en bağımlı hayvancılık faaliyetidir. Bu nedenle flora ve iklim koşulları arıcılık için oldukça önemlidir (Çevrimli ve Sakarya, 2018). Akdeniz ülkelerinin uygun flora ve iklim şartlarına sahip olması ve kış aylarının ılık yaşanması arıcılık için elverişli olmalarını sağlamaktadır. Dünyanın en önemli 12 gen merkezinden biri olan ülkemiz, birçok doğal çiçekli bitki türü ve endemik bitkiye sahip olup coğrafi bölge, mevsim, kıyı bölgelerde veya iç kesimlerde bulunmalarına göre farklılık gösteren nektar ve polen kaynakları bulundurmaktadır (Çağlıyan, 2015; Davis ve ark., 1982; Doğaroğlu, 2007; Karadeniz, 2015).

Türkiye’de 2020 yılında; 8 179 085 adet kovan bulunurken, 2021 yılında bu sayı %6,8 oranında artarak 8 733 394’e yükselmiştir. Arılı kovanların yaklaşık bir milyonu Muğla ilinde bulunmaktadır. 2021 yılında arılı kovan sayısı bakımından 1,7 milyon ile Ege ilk sıradayken bunu 1,5 milyon ile Akdeniz Bölgesi ve 1,2 milyon ile Doğu Karadeniz Bölümü izlemektedir (Burucu, 2021).

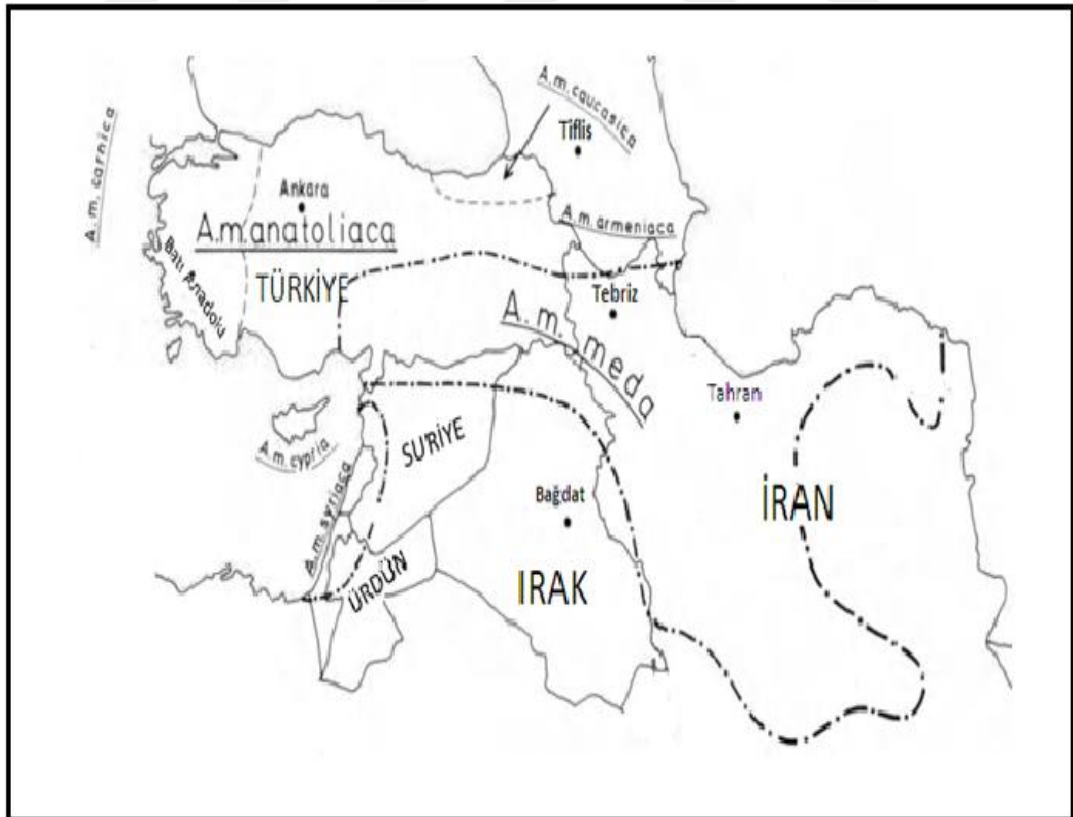
1.1.1. Türkiye’de Bulunan Arı Irkları

Apis cinsi içerisinde farklı türler bulunmakta, günümüzde, bu türler içerisinde en çok; *Apis mellifera*, *Apis dorsata*, *Apis florea* ve *Apis cerana* bilinmektedir. Türlerin yayılma alanlarını belirleyen faktörlerden en önemlisi iklimdir. *Apis mellifera* haricindeki türler Doğu arıları olarak bilinmektedir (Millner, 1996; Özdil ve Oskay, 2016). Rutnner’e göre *Apis mellifera* L. Hazar Denizi’nin güneyinde ve Anadolu’ya yakın bir bölgeden orjin alarak, Avrupa ve Afrika’ya yayılmıştır (Ruttner, 1988). Avrupa, Afrika ve Yakın Doğu’da 17. yüzyıla (yy) kadar bulunan bal arısı zaman içerisinde Kuzey Amerika ve Avustralya’ya yayılım göstermiştir (Özdil ve Oskay, 2016).

Allozim, polimorfizm ve mitokondriyal DNA’larında (mtDNA) bulunan farklılıklar bal arılarının genetik ve coğrafik dağılımlarının araştırılmasında önemlidir. Bal arılarının mtDNA’larında bulunan farklılıkların değerlendirilmesiyle Batı Avrupa, Doğu Avrupa, Afrika ve Orta Doğu olmak üzere dört ayrı arı soyu belirlenmiştir (Smith, 2002). Farklı tekniklerin bir arada kullanılmasıyla yapılan çalışmalarda Türkiye’de; *Apis mellifera anatoliaca* (Anadolu arısı), *Apis mellifera caucasica* (Kafkas arısı), *Apis mellifera meda* (İran arısı), *Apis mellifera syriaca* (Suriye arısı), *Apis mellifera carnica* olmak üzere beş farklı arı ırkının varlığından söz edilmiştir. Türkiye’nin kuzeydoğusunda *A.m. caucasica*, güneydoğusunda *A. m. meda* ve *A. m. syriaca*’nın bulunduğu, geri kalan bölgelerde yaygın olarak *A. m. anatoliaca* alt türlerinin olduğu (Ruttner, 1988), Trakya yöresindekilerin ise *A. m. carnica* ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Kambur ve Kekeçoğlu, 2018).

Bal arısının Anadolu’da bölgesel ekolojik şartlara adapte olarak farklılaştığı ve Anadolu’da çeşitli arı ırklarının ve ekotiplerinin bulunduğu bilinmektedir (Fıratlı, 1987; Kence, 2006; Sönmez ve Settar, 1987). *A. m. anatoliaca* Türkiye’nin güneydoğu ve kuzeydoğusu dışındaki alanda yerli arı popülasyonlarını oluşturmaktadır. Orta Anadolu’nun kırsal iklimine uyum sağlayan bu arı ırkı Muğla arısı ve Orta Anadolu arısı başta olmak üzere farklı bölgelere uyum sağlama

özelliklerine göre çeşitli ekotiplere sahiptir (Sıralı, 2017). *A.m. caucasia* ırkı, gri-esmer renkli, oğul verimi düşük, karasal ve soğuk iklim şartlarına uyum sağlama özelliği yüksek olan arılar olarak bilinmektedir. Anavatanı Kuzeydoğu Anadolu, Kafkasya ve Gürcistan olup, dünyada yaygın olarak yetiştiriciliği yapılmakta, ülkemizde ise Kafkas arı ırkının gen merkezi olarak belirlenmiş olan Artvin ve Ardahan illerinde yayılım göstermektedir (Aygün ve Akbulak, 2017; Kaftanoğlu, 2001; Kırpık ve ark., 2010). Trakya Bölgesinde *A. m. anatoliaca* ile birlikte bulunan bal arılarının ise anavatanı Slovenya olan ve zamanla tüm kıtalara yayılmış olan karniyol arısı ile yakın ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Bu arılar, koyu gri renkli görünümde, yüksek bal ve oğul verimindedirler (Gür ve ark., 2018; Kaftanoğlu, 2001; Öztürk ve Korkmaz, 2005). *A. m. syriaca*'nın ülkemizde Hatay civarında, Suriye sınırına yakın bölgelerde (Palmer ve ark., 2000), *A. m. meda* ise Doğu Anadolu'da Van Gölü çevresinde Elazığ ve Tunceli'ye kadar ve Malatya'da bulunmaktadır (Ruttner ve ark., 1985). Şekil 1.1'de Yakın Doğu bal arısı ırklarının dağılım haritası verilmiştir.



Şekil 1.1. Yakın doğu bal arısı ırklarının dağılımı (Ruttner, 1988)

1.2. Apiterapi

Geleneksel tıp yöntemleri içerisinde yer alan ve önemi gün geçtikçe artan apiterapi; bal, polen, propolis, arı sütü ve arı zehiri gibi bal arısı ürünlerinin hastalıkların tedavi edilmesi ve hastalıklara karşı koruyucu amaçla kullanılması olarak tanımlanmaktadır (Özdemir ve ark., 2021; Şenel ve Demir, 2018). Apiterapi uygulamaları kendi başlarına tedavi yöntemleri olmayıp, tıbbi yaklaşımın bir parçasıdır (Sığ ve ark., 2019). Tarihinin en az 6.000 yıl öncesine dayandığı düşünülmekte, eski Mısır, Yunan ve Roma Medeniyetleri zamanında insanlar tarafından kullanılmış olup, apiterapi hakkında en eski kaydın yaklaşık 5.000 yıl öncesinden kalma bir Sümer tableti olduğu bilinmektedir (Aydın ve Tekeoğlu, 2018; Hellner ve ark., 2008).

Arıcılık faaliyetleri sonucu elde edilen ürünler gıda olarak tüketilmelerinin yanı sıra insan sağlığı açısından da oldukça önemli ürünler olup, içerisinde bulunan biyolojik aktif maddelerden terapötik, farmasötik, kozmetik amaçlarla yararlanıldığı bilinmektedir (Altıntaş ve Bektaş, 2019; Cornara ve ark., 2017). Bal, bal mumu, polen, propolis, arı sütü, arı zehiri, arı ekmeği (perga), apilarnil ve kovan havası gibi biyolojik bakımdan önemli birçok etken madde içeren arı ürünü bulunmaktadır (Sorucu, 2019).

Bal, tarih boyunca yaraların tedavi edilmesinde kullanılmıştır. Antimikrobiyal özelliği ilk olarak 1892 yılında keşfedilmiş, araştırmacılar tarafından biyolojik ve klinik etkileri belirlenene kadar, 19. yy sonlarına kadar ki dönemde, halk arasında ve geleneksel yöntemlerle, yaraları tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır. İlk kez 20. yy ortalarında Avrupa ve Amerika'da yapılan çalışmalar ile enfekte yaraların tedavisinde balın etkinliğinden bahsedilmiştir (Lee ve ark., 2011). İçeriği toplandığı bitki çeşitliliğine bağlı olarak değişmektedir. Kuru ağırlığının %95'e yakınıni şeker oluşturmaktadır (Onbaşı ve ark., 2019). İçeriğinde; su, enzimler, vitaminler, mineraller, fenolik ve uçucu bileşikler başta olmak üzere 200' den fazla madde bulundurmakta, kafeik asit, gallik asit gibi fenolik bileşikleri sayesinde antioksidan

ve antiinflamatuvar özellik göstermektedir (Porcza ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarla balın antikanserojen özellik taşıdığıda gösterilmiştir (Attia ve ark., 2008; Swellam ve ark., 2003; Yaacob ve ark., 2013). Bu etkinliğinden sorumlu olan maddelerin, içeriğindeki kemferol, kateşin ve kuersetin gibi flavonoidler ile kaffeik asit ve gallik asit gibi polifenoller olduğu bilinmektedir. Potansiyel antikanserojen etkisini; apoptoza neden olarak, hücre siklunu durdurarak, mitokondriyal dış zar geçirgenliğini ve mitokondriyal yolakları etkileyerek, oksidatif strese, insülin sinyalizasyonuna ve başka birçok aşamaya etki ederek gösterebileceği bildirilmiştir (Waheed ve ark., 2019).

Propolis ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedilerek doğal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır (Kutluca ve ark., 2008). Biyolojik özellikleri 1960'lı yıllarda bilim insanları tarafından araştırılmaya başlanmıştır. Propolis ile ilgili ilk çalışmalar Ghisalberti tarafından 1979 yılında yayınlanmış olup sonraki yıllarda propolis hakkında detaylı bilgilere ulaşılmıştır (Doğan ve Hayoğlu, 2012; Ghisalberti, 1979). Zengin biyoflavonoid, vitamin, selenyum, demir ve çinko içeriğiyle önemli bir arı ürünü olan propolis, bakteri hücre duvarı ve zarında hasara neden olarak antibakteriyel etki göstermektedir. Apiterapi uygulamalarında dahili olarak kullanılmasının yanı sıra bakteriyostatik ve bakterisid etkisi sayesinde antibiyotik direnci kazanmış patojenlerin neden olduğu deri rahatsızlıklarında da kullanım alanı bulmuştur (Habryka ve ark., 2016). Kimyasal bileşiminden dolayı, antimikrobiyal, antioksidatif, antiinflamatuvar, antitümör, immunmodülatör, antiülser, karaciğer ve kalp üzerine koruyucu özelliklere sahiptir (Farooqui ve A. Farooqui, 2010). Arı ürünlerinin potansiyel antitümör ve antimetastatik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, suda çözünür formda hazırlanan propolis örnekleri, transplante edilebilen murin tümörlerin deney hayvanlarına inokulasyonu sonrası deney gruplarına verilmiş ve deney gruplarında hayatta kalma süresinin uzadığı, subkutan tümör gelişiminin azaldığı belirlenmiştir. Bu etkilerin propolisin bileşiminde bulunan polifenolik maddelerden kaynaklı olabileceği bildirilmiştir (Orsolice ve ark., 2003). Yapılan bir başka çalışmada ise hücrelerde apoptoza neden olduğu ve bu etkiyi kaspaz kaskadı ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonu aracılığı ile mitokondriden sitozole

sitokrom c (cyt-c) salınımına neden olarak oluşturduğu bildirilmiştir (Premratanachai ve Chanchao, 2014).

Tarihi kayıtlara göre insanlar tarafından ilk kullanımı Antik Yunan dönemine dayanan arı sütünün değerli bir arı ürünü olduğu 1600’lü yıllarda keşfedilmiş olup arı sütünün apiterapi kapsamında fonksiyonel gıda maddesi olarak kullanımı 1960’lı yıllarda başlamıştır (Akyol, 2015; Çelik, 2019). Genç işçi arıların üst çene ve boğaz bezlerinden salgılanan arı sütü, viskoz ve jelimsi bir yapıya, beyazımsı sarı bir renge sahiptir. Yüksek miktarda protein, aminoasit, lipid, vitamin ve şeker içeren antialerjik, antioksidatif, antibakteriyel ve antiviral özelliklere sahip bir arı ürünüdür (Akyol, 2015; Aydın ve Tekeoğlu, 2018). C3H/HeJ fareleriyle yapılan bir çalışmada, arı sütünün DNA oksidatif hasarı ve deney hayvanlarının yaşam süreleri üzerine etkileri araştırılmış, 16 hafta boyunca arı sütü günlük diyet ile deney gruplarına verildiğinde hayvanlarda, serum oksidatif hasar parametrelerinde azalmaya neden olduğu ve ortalama yaşam süresini artırdığı belirtilmiştir (Inoue ve ark., 2003). Arı sütünün, radyasyon nedenli apoptozda, radyoprotektif etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, gönüllüler 14 gün boyunca 1000 mg’lık, arı sütü içeren kapsül kullanmışlardır. Gönüllülerden farklı günlerde kan örnekleri alınarak radyasyon maruziyetinde apoptotik hücre oranları belirlenmiş, radyasyonun serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarında insan periferik lökositlerinde apoptoza neden olabileceği, arı sütünün ise radyasyon nedenli apoptozda antioksidan etkili olabileceği belirtilmiştir (Rafat ve ark., 2016). Arı sütünün Balb/c farelerinde WEHI-164 fibrosarkoma hücrelerinin büyümesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, farklı deney grupları oluşturulmuş ve her bir hayvana farklı dozlarda arı sütü verilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, deney grubunda tümör boyutlarında önemli bir azalış olduğu, fibrosarkoma hücrelerinin kontrolünde arı sütünün önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Shirzad ve ark., 2013).

Polen, doğal şeker, mineral, vitamin, organik ve aminoasitler, steroller ve proteinler bakımından oldukça zengin bir kaynak olup bu içeriği sayesinde tıbbi bakımdan oldukça değerlidir (Habryka ve ark., 2016). Orta Çağ’da insanlar arı polenini gastrik ve kardiyovasküler sistem üzerinde, sedatif etkisinden yararlanmak

amacıyla kullanmış, eski Çin ve Mısır'da günlük diyetlerinde tüketmişlerdir (Denisow ve Denisow-Pietrzyk, 2016). Arı poleni fenolik ekstratı ile mirisetinin antialerjik özelliğinin araştırıldığı bir çalışmada arı poleni fenolik ekstratının immunglobulin G1 ve immunglobulin E üretimini engellediği belirtilmiştir (Medeiros ve ark., 2008). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analiz yöntemi ile fenolik madde içeriği belirlenen arı poleni bakımından zengin bir diyetle beslenen CBA/Hr fareleri ile yapılan bir başka çalışmada farklı gen ekspresyon profilleri değerlendirilmiş, arı polenin karaciğer ve beyinde apoptoz yolağı üzerinde ve kemotaksiste önemli rol oynadığı bilinen gen ekspresyonlarında değişikliklere neden olduğu ve antioksidan aktiviteye sahip önemli bir kaynak olduğu belirtilmiştir (Šarić ve ark., 2009).

Polen, bal ve diğer arı salgıları ile bir araya gelerek, iki haftaya yakın bir süre ve yaklaşık 30°C sıcaklıkta laktik asit bakterileri tarafından fermentasyona uğratarak arı ekmeği halini almaktadır. Besin değeri bakımından polen ile karşılaştırıldığında, daha iyi sindirilebilirlik ve zengin kimyasal bileşime sahip olan bu arı ürünü arı larvalarının temel besin kaynağını oluşturmaktadır (Habryka ve ark., 2016; Silici, 2014). Arı ekmeğinin kimyasal yapısı, antioksidan özellikleri, antimikrobiyal ve antitümör aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada Caco-2 (kolorektal adenokarsinoma), PC-3 (prostat adenokarsinoma) ve HepG-2 (hepatosellüler karsinoma) hücrelerine karşı inhibitör etki gösterdiği, inhibitör konsantrasyon 50 (IC50) değerlerinin sırasıyla; 262, 314 ve 386 µg/mL olduğu, arı ekmeğinin potansiyel bir antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör ajan olabileceği belirtilmiştir (Elsayed ve ark., 2021).

Arı zehiri dişi işçi arılar tarafından üretilen ve aktif bileşenler içerdiği bilinen bir arı ürünüdür (Wehbe ve ark., 2019). İçeriğinde melittin, apamin, sekapin, tertiapin, adolapin ve mast hücre degranülasyon peptidi (MCD); fosfolipaz A2 (PLA2) ve hyaluronidaz, asit fosfomonoesteraz, lizofosfolipaz enzimleri; histamin, dopamin, norepinefrin, serotonin aktif aminleri gibi farmakolojik bakımdan önemli birçok madde bulunmaktadır (Gülmez ve ark., 2017). Günümüzde tüm dünyada arı zehiri tıbbi amaçlı kullanılmaktadır (Sığ ve ark., 2019). İçeriğinin büyük kısmını oluşturan

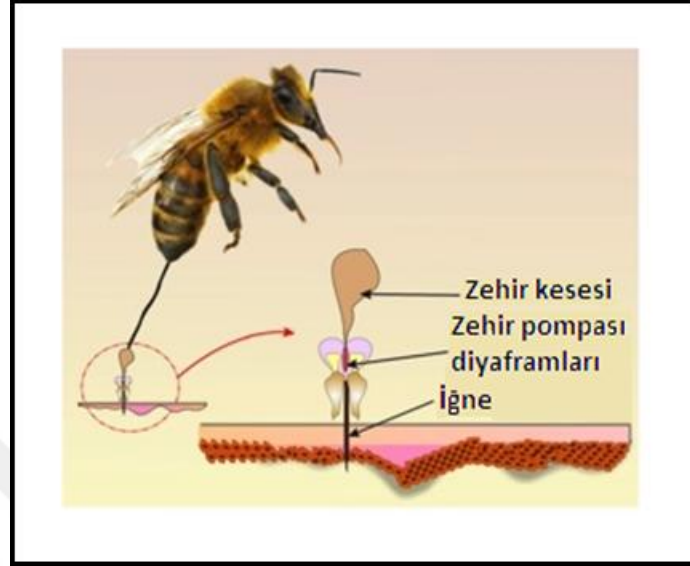
melittinin; G proteini, protein kinaz C ve adenilat siklazı uyardığı bilinmektedir (Knowles ve Farndale, 1988; Mahady ve ark., 1998; Mau ve Vilhardt, 1997). Literatürde son yıllarda yapılan çalışmalarla radyoprotektif, antimutajenik, antiinflamatuvar, antinosiseptif ve antikanser özellikleri ortaya konulmuş, hücre apoptozu, nekrozu ve sitotoksitesi üzerine etkilerinin olduğu ve farklı kanser hücrelerinin büyümesini engellediği bildirilmiştir (Oršolić, 2012).

1.3. Arı Zehiri

Apitoksin olarak adlandırılan bal arısı zehiri, arıların karın boşluğunda bulunan zehir bezlerinden salgılanan bir dış salgı ürünüdür (Çaprazlı ve Kekeçoğlu, 2021). Bal arıları tarafından savunma mekanizması olarak gelebilecek olası saldırılara karşı diğer arılara alarm feromonları aracılığı ile uyarı vermek amacıyla salgılanır (Bovi ve ark., 2017).

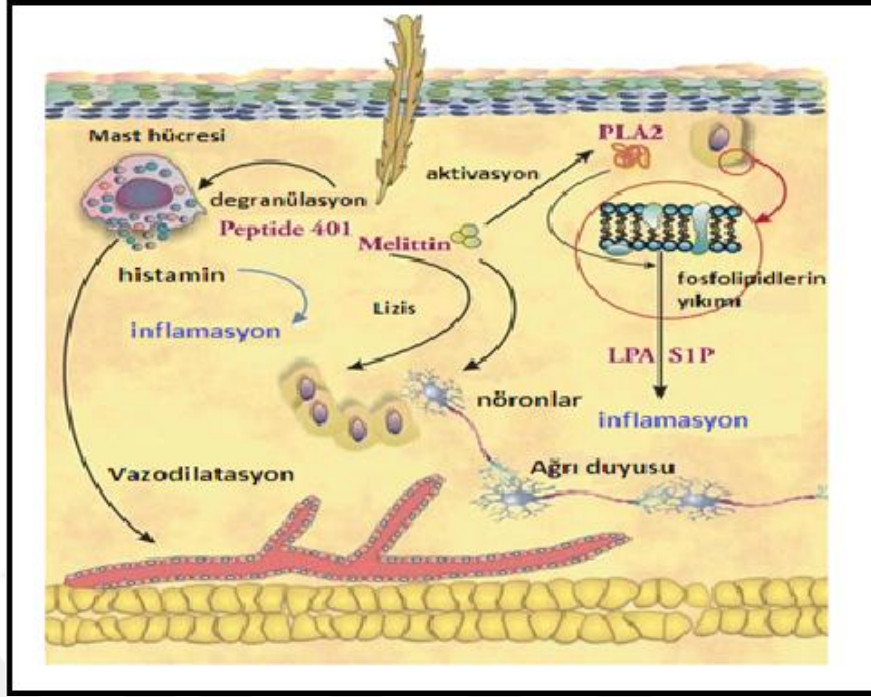
Zehir bezleri; asit bez (zehir bezi) ve alkalın bez (Dufour bez) olmak üzere iki dış salgı bezinden oluşmaktadır. Zehir bezinden salgılanarak zehir kesesine toplanan zehir, iğneleme esnasında iğne içerisinde bulunan zehir kanalına ve bu sayede hedef canlıya iletilir. Dufour bezi ise iğnenin dip kısmında bulunan ve alkalın yapıya sahip bir dış salgı bezi olup zehir kanalına iğneleme sırasında gönderdiği salgısı sayesinde iğnenin kayganlaşmasını sağlamakta, alarm feromonlarını zehir içerisine ileterek koloniyi düşmanlarına karşı uyarmaktadır (Çaprazlı ve Kekeçoğlu, 2021). Bu bezlerde yaklaşık 0,3 mL arı zehiri bulunmakta, kraliçe ve işçi arılarda bulunan arı iğnesi, ovipositor adı verilen yumurtlama organının yapısal değişimi sonucu oluşmaktadır. Şekil 1.2’de bal arısı zehir aktarma aparatının yapısı gösterilmiştir. Erkek arılarda sokma özelliği yoktur (Altıntaş ve Bektaş, 2019). İşçi arıların zehir üretme yeteneklerinin petek gözünden çıktıktan on iki gün sonra en yüksek seviyeye ulaştığı ve 20 günlük olduklarında zehir üretimini azalttıkları, bir canlıyı soktuklarında iğneleri vasıtasıyla zehir torbalarındaki zehirin üçte birini soktukları canlıya aktardıkları bilinmektedir (Derebaşı ve Canbakal, 2009). Ana arıda ise

pupadan ilk çıktığı dönemde zehir miktarı en yüksek seviyesinde bulunurken ilerleyen dönemlerde azalmaktadır (Bachmayer ve ark., 1972).



Şekil 1.2. Bal arısı zehir aktarma aparatının yapısı (Elieh Ali Komi ve ark., 2018).

Bal arıları soktuktan sonra zehir kesesi, kaslar ve sinir merkezi olmak üzere sokma düzeneklerinin tümünü kaybetmekte ve zehir keseleri boşalana kadar zehiri akıtmaya devam etmektedirler (Son ve ark., 2007). Arı sokmasının ardından bölgede genellikle ağrı, kızarıklık ve ödem oluşmaktadır. Ancak arı alerjisi olan kişilerde anafilaktik şok oluşabilmektedir (Annala, 2000). Arı zehiri alerjik reaksiyonlara sebep olması ile karakterize olup bu reaksiyonlar deriyi, solunum sistemini, kardiyovasküler ve gastrointestinal sistemi etkileyebilmekte, şiddetli anafilaktik şoka neden olarak serebral veya miyokardiyal iskemiyle sonuçlanabilmektedir (Wehbe ve ark., 2019). Şekil 1.3’de arı zehiri içerisinde bulunan bazı bileşenlerin hücrede neden olduğu fizyopatolojik etkiler gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Arı zehiri biyokimyasallarının hücredeki fizyopatolojik etkileri (Elieh Ali Komi ve ark., 2018)

1.3.1. Fiziksel Özellikleri

Bal arısı zehiri; kolay kuruyabilen, keskin kokuya ve acı tada sahip 4,5-5,5 pH'lı, şeffaf ve sıvı bir maddedir. İçeriğinde bulunan alarm feromonları sayesinde aromatik yapıdadır (Altıntaş ve Bektaş, 2019). Mukoz membranlar veya göz ile temas ettiğinde şiddetli yanmaya neden olabilmekte, hava ile temas ettiğinde gri-beyaz renkte kristaller oluşturmakta, kurduğunda ise açık sarı renk almaktadır. İçeriğindeki proteinler nedeniyle oksidasyon oluşan bazı ticari preparatlarda kahverengi renkli olabilmektedir (Ali, 2012). Solüsyonları renksiz olup, suda çözünabilir ancak alkol ve amonyum sülfatta çözünemez özelliktedir (Ali, 2012; Kelle, 2007). Zehir kuruduktan sonra ağırlığının %65-70 kadarını kaybetmekte, sıvı kısım uzaklaştıktan sonra yaklaşık 0,1 mg saf kuru arı zehiri elde edilmektedir. Soğuk ve ısıya karşı dayanıklı olan kuru arı zehiri nemden korunduğu takdirde bir yıldan fazla süre özelliğini kaybetmemekte, koyu renkli şişeler içerisine alınıp dondurularak saklanabilmektedir (Derebaşı ve Canbakal, 2009).

1.3.2. Bileşimi ve Farmakolojik Özellikleri

Arı zehiri; arıların abdominal boşluklarında bulunan bezden sentezlenen ve salgılanan; enzimler, biyolojik aktif peptidler, peptid olmayan bileşenler ve biyoaktif aminler gibi farmasötik özelliğe sahip birçok maddeden oluşmaktadır (Rady ve ark., 2017). Arı zehirinin %88'ine yakını su oluşturmaktadır (Krell, 1996). Diğer kısımda ise başta fosfolipaz A2, fosfolipaz B, hyaluronidaz, α -glukosidaz, asit fosfomonoesteraz olmak üzere beş temel tip enzim, melittin, apamin, MCD, sekapin, tertiapin, adolapin gibi peptidler, aktif aminler, aminoasitler, şekerler, lipidler, mineraller ve uçucu bileşikler bulunmaktadır (Altıntaş ve Bektaş, 2019; Hossen ve ark., 2016; Kelle, 2007). Çizelge 1.1'de arı zehiri bileşimindeki içerikler verilmiştir.

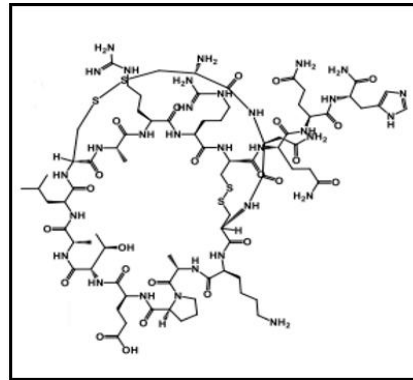
Çizelge 1.1. Arı zehiri bileşimindeki maddeler (Altıntaş ve Bektaş, 2019; Hossen ve ark., 2016; Kelle, 2007).

Molekül tipi	Bileşen	Zehirin kuru ağırlığı başına yüzdesi
Peptidler	Melittin F ve Melittin türevleri	40-50
	Apamin	1-3
	Mast hücreleri degranülasyon peptidi	1-2
	Sekapin	0,5-2
	Tertiapin	0,1
	Adolapin	1
	Proteaz İnhibitörleri	0,8
	Prokamin A, Prokamin B	1,4
	Minimin ve Kardiopeptin	13-15
Enzimler	Fosfolipaz A2	10-12
	Hyaluronidaz	1-3
	Asit fosfomonoesteraz	1
	Glukozidaz	0,6
	Lizofosfolipaz	1
Aktif Aminler	Histamin	0,6-1,6
	Dopamin	0,13-1
	Norepinefrin	0,1-0,5
Aminoasitler	α -aminoasitler	1
	Aminobutirik asit	0,4
Şekerler	Glukoz, Fruktoz	2
Lipidler	6-Fosfolipidler	4-5
Mineraller	P, Ca, Mg	3-4
Uçucu Bileşikler		4-8

Arı zehiri; antiinflamatuvar, antiartrit, antikanser, antibakteriyel, antifungal, antiviral etkilere, yara iyileşmesi üzerine ve metabolik etkilere sahip olup, immun sistem ve sinir sisteminde hemostazın sürdürülmesinde rol oynamaktadır (Altıntaş ve Bektaş, 2019; Bektaş ve ark., 2016; Hwang ve ark., 2015). Geleneksel tıpta uzun

yıllardır kullanılmakta ve Doğu Asya’da bir tedavi modeli olarak kabul görmekte, antiinflamatuvar ve antiromatik etkileri sayesinde ağrının hafifletilmesi ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkların tedavi edilmesinde kullanılmaktadır (Hwang ve ark., 2015; Kwon ve ark., 2001; Waheed ve ark., 2019).

Zehirin biyoaktif bileşenlerinden biri olan apamin, arı zehirinin kuru ağırlığının %2-3’ünü oluşturan 18 aminoasite ve iki disülfid bağına sahip bir peptittir (Gu ve ark., 2020; Habermann, 1972). Melittinin aksine oldukça spesifik bir etki şekline sahiptir. Apamin, temel olarak merkezi sinir sistemi üzerinde etkili olup bir allosterik inhibitör gibi davranan düşük kondüktanslı Ca^{+2} ile aktive olan K^{+} kanallarını inhibe eden, selektif bir blokördür (Gu ve ark., 2020; Moreno ve Giralt, 2015). İletkenliklerine göre; büyük, orta ve küçük olmak üzere üç gruba ayrılan bu kanallar yalnızca hücre içi Ca^{+2} artışı ile aktive olmakta, sinir, epitelial ve iskelet kası hücreleri ve T lenfositler gibi birçok hücrenin uyarılabilirliğinin ve işlevlerinin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Wei ve ark., 2005). Kas hücre zarlarında seçici ve güçlü şekilde potasyum geçirgenliğini etkilemekte, yüksek dozlarda ise kas spazmlarına ve solunum yetmezliğine neden olmaktadır (Pascoal ve ark., 2019). Şekil 1.4’de apaminin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Apaminin kimyasal yapısı (El-Seedi ve ark., 2020).

Yapılan bir çalışmada, HaCaT, insan keratinosit hücrelerine 0,1; 0,5; 1; 2 ve 4 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda apamin uygulanmış, iki farklı inkübasyon süresi sonunda hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. 24 saat sonunda 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda hücre canlılığı değişmezken, 2 ve 4 $\mu\text{g/mL}$ ’de hücre canlılığının

azaldığı, 48 saat sonunda 0,1 µg/mL hariç tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı belirtilmiştir. Apaminin doza bağlı, proinflamatuvar sitokinleri (IL-1β ve IL-6) artırdığı, 0,5 µg/mL ve üzeri konsantrasyonda proinflamatuvar sitokinlerin artışına neden olarak inflamasyona yol açabileceği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2017).

Güçlü bir antiinflamatuvar ajan olma özelliğine sahip olan, peptidlerden biri olan MCD peptidi 22 aminoasitli, apamine benzer yapıya sahip, katyonik bir peptittir (Moreno ve Giralt, 2015). Biyolojik etkilerinin iki disülfid bağı ve güçlü bazik karaktere sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu peptid, doğal histamin salgılayıcılardan biri olarak bilinmektedir. Çok düşük dozlarda dahi histamin salınımına neden olduğu belirtilmiştir (Buku ve Price, 2001).

Adolapin, 1980'li yıllarda arı zehirinden ilk izole edilen peptittir (Abdela ve Jilo, 2016). Antiinflamatuvar özelliğinin yanı sıra bir siklooksijenaz inhibitörü olarak prostaglandin sentezini engelleyerek ağrı kesici etki gösterdiği ve diğer steroid olmayan analjeziklere benzer şekilde antipiretik etkili olduğu ayrıca fosfolipaz A2 aktivitesini engelleyici özellikte olduğu belirtilmiştir (Shkenderov ve Koburova, 1982).

Arı zehiri bileşiminde bulununan enzimlerden fosfolipaz A2 zehirin kuru ağırlığının %10-12'sini oluşturan, düşük moleküler ağırlığa ve güçlü immunojenik potansiyele sahip bir enzimdir (Leandro ve ark., 2015; Ownby ve ark., 1997). Fosfatidilkolinlerin, fosfatidiletanolaminlerin, fosfatidilinozitollerin ve fosfatidilserinlerin akil bağlarını hidrolize ederek, membran bütünlüğünü bozmakta, kalsiyuma bağlı bir enzim olarak girdiği reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler, inflamasyona, çeşitli hücrelerde immun sistemi uyarıcı ya da sitotoksik etkiye neden olabilmektedir (Moreno ve Giralt, 2015; Ownby ve ark., 1997). Diğer bir enzim olan hyaluronidazın ise allerjen özellikte olduğu bilinmektedir (Pacáková ve ark., 1995).

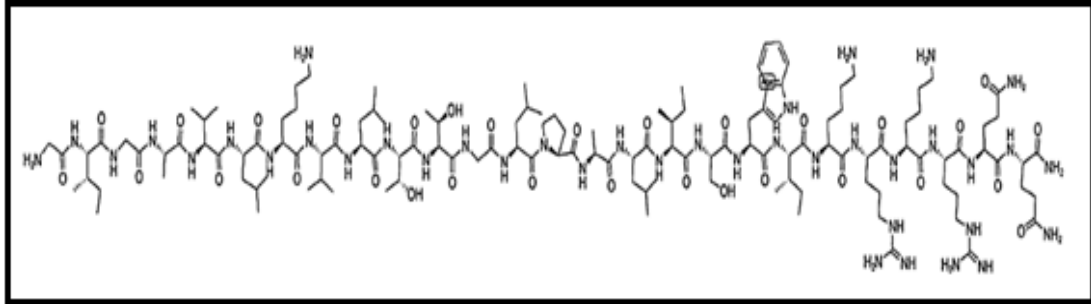
Arı zehirinin kuru ağırlığının büyük bir kısmını oluşturan melittin, zehirin ana bileşenlerinden biri olup, biyolojik, farmakolojik ve toksikolojik olarak aktif ve

hemolitik, antibiyotik, antifungal, antitümör özelliğe sahiptir (Abdela ve Jilo, 2016; Jamasbi ve ark., 2016).

1.3.3. Melittin

1.3.3.1. Moleküler Yapısı

Arı zehirinin peptid içeriğinin büyük kısmını, toplam kuru ağırlığın %40-50'sini, melittin oluşturmaktadır (Yao ve ark., 2019). Melittin, hücre zarı ile etkileşime girip zarı parçalayabilen ve böylece canlı hücreler üzerinde çeşitli etkilere neden olabilen bir peptittir (Terra ve ark., 2007). Arı zehirinin bileşiminde bulunan diğer peptidler gibi güçlü bazik özelliktedir (Habermann, 1972). Suda çözünür ve +4 yüklü hidrofobik N terminal bölge ile +2 yüklü hidrofilik C terminal bölgeye sahiptir (Yao ve ark., 2019). Şekil 1.5' de melittinin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Melittinin kimyasal yapısı (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2013).

Polar ve apolar yan zincirlerin dağılımına göre; hidrofobik NH₂- terminal bölgesi, hidrofobik ve hidrofilik yüzlerin oluşturduğu merkezi bir bölge ve hidrofilik C-terminal bölgesi olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır ve 26 aminoasitten oluşan, Gly- Ile- Gly- Ala- Val- Leu- Lys- Val- Leu- Thr-Thr- Gly- Leu- Pro- Ala- Leu- Ile- Ser- Trp- Ile- Lys- Arg- Lys- Arg- Gln- Gln aminoasit sekansına sahiptir (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2013; Terwilliger ve Eisenberg, 1982; Tosteson ve ark., 1985). Farklı ortamlarda çeşitli konformasyonlarda bulunabilmektedir. Suda; konsantrasyon, pH ve iyonizasyona bağlı olmakla birlikte monomer veya α -helikal tetramer olarak,

bulunabilirken organik çözücülerde helikal monomer yapıda bulunur (Iwade ve ark., 1998). Alfa helikal tetramer konformasyonu yüksek pH, tuz, asit veya peptid konsantrasyonlarında oluşur (Othon ve ark., 2009). Zehir bezlerinde tetramerik melittin baskındır. Lipid tabakalarda genellikle tetramerik formda aktiftir (Jamasbi ve ark., 2018).

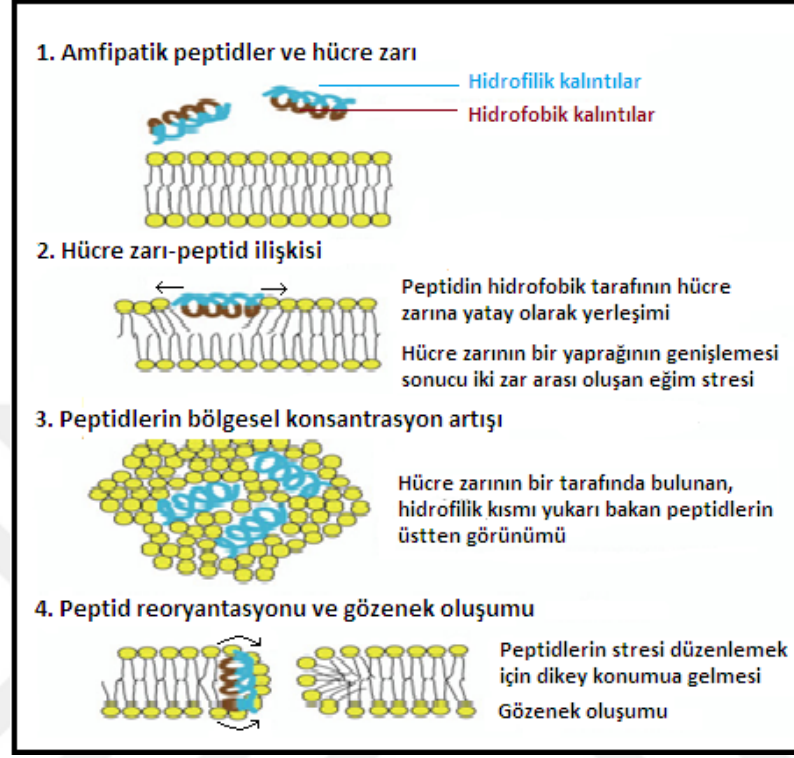
1.3.3.2 Farmakolojik Özellikleri

Melittin güçlü hemolitik etkiye sahip bir peptid olup, 1 µg/mL ve daha yüksek dozlarda eritrositlere bağlanmakta ve hemoglobinin hücre dışı sıvıya salınımına neden olmaktadır. Litik aktivitesini hücre zarı fosfolipid tabakalarını etkileyerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Hücre zarının yapısını fiziksel ve kimyasal olarak bozarak zar geçirgenliğini arttırmakta, fosfolipidlerin akil gruplarının bozulmasına, fosfolipid hidrolizine duyarlılığın artmasına ve fosfolipidlerden salınan araşidonik asit ile prostoglandin sentezinin artmasına neden olmaktadır (Ağan ve Kekeçoğlu, 2020; Dempsey, 1990; Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2013).

Melittinin sitotoksik özellikte bir peptid olduğunun bilinmesine rağmen tedavi edici özelliğine de değinen birçok çalışma yapılmıştır (Memariani ve ark., 2020). Antibakteriyel (Jamasbi ve ark., 2018), antifungal (Do ve ark., 2014), antiviral (Wachinger ve ark., 1998), antiparaziter (Lee ve ark., 1996) etkilere sahip olduğu bilinen bu peptidin, antitümoral etkisinin kanser tedavisindeki terapötik potansiyeline de odaklanılmış, antikanserojenik etkisi çeşitli araştırmalar sonucunda bildirilmiştir (Chang ve ark., 2022; Mansour ve ark., 2021; Qi ve ark., 2022).

Antimikrobiyal peptitler katyonik ve amfipatik karaktere sahip olup anyonik karakterli mikrobiyal membranlar ile etkileşime girmekte ve membran bütünlüğünü bozarak, bakteri, mantar, parazit ve bazı virüslerin inaktive olmasına neden olmaktadır (Tomasinsig ve ark., 2004). Amfipatik α -sarmal peptidler tarafından gözenek oluşum basamaklarının dört aşamada olduğu varsayılmaktadır (Kuwana,

2018). Şekil 1.6’da α -sarmal peptidler tarafından olası gözenek oluşum basamakları gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Amfipatik α -sarmal peptidlerin olası gözenek oluşturma basamakları (Kuwana, 2018).

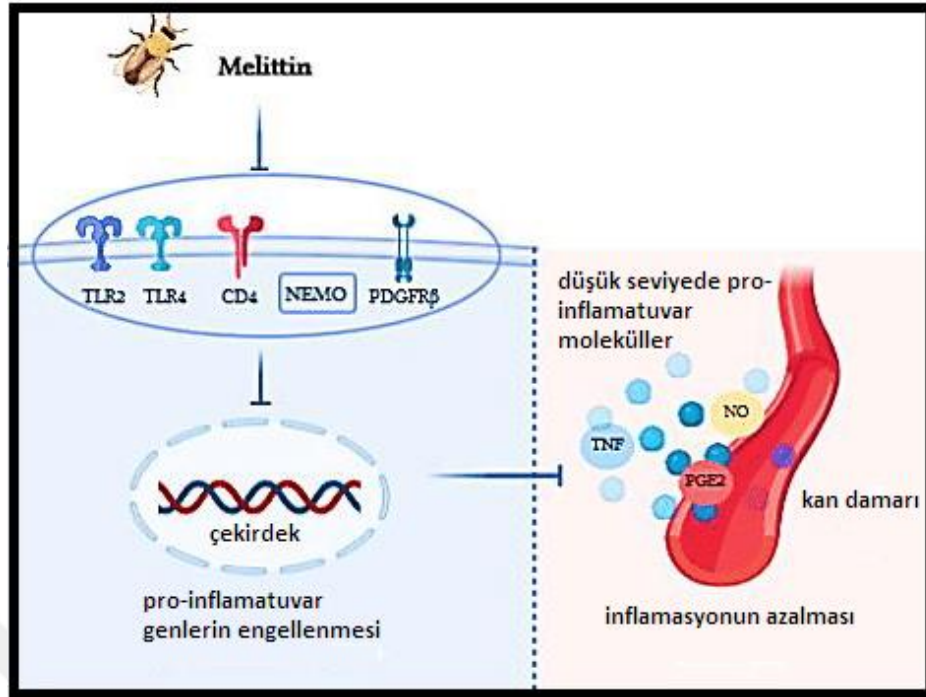
Antimikrobiyal bir peptid olan melittin memeli hücreleri için sitotoksik etkili olmasının yanı sıra güçlü bir antibakteriyel ajan olma özelliği de taşımaktadır (Oren ve Shai, 1997; Paray ve ark., 2021). Antiinflamatuvar bir ajan olarak kortizolden 100 kat daha güçlü etkili olduğu belirtilmiştir (Cao ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada arı zehiri ve melittinin penisilin dirençli *Staphylococcus aureus*’a karşı antibakteriyel etki gösterdiği, melittine gram pozitif bakterilerin, gram negatif bakterilerden daha çok duyarlı olduğu bildirilmiştir (Fennell ve ark., 1968). Yapılan bir başka çalışmada sekropin-melittin hibrit proteinleri yapay olarak tasarlanmış ve bu hibrit proteinlerin *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* ve *Salmonella derby*’e karşı güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Cao ve ark., 2010). Farklı bal arısı türlerinin antimikrobiyal özelliklerini belirlemek için disk diffüzyon yönteminin kullanıldığı bir çalışmada ise farklı ırklara ait bal arısı zehirlerinin çalışmada kullanılan tüm suşlara (*P. aeruginosa*, *Candida albicans*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B.*

subtilis, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*) karşı farklı düzeylerde antimikrobiyal etkinliğinin olduğu belirlenmiştir (Surendra ve ark., 2011).

C. albicans ile yapılan bir çalışmada melittinin hücre ölümünde rol oynayan hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) üretimine neden olduğu, mitokondriyal membran potansiyelini bozduğu, endoplazmik retikulumlardan Ca^{+2} salınımına neden olarak mitokondride birikime neden olduğu, mitokondriyal membran potansiyelini düşürdüğü gösterilmiştir. Melittinin, metakaspazı aktive ettiği, mitokondri ve kaspaza bağımlı apoptotik yolda rol oynadığı ve bu membran bozucu, apoptotik etkileri sayesinde antimikrobiyal özellikte olduğu gösterilmiştir (Lee ve Lee, 2014), *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada ise melittinin gen ifadesinde değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir (López-García ve ark., 2010).

Melittinin antiviral etkinliği üzerine yapılan bir çalışmada, melittin ve sekropinin doza bağlı, İnsan Bağışıklık Yetmezliği virüsüne (HIV) karşı inhibitör etki gösterdiği, anti-HIV aktivitesinin hücresel veya viral membranların parçalanmasından kaynaklı olmadığı, diğer gen ekspresyonları etkilenmediği halde HIV gen ekspresyonunun seçici olarak inhibe edildiği belirtilmiştir (Wachinger ve ark, 1998). Bir başka çalışmada ise melittine karşı Junin virüsün Herpes Simpleks Virüs-1 ve 2'ye (HSV-1 ve 2) göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Matanic ve Castilla, 2004).

Melittinin antiinflamatuvar özelliği, toll benzeri reseptör (TLR) 2 ve 4, yüzey farklılaşma antijeni 14 (CD14) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptör β 'nın (PDGFR β) bloke edilmesi gibi çeşitli mekanizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Tüm bu yollar inflamatuvar sitokinler, tümör nekrozis faktör (TNF), nitrik oksit (NO) veya prostaglandin E2 (PGE2) gibi proinflamatuvar moleküllerin hücre dışı ortama veya kan damarlarına geçmesine neden olur. Dokularda inflamatuvar etkiye neden olan bu moleküllerin melittin tarafından üretiminin engellenmesi antiinflamatuvar etki oluşturmaktadır (Carpena ve ark., 2020). Şekil 1.7'de melittin tarafından oluşturulan antiinflamatuvar etki mekanizması gösterilmiştir.



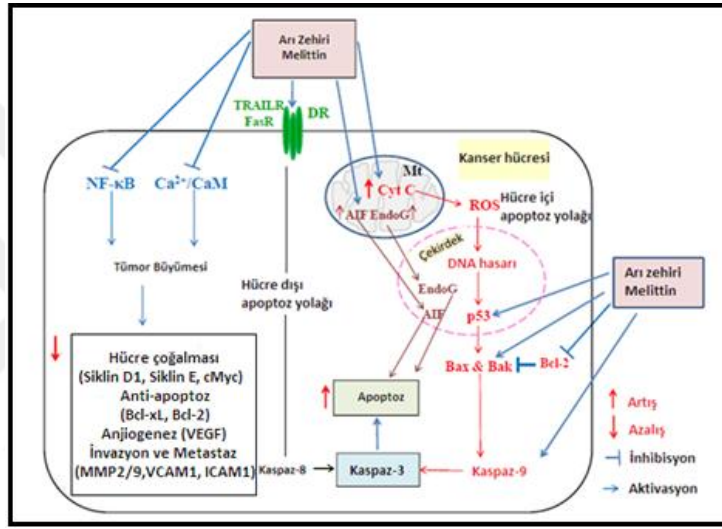
Şekil 1.7. Melittinin antiinflamatuvar etki mekanizması (Carpene ve ark., 2020).

Multiple skleroz ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisi ve ağrının hafifletilmesinde arı zehirinin antiinflamatuvar özelliğinden yararlanılmaktadır (Lee ve Bae, 2016). Yapılan bir çalışmada, inflamatuvar reaksiyonlarla karakterize, arter duvarı ve kan bileşenleri arasında kompleks etkileşim içeren ve çevresel faktörlerden etkilenen bir hastalık olan aterosklerozun oluşturulduğu deney hayvanı grubunda 0,1 mg/kg melittinin periton içi enjeksiyon ile verilmesi sonucu ateroskleroz gelişiminde majör risk faktörü olan yüksek serum kolesterol ve trigliserit düzeyinde azalma meydana geldiği ve aterosklerotik lezyonlarda azalma gözlemlendiği belirtilmiştir (Kim ve ark., 2011).

1.3.3.2.1. Antikanserojenik Etki

Arı zehirinin antitümör özelliğinin melittin peptidi ile ilişkili olduğu, melittinin normal hücreler üzerinde de sitotoksik etki göstermesine rağmen tümör hücrelerine karşı toksik etkisinin daha belirgin olduğu bilinmektedir (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2013; Memariani ve ark., 2019). Arı zehiri ve ana bileşeni melittinin,

kanser hücre büyümesini ve/veya proliferasyonunu engelleyerek; apoptoza neden olarak (Liu ve ark., 2016); malign hücrelerin birincil tümörden ayrılarak yeni tümör odakları oluşturmak üzere uzak bölgelere yayılarak çoğalmasını içeren bir süreç olarak tanımlanan metastazı (Poste ve Fidler, 1980) baskılayarak; hücre döngüsünü, çeşitli sinyal moleküllerini ve düzenleyici yolları içeren antikanser süreçlerini etkileyerek antikanser etki gösterdiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2016). Şekil 1.8’de arı zehiri ve melittin tarafından oluşturulan antikanser etki mekanizmaları gösterilmiştir.



Şekil 1.8 Arı zehiri ve melittinin antikanser etki mekanizmaları (Khalil ve ark., 2021).

Melittinin antitümör özelliği ilk kez güçlü bir kalmodulin inhibitörü olarak, insan lösemi hücrelerinin büyümesini ve klonojenitesini engellediğini gösteren çalışma ile bildirilmiştir (Hait ve ark., 1985). Son yıllarda yapılan çalışmalarla da farklı kanser hücre tipleri üzerinde melittinin antikanser aktivitesinin bulunduğu belirlenmiştir (Jo ve ark., 2012; Park ve ark., 2011; Soliman ve ark., 2019).

İnsan meme adenokarsinom, MCF-7, hücre hattıyla yapılan bir çalışmada arı zehirinin neden olduğu apoptozun moleküler mekanizmaları araştırılmış, arı zehirinin hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına, cyt-c salınımına, kaspaz 9 düzeyinin artışına neden olduğu ve apoptoza yol açtığı, reaktif oksijen gruplarının üretimini etkilediği belirlenmiştir (Ip ve ark., 2008).

Prostat kanser hücreleri, LNCaP, Du145 ve PC-3, ile yapılan bir çalışmada arı zehiri ve melittinin antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltırken proapoptotik proteinleri artırdığı, nükleer faktör $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) aktivasyonunu baskıladığı ve böylece prostat karsinom hücrelerinin büyümesini engellediği gösterilmiştir (Park ve ark., 2011).

Yapılan bir çalışmada arı zehiri ve NK-92MI katil hücrelerinin akciğer kanser hücrelerinde, A549 ve NCI-H460, çeşitli apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyonları üzerine etkileri araştırılmış, Bcl-2 ilişkili x protein (Bax), kaspaz 3, kaspaz 8'in seviyeleri artarken, B hücreli lenfoma'nın (Bcl-2) azaldığı, DR 3, DR 6 ve Fas gibi ölüm reseptörü proteinlerinin ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. IC50 değerleri A549 ve NCI-H460 hücreleri için sırasıyla 3,6 ve 3,3 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur (Kollipara ve ark., 2014).

Yapılan başka bir çalışmada arı zehiri ve melittinin insan ovaryum kanser hücrelerinde, SKOV3 ve PA-1, ölüm reseptörü (DR) ekspresyonunu artırması ve hücre gelişimi üzerine etkileri çalışılmıştır. 1-5 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında ki arı zehirinin ve 0,5–2 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında ki melittinin her iki hücrede de doza bağlı apoptotik hücre ölümüne neden olarak hücre gelişimini engellediği belirtilmiştir. Her iki hücrede de DR 3 ve DR 6 ekspresyonunun arttığı, DR 4 ekspresyonunun ise yalnız PA-1 hücrelerinde arttığı bildirilmiştir (Jo ve ark., 2012).

İran bal arılarından HPLC yöntemi kullanılarak analiz edilen melittin ile insan mide adenokarsinoma, AGS, hücre hattında yapılan bir çalışmada ve melittinin doz ve zamana bağlı sitotoksik etki oluşturduğu, 1 $\mu\text{g/mL}$ ve üzeri dozlarda kanser hücrelerinde nekrotik hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Mahmoodzadeh ve ark., 2015).

Yapılan bir başka çalışmada melittinin SGC-7901, insan gastrik kanser hücrelerinde, hücre büyümesini güçlü şekilde engellediği, mitokondri aracılı yol ile apoptoza neden olduğu, cyt-c, endonükleaz G ve apoptoz indükleyici faktör (AIF)

miktarını arttırdığı belirtilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kaspaz-3 aktivitesinin kanser hücrelerinde daha fazla olduğu bildirilmiştir (Kong ve ark., 2016).

1.3.4. Arılardan Zehirin Toplanması

Uzun yıllardır bal arılarının istenilen bölgeyi doğrudan sokması sağlanarak tedavi amacıyla kullanıldığı bilinmekte, zehir keselerinin cerrahi olarak çıkartılması ya da zehir boşalana kadar sıkılması yoluyla da zehir elde edilebilmektedir (Altıntaş ve Bektaş, 2019; Çaprazlı ve Kekeçoğlu, 2021; Krell, 1996). Elektroşok yöntemi 1960'lı yıllardan itibaren geliştirilmeye başlanmış ve günümüzde arı zehiri toplanmasında kullanılan standart metodu oluşturmuştur. Arının ırkına, yaşadığı bölgenin iklim ve coğrafi koşullarına ve zehirinin toplanmasında kullanılan yöntemeye göre arı zehirinin bileşiminde farklılıklar oluşabilmektedir (Krell, 1996).

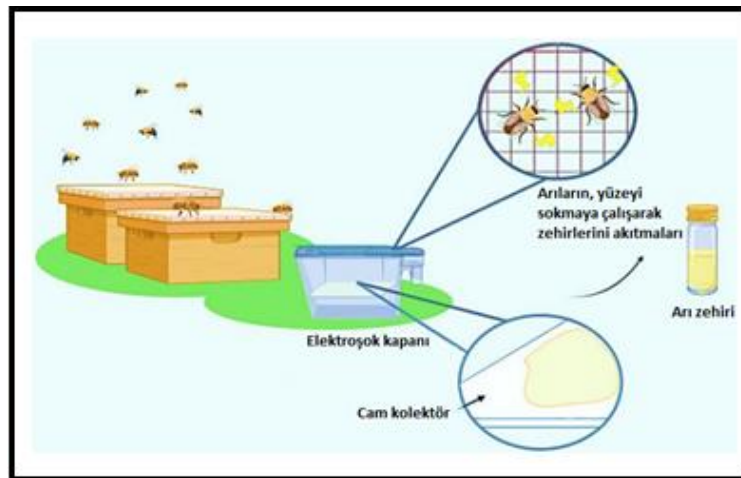
Arılar zehirlerini düşmanlarına karşı kolonilerini koruma amacı ile kullandıkları için kovana aralıklı şekilde verilen elektrik akımını da bir dış tehdit olarak algılayan bal arılarından elektrik uyarısı ile zehir toplama temeline dayanan birçok farklı cihaz geliştirilmiştir. Bu yöntemi ilk olarak kullananların; 1954 yılında, Alman araştırmacılar Markovic ve Molnar olduğu, kullandıkları cihazda silindirler, elektrik iletecek teller ve bu tellerin altında plastik veya filtre kâğıdı gibi materyallerin bulunduğu bilinmektedir. Bu düzenekte arılar zehirlerini filtre kağıdına bırakırken plastik yüzeye de iğnelerini bırakarak ölmektedir (Benton ve ark., 1963; Çaprazlı ve Kekeçoğlu, 2021; Kelle, 2007).

Günümüzde de bal arılarından zehir toplama işlemi için kullanılan yöntemlerden biri elektroşok yöntemi olup cam levha ve elektrik tellerinin bulunduğu bir aletten yararlanılmakta, arılar elektrik tellerine dokundukları sırada hafifçe uyarılmakta ve cam levhayı sokmaya çalışarak zehirlerini akıtmaktadır.

Zehir, levha yüzeyinde kurumakta ve kazınarak toplanabilmektedir (Arıgöl Apan ve ark., 2021).

Geçmişten günümüze bu arı zehiri toplama cihazları sürekli geliştirilmiştir. Bu cihazlarda bulunması gereken özellikler; 50-1000 Hz, iki veya üç saniye süreli, üç veya altı saniye duraklamalı elektriksel uyarıya; 25V, 1200 Hz güç veya doğrudan elektrik şebekesine takılarak çalışabilen bataryaya; birbirinden üç veya dört mm uzaklıkta bulunan tellerden oluşan bir yüzeye ve zehirin akıtılacağı cam yüzeye sahip olması şeklinde belirtilmiştir. Ayda üç veya dört kez ve üç saat aralıklarla yapılan toplama işlemi ile toplama esnasında arılar zarar görmemekte ve toplamda yaklaşık dört g kuru arı zehiri elde edilebilmektedir (Bogdanov, 2016; de Graaf ve ark., 2021).

Kovan içine yerleştirilen toplayıcıların kovan üzerine yerleştirilen toplayıcılara kıyasla daha fazla sayıda arı ile temas halinde olduğu düşünüldüğünde, kovan içindeki toplayıcıların yüksek miktarda zehir toplama kapasitesine sahip olabileceği; koloninin tamamının kovan içerisinde bulunduğu akşam saatlerinde toplanan zehir miktarının gündüze kıyasla daha yüksek olduğu düşünülmekte, zehirin toplanmasında en yüksek miktarın yaz ve sonbahar aylarında olduğu bilinmektedir (Çaprazlı ve Kekeçoğlu, 2021; de Graaf ve ark., 2021). Elektroşok yöntemi ile arıların elektrik akımına maruz kalmaları ve zehirlerini akıtmaları şekil 1.9'da gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Elektroşok yöntemi (Carpena ve ark., 2020)

1.3.5. İçerik Tayini

Arı zehirinin karakterizasyonunun belirlenmesi için protein reaksiyonları ve ayrıştırma tekniklerine dayalı kimyasal yaklaşımlar ve biyolojik testlerinde olduğu birçok yöntem tanımlanmıştır (Pacáková ve ark., 1995). HPLC, kütle spektrometri (MS), kapillar elektroforez (CE), Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı (MALDI-TOF), ultra performans sıvı kromatografisi (UP-LC), Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) analitik ve ileri analiz yöntemleri bunlardan bazılarıdır (Haghi ve ark., 2013; Şirin ve ark., 2016).

Literatürde HPLC analiz yöntemi kullanılarak farklı arı zehirlerinin içerik tayinlerinin yapıldığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada iki farklı bal arısından toplanan zehirinin temel bileşenlerinin analizi HPLC analiz yöntemi kullanılarak yapılmış, apamin, MCD peptid, fosfolipaz A2 ve melittin standart çözeltileri hazırlanmış ve tüm örnekler ultrasonik banyoda beş dk tutularak 0,45 µm membran filtrelerden geçirilmiştir. C8 6,5 µm, 4,6x100 mm kolon kullanılarak, mobil faz akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 40 µl olarak belirlenmiş, ayırma sıcaklığı 25°C de tutulmuş ve analiz 220 nm’de izlenmiştir (Kokot ve ark., 2009).

Arı zehiri bileşenlerinden MCD peptidin yapısal analizi ve izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla yapılan bir başka çalışmada RP- HPLC analiz yöntemi ve jel geçirgenlik kromatografisi kullanılarak çalışılmış, C18, 25 cmx4,1 mm analitik ve C18, 25 cmx10 mm özelliklere sahip hazırlayıcı kolonlar kullanılmış, analiz 230 nm’de izlenmiştir (Dotimmas ve ark., 1987).

HPLC ile bal arısı zehiri ve zehiri içeren ilaç ürünlerinde bulunan melittinin kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildiği bir çalışma ise Fotodiod Dizi Dedektörü (PDA), C18 kolon (250x4,6 mm, 5µm) kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 20 µl olarak belirlenerek analiz yapılmıştır (Haghi ve ark., 2013).

Analitik metodlarda etkili yöntem geliştirme ile laboratuvardaki kaynakların optimizasyonu ve doğrulanmış bir analitik metod ile güvenilir, tutarlı doğru verilerin elde edilmesi sağlanır (Singh, 2013; Paithankar, 2013). Metotda oluşabilecek problemleri en az seviyeye indirmek için, metod geliştirme esnasında uygun validasyon deneyleri gerçekleştirilmelidir (Green, 1996). Validasyon, bir analitik metodun istenilen amaca uygun olduğunu gösteren analitik bir prosedürdür (Paithankar, 2013). Validasyonda göz önünde bulundurulması gereken parametreler aşağıda belirtilmiştir (ICH, 2005).

- Doğruluk
- Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Ara kesinlik
- Seçicilik
- Algılama sınırı
- Tayin Sınırı
- Doğrusallık
- Aralık

1.3.5.1. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk; analitik bir işlemde hesaplanan değerle referans değerinin yakınlığıdır (ICH, 2005). Doğruluk, o yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değere yakınlığı olarak da ifade edilmektedir (Dally ve Monck, 2020). Doğruluk için gerçek değer birden fazla yöntem kullanılarak elde edilebilir. Bu yöntemler; yöntemin sonuçlarını, yerleşik yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmak veya doğruluğundan emin olunan konsantrasyonlara ait örneklerle çözümlenerek kontrol edilmesidir (Söğüt Ertaş ve Kayalı, 2005).

1.3.5.2. Kesinlik (Precision)

Bir analitik yöntemin kesinliği herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine olan yakınlığının bir derecesi olarak tanımlanmaktadır (Söğüt Ertaş ve Kayalı, 2005). Üç ayrı başlık altında incelenmektedir.

Tekrarlanabilirlik (repeatability), kısa bir zaman aralığı içinde aynı şartlar altında gerçekleştirilen metodun sonuçlarıken, ara kesinlik (intermediate precision) gün, analist, ekipman farklılığı gibi etkenler, laboratuvara bağlı değişkenler nedeni ile oluşan sonuçlardır. Yeniden üretilebilirlik (reproducibility) ise, laboratuvarlar arası analizler ile elde edilebilen kesinlik değeridir (Paithankar, 2013).

1.3.5.3. Seçicilik

Seçicilik, ölçüm sırasında interferanların varlığında analiti doğru şekilde ölçebilme yeteneği olarak tanımlanmıştır (Thompson ve ark., 2002). Test ile analizi yapılan maddelerin matriksten doğru olarak ölçümünün yapılıp yapılamadığının belirlenmesidir. Bunun için kullanılan yöntem, matriks içinde var olan madde ve/veya maddeye ait metabolitlerin belirlenebilmesi için yeterli kapasiteye sahip olmalıdır (Kafalı, 2008).

1.3.5.4. Doğrusallık (Linearity)

Kullanılan analitik yöntemin doğrusallığı, numunelerde bulunan analit konsantrasyonu ile elde edilen sonucun orantılı olmasının bir ölçüsüdür (Shabir, 2003). Doğrusallık çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer alması olup doğrusallıkla ilgili parametreler eğim, kesişim ve korrelasyon katsayısıdır (Altınsoy, 2010).

1.3.5.5. Aralık

Bir analitik yöntemin aralığı, prosedürün kesinlik, doğruluk ve doğrusallık özelliklerine sahip olduğunun gösterildiği numunedeki analitin alt ve üst konsantrasyonları arası aralıktır (Paithankar, 2013).

1.4. Kanser

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde iç ve dış faktörlerin etkisiyle oluşan değişiklikler DNA hasarı olarak bilinmektedir (Onur ve ark., 2009). Hücre, DNA ve genlerinde oluşan değişiklikler sonucunda kontrolsüz olarak bölünmekte ve yeni bir oluşum meydana gelmektedir. Komşu dokulara ve uzak organlara da yayılabilen bu anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılma özelliğine sahip olmasıyla ortaya çıkan büyük bir grup hastalığa ise kanser adı verilmektedir. Kanser hastalığının oluşumunda kontrolsüz çoğalma tek başına yeterli olmamakta hücrenin invazyon ve metastaz gibi özelliklere de sahip olması gerekmektedir (Aliustaoğlu, 2009).

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşumu olarak tanımlanan anjiyogenez organizmanın bütünlüğü ve dengesinin korunması ve sürdürülmesinde önemli bir fizyolojik rol oynamaktadır. Tümörlerde oluşması gibi bazı durumlarda patolojik olabilmekte ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır (Konukoğlu ve Turhan, 2005). Bu yeni kan damarlarının oluşumu, tümör gelişimi, proliferasyonu ve metastazı için gerekli olup bu süreçte önemli uyarıcılardan biri olan damar endotelial büyüme faktörü (VEGF) protein ekspresyonunun melittin tarafından inhibe edildiği ve melittinin potansiyel bir antianjiyogenik etkiye sahip olduğu yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (Shin ve ark., 2013; Tobelem, 2007).

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis, normalde, gelişim ve yaşlanma sırasında hemostatik bir mekanizma olarak dokulardaki hücrelerin

devamlılığını sağlamaktadır. İmmun reaksiyonlar sonucu, hastalık durumu veya zararlı ajanlar tarafından hücrelerin hasar görmesi gibi durumlarda bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır (Elmore, 2007). Apoptozis hücrelerde primer veya bir uyaran sonucu sekonder olarak gelişebilmektedir. Apoptozis sürecinde iyon kanalları, Bcl-2 ailesi üyeleri, kaspazlar, mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK), kaskad proteinler, mitokondriyal ve hücre içi sinyal yolları, protein-53 (p-53), c-myc ve Bcl-xl ailesi rol oynamaktadır (Akşit ve Bildik, 2008; Hennessy, 2016; Kartlaşmış ve ark., 2016; Kondratskyi ve ark., 2015; Schultz ve Harrington, 2003).

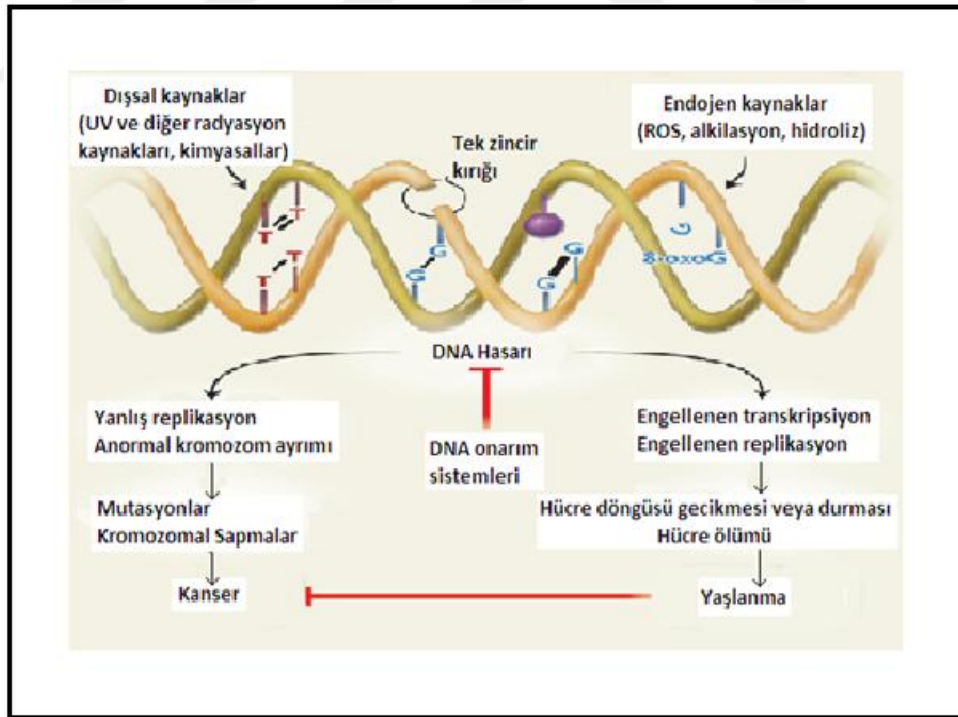
Hücrel bir çok olayda p53 proteini görev almaktadır. Bunlar; DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın oluşması, kromozom ayrılmasının ve gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve apoptozdur. Bu aşamalarda dolaylı ya da direkt olarak görev almaktadır. (Koçak ve ark., 2011). Apoptoz sürecinde direkt ve indirekt olarak Bcl-2 ailesi proteinlerinin aktivitesini düzenlemektedir (Hemann ve Lowe, 2006).

Sistein aspartat spesifik proteaz olarak tanımlanan bir protein ailesi olan kaspazlar ilk sentezlendiklerinde zimojen yapıda (prokaspaz) bulunmaktadır. Apoptozun indüklenmesinin ardından aktif kaspaz halini almaktadırlar (Kartlaşmış ve ark., 2016). Apoptoz sürecinin hem başlaması hem de apoptozun gerçekleşmesinde önemli rol oynamakta, üç farklı apoptoz yolağını aktive edebilmektedirler. Bunlar; hücre içi (mitokondriyal), hücre dışı (ölüm reseptörleri) ve hücre içi endoplazmik retikulum yoludur. Onarılmayan genetik hasar, hipoksi, şiddetli oksidatif stres gibi etkenler hücre içi mitokondriyal yolu tetiklemektedir. Bu yol mitokondriyal geçirgenliğin artması sonucu proapoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınımına neden olmaktadır. Mitokondrinin aktive olmasına neden olan faktörlerden biri olan Bcl-2 ailesi; antiapoptotik ve proapoptotik proteinlerin yer aldığı iki gruptan oluşmakta, proapoptotik proteinler apoptozu indüklerken, antiapoptotik proteinler apoptozu baskılamaktadır. Mitokondriden salınan diğer apoptotik faktörler ise AIF ve endonükleaz G'dir ve apoptozun ileri dönemlerinde

mitokondriden salınarak DNA'nın parçalanmasına neden olurlar (Kartlaşmış ve ark., 2016 Wong, 2011).

Ölüm reseptörü (hücre dışı) yolu ligandlar ve transmembran reseptörler arasındaki etkileşimler sonucu ara moleküller aracılığıyla başlatıcı kaspazların aktive olması sonucu düzenlenmektedir. Ölüm reseptörleri hücre dışından hücre içi ortama proapoptotik sinyalleri ileten TNF-R zar reseptörleri ailesidir. Bu ailenin üyeleri TNF-R1, Fas, DR 3-4-5-6'dır (Rossi ve Gaidano, 2003).

Hücre içi endoplazmik retikulum yolunun ise hipoksi, serbest radikaller gibi hücresel stres tarafından, endoplazmik retikulumun zarar görmesi sonucu oluştuğu ve mitokondriden bağımsız, kaspaz-12'ye bağlı bir yol olduğu düşünülmektedir (Lun ve ark., 2011; Wong, 2011). Şekil 1.10'da DNA hasarının kaynakları ve sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 1.10. DNA hasarının kaynakları ve sonuçları (Hoeijmakers, 2009)

Gelişmiş ülkelerde kanser nedenli ölümlerin oranı tüm ölümlerin %25'i olup kanserden kaynaklı ölümlerin %90'ından ise metastaz gelişimi sorumlu

tutulmaktadır (Güllü ve Akalın, 2005). Kolorektal kanser dünyada en yaygın maligniteye sahip üçüncü, mortalite bakımından ise ikinci sırada yer almaktadır ve 2020 yılında dünya çapında tahmini olarak 1,9 milyon vaka, 900 bin mortaliteye sahiptir (Xi ve Xu, 2021). Gliomalar ise en yaygın primer merkezi sinir sistemi tümörleri olup %55'ini glioblastoma multiforme oluşturmakta ve kansere bağlı ölümlerin %4'ünden sorumlu tutulmaktadır (Halatsch ve ark., 2006; Karim ve ark., 2016)

1.4.1. Kolorektal Adenokarsinoma

Kolon ve rektum adenokarsinomu, gastrointesinal sistemin en sık karşılaşılan kanseri olup, erişkinlerde oluşan tüm kanserlerin %10'unu oluşturmaktadır. Bir veya birden çok sayıda bulunabilen, kolon kanserinin öncüsü olabilen iyi huylu glandüler neoplaziler adenom olarak adlandırılmakta, hemen hemen tüm kolorektal kanserler adenomlardan gelişmekte, adenomların yaklaşık %5'i kansere dönüşebilmekte ve adenomların kansere dönüşmesinde boyutu, histolojik yapısı gibi faktörler etkili olmaktadır (Baran, 2010).

Kolorektal kanserlerin %90'ı sporadik olarak gelişmektedir. Gelişiminde birçok risk faktörü etkili olup çevresel faktörler, yaşam tarzı ve beslenme, adenomatöz polip, inflamatuvar bağırsak hastalığı, irradyasyon, alkol ve tütün bunlardan bazılarıdır (Atabilen ve Akbulut 2019; Janout ve Kollárová, 2001). Kolorektal kanserler hem kadınlarda hem de erkeklerde yaygın olarak görülen kanser türlerinden biridir (Calvert ve Frucht, 2002). Meyve ve sebze ağırlıklı ve lifli gıdalar içeren diyet ile beslenmenin kolorektal kanser gelişimi riskini azalttığı ve kanserden koruyucu özellikte olduğu bildirilmiştir (Kim ve Mason, 1996; Negri ve ark., 1998). İnflamatuvar bağırsak hastalığı öyküsü olan bireylerde kolorektal kanser gelişimi riskinin daha fazla olduğu ve hücre siklusunu etkileyebilecek sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, proteazlar ve reaktif oksijen türlerinin salınımının kanser oluşumuna neden olabileceği belirtilmiştir (Atabilen ve Akbulut, 2019; Janout ve Kollárová, 2001).

Kolon kanseri genellikle; sporadik, kalıtsal ve ailesel olarak üç farklı şekilde gözlenmektedir. Sporadik hastalık, ailevi ya da kalıtsal yatkınlık ile ilişkili olmayıp kolon kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır (Calvert & Frucht, 2002). Kalıtsal kolorektal kanserler “Familial Adenomatöz Polipozis” (FAP) sendromu ve “Hereditär Non-Polipozis Kolorektal Kanser” (HNPCC) sendromu olmak üzere, farklı genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan, iki grup olarak incelenebilir (Canda ve Terzi, 2008). Kolon kanserlerinin yaklaşık %10’undan azı genetik yatkınlık nedeniyle şekillenmektedir (Calvert ve Frucht, 2002).

Kolon kanserlerinin onkogenlerin aktive olması ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyonel inaktivasyonu ile meydana gelebileceği belirtilmiştir (Ceran ve Demirhan, 2011). Kolon tümörlerinde en çok hücre zarından mitojenik mesajların iletiminde görev yapan proteinin sentezinden sorumlu olan C-Ki-ras onkogeni ve DNA sentezi için gerekli nükleer fosfoproteini kodladığı düşünülen c-myc onkogeninin izlendiği, C-Ki-ras onkogeninde ki nokta mutasyonların kolorektal kanserlerin %39-71’inde, adenomatöz poliplerin %42’sinde olduğu belirtilmiştir (Soytürk, 2019).

Kolorektal kanserlerde üç farklı evreleme sistemi kullanılmaktadır (Akkoca ve ark., 2014). İlk patolojik evrelendirmesi Cuthbert E. Dukes tarafından 1932’de yapılmıştır. Sonraki yıllarda Aster-Coller tarafından tümör derinliği göz önünde bulundurularak Dukes klasifikasyonu modifiye edilmiştir. Şu anda ise TNM evrelemesi kullanılmaktadır. Bu evreleme American Joint Committee on Cancer (AJCC) ile Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) tarafından yapılmıştır (Büyükdoğan, 2009).

Prognozu etkileyen yaş, cinsiyet, yayılım, barsak duvarı perforasyonu, lenf nodu tutulumu gibi birçok faktör bulunmaktadır. En önemli prognostik faktör ise tümörün evresidir. Regional lenf nodlarına metastaz yapmış veya barsak duvarını aşmış invazyonu olan tümörlerde prognoz olumsuz etkilenmektedir (Akkoca ve ark., 2014; Büyükdoğan, 2009).

1.4.2. Glioblastoma Multiforme

Çoğunlukla beyinde; nöron, glial (astrosit, oligodendrosit, ependim hücreler) ya da lenfatik doku, kan damarları, kraniyal sinirler, beyin zarları, kafatası, hipofiz bezi veya epifiz bezinde ki hücrelerin anormal ve kontrolsüz hücre bölünmesi sonucu primer beyin tümörleri oluşmaktadır. Hemisferlerde, subtentorial olarak beyin sapında ve serebellumda da bulunabilirler (Krex ve ark., 2007; Lakhan ve Harle, 2009; Urbanska ve ark., 2014). Yetişkinlerde görülen beyin tümörlerinin çoğunluğu sekonder olup, bu tümörlerin primer olarak başka organda bulunan tümörlerin beyine metastazı ile oluştuğu bilinmektedir (Kheirollahi ve ark., 2015).

Primer beyin tümörlerinin yaygın görülen tipleri gliomalar ve meningiomalardır (Weller ve ark., 2015). En yaygın beyin tümörleri olan ve tüm glial kökenli tümörlerin üçte ikisini oluşturan (Riemenschneider ve Reifenberger, 2009), benign karakterde ve düşük proliferasyon özelliğine sahip olan astrositik beyin tümörleri birinci derece, yaygın infiltrasyon kapasitesine sahip düşük dereceli astrositomalar ikinci derece, anaplastik astrositomalar üçüncü derece gliomaları oluşturmaktadır. Anaplastik astrositomalar invazif özellik göstermekte, bu özellikleri nedeniyle primer ve sekonder glioblastomalar olan dördüncü dereceye dönüşebilmektedirler. Genetik ve fenotipik olarak heterojen tümör grupları içeren primer beyin neoplazması olan glioblastoma multiforme yetişkinlerde yaygın olarak görülmektedir (Goodenberger ve Jenkins, 2012; Urbanska ve ark., 2014). İnfiltratif özellikteki beyin tümörleri içerisinde en ölümcül olanı olarak düşünülmektedir (Patil ve ark., 2013). Glioblastoma multiforme'nin %90'ını primer glioblastomalar geriye kalan %10'luk kısmı ise sekonder neoplazmlar olup, sekonder olanların gelişimleri dört veya beş yıl kadar sürmektedir (Kabat ve ark., 2010; Urbanska ve ark., 2014).

Glial tümörlerin oluşumunda birçok risk faktörü bulunmaktadır. Elektromanyetik radyasyon ve iyonize radyasyon glial tümör gelişimini arttırıcı bir risk faktörüken, alerji, atopik hastalık ve sistemik enfeksiyonu olanlarda riskin azaldığı belirtilmiştir (Goodenberger ve Jenkins, 2012; Ostrom ve ark., 2014). Beyin

kontüzyonu sonucu oluşan baş yaralanmaları glioblastoma için zemin hazırlayabilmektedir (Urbanska ve ark., 2014). Primer ve sekonder glioblastomlar farklı genetik yollar ile oluşmakta, farklı moleküler profile sahip olup tedaviye farklı cevap vermektedirler (Pollo, 2011).

1.4.3. Kanser Sağaltımı

Günümüzde cerrahi yöntemler, radyoterapi ve kemoterapi kanser tedavisinde kullanılmakta, hastalığın mortalitesinin fazla olması nedeniyle daha etkili tedavi yöntemleri bulmak için de çalışmalar devam etmektedir (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2013).

Kanser sağaltımında kullanılan radyoterapi, farmakoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi ve cerrahi tedavi yöntemleri geçmişten günümüze ilerleme kaydetmiş olup, kimyasal maddelerin farmakoterapötik kullanımına ilişkin çalışmalar ve kemoterapi 20. yy başlarında, sistemik kemoterapinin ilk başarılı ve belgelenmiş kullanımı ise 1940'lı yıllarda gerçekleşmiştir (Temel, 2015; Nygren, 2001). Kanser tedavisinde 1960 yılına kadar olan süreçte cerrahi yöntemler ve radyoterapi daha çok kullanılmış, 20. yy sonu itibariyle gelinen noktada ise tedavide kullanılan kemoterapötik ilaçlar sayesinde, sağkalım oranı ve süresi önemli düzeyde artmıştır (De Vita Jr ve Chu, 2008; Temel, 2015). Tedavide kullanılan cerrahi yöntemler ile tümörlü dokuların vücuttan uzaklaştırılması hedeflenirken, kemoterapi ve radyoterapi sayesinde kanser hücreleri yok edilmektedir (Tozkoparan ve Aytaç, 2007). Antikanser ilaçların Fas ligand başta olmak üzere ölüm reseptör ligandlarının ekspresyonunu indükleyerek duyarlı hücrelerin ölmesine neden olduğu ve mitokondriden cyt-c salınımına neden olarak apoptozu tetiklediğini gösterir çalışmalar olduğu bildirilmiştir (Kaufmann ve Earnshaw, 2000).

Radyasyon tedavisi lokalize solid kanserlerin tedavisinde kullanılabilir en etkili tedavi yöntemidir (Schaue ve McBride, 2015). Geleneksel kanser radyoterapisinde amaç, kanserli dokuya komşu sağlıklı dokular için zararlı olmayan,

doz kullanılarak en fazla etkiyi sağlamaktır. Günümüzde her hücrenin DNA ve RNA gen dizilimleri, hatta yeni teknolojiler sayesinde immun sistem ve protein ekspresyonu profillerinin belirlenebilmesi sayesinde radyoterapide tedavi etkinliğini arttırmak için duyarlılık belirteçleri geliştirilebilmektedir (Chen ve Kuo, 2017),

Kanser tedavisinde 19. yy'ın ikinci yarısından itibaren günümüzde uygulama alanı olan bir yöntemde immünoterapidir. Direkt kanser hücrelerine odaklanarak normal hücrelere hasar vermeyen bir tedavi yöntemi olan immünoterapi ile vücudun kendi hücreleri uyarılabilmekte veya vücuda verilen maddelerle immün yanıt oluşması sağlanabilmektedir. Kanser immunoterapisinde kullanılan yöntemler; monoklonal antikorlar, adoptif immünoterapi, aşılar, sitokinler ve immün sistemi destekleyici tedaviler olarak belirtilmiştir (Barbaros ve Dikmen, 2015).

Kolorektal kanser tedavisi kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerle yapılabilmektedir (Karaveli ve ark., 2014). Beyin tümörlerinde ise tümörün yeri, tipi ve ulaşılabilirliğine göre tedavi yöntemleri tek başlarına ya da birkaç yöntem birlikte kullanılabilir. Cerrahi tedavide tümörün konumu, bölgenin nörolojik işlevi gibi bazı faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Kemoterapi tedavi yöntemi ise cerrahi ve radyoterapiyle kombine kullanıldığında adjuvan etkili olup kan beyin bariyeri ve tümör hücrelerinin radyoterapiye dirençli hipoksi alanlarında bulunması durumunda tedavi güçleşmektedir (Chang, 2007; Şimşek ve Dicle, 2013). Bu nedenle tedavide cerrahi rezeksiyonu sonrası kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır (Simpson ve ark., 1993).

Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahinin kombine şekilde uygulanması sağkalım oranlarında önemli bir artış sağlamaktadır (Tozkoparan ve Aytaç, 2007). Ancak kemoterapi başta olmak üzere uygulanan tedavi yöntemlerinin yan etkiler oluşturabilmesi sebebiyle doğal ürünlere olan ilgi giderek artmıştır (Ağan ve Kekeçoğlu, 2020). Bu doğal ürünler içerisinde, teröpatik değere sahip farmakolojik olarak aktif bileşenler içeren, biyotoksinler de yer almaktadır. Yapılan çalışmalarla da arı zehirinin de içinde bulunduğu birçok zehirin, içerdikleri aktif maddeler

sayesinde, kanser gelişimini ve ilerlemesini etkileyen yollar ile antitümör etki gösterdiğini bildirmiş ve böylece biyotoksinler yeni antikanser ajanların geliştirilebileceği potansiyel kaynaklar olmuştur (Liu ve ark., 2016).

Bu tez çalışması kapsamında; ülkemizin beş farklı ilinden elde edilen arı zehirlerinin HPLC metodu ile apamin, fosfolipaz A2 ve melittin bakımından içerik analizlerinin yapılması ve iki farklı kanser hücre hattına uygulanarak olası antikanserojen etkilerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ülkemizde arıcılığın yoğun olarak yapıldığı iller göz önünde bulundurularak, bu iller arasında yer alan Afyon, Ankara, Balıkesir, Denizli, Muğla illerinden elde edilen bal arısı zehirleri, kolorektal adenokarsinoma ve glioblastoma multiforme kanser hücre hatlarında çalışılmıştır. Dünyada, kanser türleri arasında yaygın görülmesi ve yüksek mortaliteye sahip olması yönüyle kolorektal adenokarsinoma hücre hattı ve kompleks yapısı nedeniyle tedavi seçenekleri oldukça kısıtlı olan, primer beyin tümörlerinin en sık karşılan türü, glioblastoma multiforme bal arısı zehirinin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Arı zehirlerinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkinliği MTT, Nötral Kırmızı ve laktat dehidrojenaz (LDH) analizleri ile test edilerek, ülkemizin farklı illerine ait arı zehirlerinin olası antikanserojen etkileri deney sonuçlarının anlamlılığına bağlı olarak değerlendirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Tez çalışması hücre kültürü deneyleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı *In Vitro* Toksikoloji Laboratuvarında yapıldı. Arı zehirlerinin içerik analizleri Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Gıda Analizleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı yapılarak gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri 21L0239011 no'lu "Türkiye'de Bulunan Arı Irklarından Elde Edilecek Arı Zehiri Bileşiminin Analizi ve Antikanserojen Etkilerinin *İn Vitro* Olarak Araştırılması" Ankara Üniversitesi BAP Öncelikli Alan Lisansüstü Tez Projesi (Doktora) bütçesinden karşılandı. Çalışmalar kapsamında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı imkanlarından yararlanıldı. YÖK 100/2000 doktora bursu "Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları" öncelikli alanı kapsamında tez çalışmaları tamamlandı.

2.1.1. Kimyasal Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal Madde Adı	Üretici Firma	Katolog Numarası
Fetal Bovine Serum	Bio. Ind.	04-121-1A
DMEM High Glucose	Bio. Ind.	01-052-1A
DMEM Low Glucose	Bio. Ind.	01-050-1A
DMEM Ham's F12 w/o L Glutamin with 15 mL HEPES	Capricorn	CP21-4109
Penicillin Streptomycine 10.000u/ mL	Bio. Ind	03-031-1B
Trypsin Edta (%0.25)	Bio. Ind	03-052-1A
L- Glutamine Solution, 29.2 mg/mL in Saline (200 millimole/liter)	Bio. Ind	03-020-1A
PBS, with calcium and magnesium	Bio. Ind	02-020-1A
DMSO	Sigma	D2438-50ML
MTT((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma	M5655
Nötral Kırmızı	Sigma	N4638
Sodyum Dedosil Sülfat, SDS	Biorad	1610301
Triton-X	Merck	M108603
Apamin	Sigma	A1289
Fosfolipaz A2	Sigma	P9279
Melittin	Sigma	M2272

2.1.2. Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
T25 cm Cell Culture Flask	Sarstedt	83.3910.002
T75 cm Cell Culture Flask	Sarstedt	83.3911.002
15 mL Falkon Tüp	Sarstedt	62.554.502
50 mL Falkon Tüp	Sarstedt	62.547.254
1 mL Serolojik Pipet, Steril	Sarstedt	86.1251.001
5 mL Serolojik Pipet, Steril	Sarstedt	86.1253.001
10 mL Serolojik Pipet, Steril	Sarstedt	86.1254.001
96 kuyucuklu Hücre Kültür Plate	Sarstedt	83.3924
2 mL Sterile Cryovial Tubes	Sarstedt	379/376-500
10 µL Sterile Dnase Rnase free Pipet Ucu	SSIBIO	NFS960-10S
200 µL Sterile Dnase Rnase free Pipet Ucu	SSIBIO	4227-00
1000µL Sterile Dnase Rnase free Pipet Ucu	SSIBIO	4337-S1
10 µL filtreli pipet ucu	BIOHIT	790011F
0.45 µm S PAT Sterile Enjektör Filtre	Sarstedt	83.1826
0.2 µm S PAT Steril Enjektör Filtre	Sarstedt	83.126.001
2 mL eppendorf tüp	Bioplastic	B71420
Neubaure hemsitometre	Marienfeld	0630010
Hücre Sayım Lamı, Hemositometre	Merck	C962010
Hücre Sayım Kiti	Biorad	JULI-BRS50

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 2.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Zehir toplama cihazı	Beesas	tuzak48001
HPLC		
VWD Dedektör		
Laminar akımlı kabin	Holten	1.8
İnvert Mikroskop	Juli BR	Juli-BR04
CO2 inkubatör	Nüve	GP217745
Su banyosu	Nüve	BM402
SpectraMax	Molecular Devices	I3x
Su arıtma cihazı	Milliporex	Synergy 185
Santrifüj	Sigma	3K30
Vortex	Biosan	Biovortex VI
Hassas terazi	SELES EHB	PFB.600-2M
Otomatik pipet (20-200 µl)	ISOLAB	7010101009
Otomatik pipet (100-1000 µL)	ISOLAB	7010101014

2.2. Yöntem

2.2.1. Arı Zehirlerinin Toplanması

Arı zehirleri; Afyon, Ankara, Balıkesir, Denizli ve Muğla illerinde yetiştiriciliği yapılan bal arılarından “Beesas arı zehiri toplama cihazı” kullanılarak, elektroşok yöntemiyle, 2021 yılı Temmuz ve Ağustos aylarında toplandı. Cihaz arılarla temas ettiğinde arılara zarar vermeyecek nitelikte ve iğnelerini kaybetmeden zehirlerini cam plakaya akıtabilecekleri özelliktedir. Elektroşok cihazı kullanılarak kovanlara elektrik akımı verilmesi (solda) ve cam yüzeyden arı zehirinin kazınması Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Arı zehirinin toplanması ve cam yüzeyden kazınması

2.2.2. HPLC Analiz Yöntemi

Arı zehirlerinin içerik analizlerinin belirlenmesi için Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Gıda Analizleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden hizmet alımı yapıldı. Arı zehiri örnekleri araştırma merkezine koyu renkli ve ışık geçirmeyecek cam şişeler içerisinde ulaştırıldı. HPLC analizinde kullanılan yöntem Frangieh ve ark (2019)., tarafından yapılan çalışmada kullanılan metoddan uyarlanmıştır.

Arı zehirleri Apamin (Sigma-A1289), fosofolipaz A2 (Sigma-P9279) ve melittin (Sigma M2272) standartları olmak üzere üç bileşen bakımından analiz edilmiştir. Standartlara ait kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve analiz, HPLC cihazı ile yapılmıştır. Analizde değişken dalga boyu dedektörü (VWD) ve C18 25 cm x4.6 mm, 5 µm kolon kullanılmıştır. Kolon akış hızı 1 mL/dk, optimum ayırma sıcaklığı 20°C olarak tespit edilmiştir. Mobil faz olarak %0.1 TFA içeren su ve %0.1 TFA içeren asetonitril kullanılmıştır. Arı zehiri 10 mg tartılarak 5 mL ultra saf suda

             ve filtreden geçirilerek analiz için hazır hale getirilmiştir. Dedeksiyon işlemleri sabit dalga boyunda yapılmıştır.

2.2.3. Arı Zehirlerinin Hücre Kültürü için Hazırlanması

Kuru-toz formda bulunan arı zehiri örnekleri dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde            hücre kültüründe uygulanacak konsantrasyonları belirlemek amacıyla DMEM kullanılarak seyreltildi.

2.2.4. Hücre Kültürünün Hazırlanması

2.2.4.1. Hücrelerin            ve Kültürü

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında 20 kez pasajlama işlemi uygulanmış, kolorektal adenokarsinoma, Caco-2 (HTB37) ve pasaj sayısı 10 olan glioblastoma multiforme, T98G (CRL-1690), hücre hatları kullanıldı.

Dondurularak -80  C'de muhafaza edilen hücreler beş dk süre ile su banyosunda (steril, 37  C) tutularak            sağlandı. Hücrelerin içerisinde bulunduğu kriyot  plerin dış y  zyeleri %70'lik alkolle temizlenerek laminar akımlı kabin içerisine alındı. Kriyot  plerde bulunan hücrelere pipetasyon işlemi yapılarak homojen olarak dağılmaları sağlandı. Pipetasyon işlemi ile süspanse edilen hücreler DMEM besiyeri içerisine, %1 Penisilin/Streptomisin, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 esansiyel olmayan aminoasit eklenerek 15 mL'lik falkon t  p içerisine alındı ve santrifüj edildi. Santrifüj işlemi beş dk, 1500 rpm'de yapıldı. Sonrasında falkon t  p temizlenerek çalışılacak kabin içerisine alındı. Falkon tüpün üst tarafında bulunan süpernatant medyum pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırıldı. Falkon t  p içerisindeki hücrelerin üzerine önceden hazırlanan besi ortamı eklendi ve pipetasyon

işlemi yapılarak T75 cm²'lik hücre kültür kaplarına alındı. Kültür kapları hücrelerin yaşamaları için optimal şartlara sahip inkübatör (37°C ve %5 karbondioksit) içerisine alındı. Her iki hücre hattının da bulundukları kültür kaplarının alt yüzeylerine tutunarak prolifer olmaları invert mikroskop altında incelendi. Kültür besi yeri, renk değişimi takip edilerek ve hücrelerin gereksinimlerine bağlı olarak ortalama üç gün aralıklarla olacak şekilde değiştirildi.

2.2.4.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

Caco-2 ve T98G hücreleri subkültüre edilerek farklı pasaj numaralarına ait hücreler üretildi. Üretimi yapılan hücrelerin bir kısmı 96 kuyucuklu hücre pleytlerine alınarak arı zehirlerinin uygulanması için prolifer olmak üzere inkübatöre kaldırıldı. Kalan kısım ise daha sonra kullanılmak üzere donduruldu.

Pasajlama işlemi için inkübatörden çıkarılan kültür kaplarının invert mikroskop altında incelemeleri yapılarak pasajlanmak için yeterli yoğunluğa ulaşmış olduklarına bakıldı. Kültür kaplarının dış yüzeyleri %70'lik alkolle temizlenerek laminar akımlı kabin içerisine alındı ve içerisinde bulunan medium uygun şekilde pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücre metabolizması yan ürünlerinin ve serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla, hazırlanan PBS (pH=7.0) kullanılarak ortamda bulunan metabolizma artıkları uzaklaştırıldı ve sonrasında PBS kültür kabından uzaklaştırıldı. Tüm kültür kaplarına 3 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve inkübatöre kaldırıldı. Birkaç dakika sonra %70'lik alkolle dış yüzeyleri temizlenerek laminar akımlı kabin içerisine alındı. İçerisine 7 mL DMEM besi yeri eklenerek, pipetasyon işlemi yapıldı. Kültür kabı içerisinde bulunan 10 mL'lik süspansiyon 15 mL'lik falkon içerisine alındı ve 1500 rpm devirde 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dış yüzey temizliği yapılarak laminar akımlı kabin içerisine alınan falkon tüp içerisinde ki süpernatant uygun şekilde uzaklaştırıldı. Falkon tüpün dip kısmında toplanan pelet hücrelerin üzerine %10 FBS ve %1 antibiyotikli DMEM içeren besi yerinden 3 mL eklenerek pipetasyon yapıldı. Bu besiyeri ve hücre karışımı üç adet 75 cm²'lik kültür kaplarına her birinde 1 mL olacak şekilde dağıtıldı. Her bir kültür

kabının üzerine yaklaşık 10 mL hazırlanan besi yerinden eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Hem Caco-2 hem de T98G hücreleri bu şekilde üç seri pasaj yapılarak çoğaltıldı.

Hücrelerin dondurulması için inkübatörden çıkarılan kültür kapları %70'lik alkolle temizlenerek laminar akımlı kabin içerisine alındı. Kültür kapları içerisinde bulunan medium uygun şekilde uzaklaştırılarak, steril PBS ile hücrelerin yüzey yıkaması yapıldı ve PBS uzaklaştırıldı. 3 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklenen kültür kapları inkübatörde birkaç dakika inkübe edildi. Dış yüzeyleri temizlenerek laminar akımlı kabin içerisine tekrar alınan kültür kaplarına 7 mL DMEM içeren besi yeri eklendi. Kültür kabı içerisinde bulunan 10 mL'lik süspansiyon 15 mL'lik falkon içerisine alındı ve 1500 rpm devirde 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkon tüplerin üst kısımlarında bulunan süpernantant uygun şekilde uzaklaştırıldı ve falkon tüpün dip kısmında toplanan pelet hücrelerin üzerine dondurma kültür vasatı eklenerek pipetasyon işlemi yapıldı ve 1 mL'lik kriyotüpler içerisine alındı. Dondurma kültür vasatı %20 FBS ve %10 DMSO içerecek şekilde hazırlandı. Kriyotüpler hücre dondurma kapları içerisine alındı ve -80°C dondurucuya kaldırıldı. Hem Caco-2 hem de T98G hücreleri için bu işlemler gerçekleştirildi.

2.2.4.3. Kültür Kabındaki Hücrelerin 96 Kuyucuklu Pleytlere Aktarılması

Hücre kültür kaplarının (T75, 75 cm²) invert mikroskop altında incelemesi yapıldı ve yüzeyi en az %80-90 oranında kaplayan hücrelerin bulunduğu kap içerisindeki medium uygun şekilde pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Hücre metabolizması yan ürünlerinin ve serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla, hazırlanan PBS ile hücrelerin yüzey yıkaması yapıldı ve PBS kültür kabından uzaklaştırıldı. 2 mL Tripsin-EDTA solüsyonu hücreler üzerine eklendi ve kültür kapları inkübatöre kaldırıldı. Birkaç dk inkübasyon sonrasında kültür kaplarının dış yüzeyleri %70'lik alkolle temizlenerek laminar akımlı kabin içerisine alındı. Flask içerisine DMEM içeren besi yeri eklenerek bu süspansiyon santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatant atılarak dipte bulunan hücreler üzerine hücre besiyeri eklendi, pipetasyon yapıldı ve 96 kuyucuklu pleytlere aktarıldı.

Öncesinde pleytlere aktarılabak hücre sayısını belirlemek amacıyla 1 mL kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak ependorf tüpe konuldu ve üzerine 90 µL tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı. Karışım Neubauer lamı üzerine koyuldu ve beş bölmedeki toplam hücre sayısı belirlendi. Bu sayı sulandırma miktarı 50 000 sayısı ile çarpılarak 1 mL hücre mediumunda ne kadar hücre olduğu belirlendi.

2.2.5. Arı Zehirlerinin Hücrelere Uygulanmak Üzere Hazırlanması

Her bir arı zehiri örneği hassas terazi kullanılarak belirli miktarlarda tartıldı. Tartılan zehirler üzerine 100 µl DMSO eklenerek çözünmeleri sağlandı. Sonrasında 900 µl DMEM eklenerek 1 mL'lik ependorf tüpler içerisine alındı ve hücrelere uygulamandan önce vortekslenerek homojen hale getirildi. Sitotoksik etkinin %100 gözlemlendiği en düşük konsantrasyon en yüksek doz olarak belirlendi. Bu çözelti yarım dilüsyonlar yapılarak seyreltildi ve farklı konsantrasyonlarda arı zehiri çözeltileri elde edildi. Yapılan ön çalışmalarda Caco-2 hücreleri için belirlenen dozların T98G hücrelerinde yüksek sitotoksik etki göstermesinden dolayı T98G hücrelerinde en yüksek doz daha düşük tutuldu. Konsantrasyonlar; benzer dozların olduğu aralığı kapsayacak şekilde belirlendi.

2.2.6. Hücrelere Arı Zehirlerinin Uygulanması

96 kuyulu hücre pleytlerinde hücrelerin gelişmeleri tamamlandıktan sonra farklı doz aralıklarında hazırlanan arı zehirleri hücrelere uygulandı. Caco-2 ve T98G hücrelerine uygulanan doz aralıkları Çizelge 2.4'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. Caco-2 ve T98G hücrelerine uygulanan arı zehiri doz aralıkları

Şehir	Caco-2 (µg/mL)	T98G (µg/mL)
Afyon	1640-0,80	205-0,10
Ankara	1890-0,92	118,13-0,06
Balıkesir	2712-1,32	84,75-0,04
Denizli	2640-1,29	82,5-0,04
Muğla	2700-1,32	337,5-0,16

2.2.7. MTT, Nötral Kırmızı ve LDH Analiz Yöntemleri

Sitotoksosite, uygulanan maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak değişmekte, hücrelerin farklı derecelerde zarar görmesine neden olan bir olay olarak tanımlanmakta, hücrelerde yapılan sitotoksosite çalışmaları sayesinde test edilen maddenin sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında fikir elde edilebilmektedir (Tokur ve Aksoy, 2017). Sitotoksosite testleri, *in vitro* toksikoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılırlar. Bu testlerden LDH ile laktat dehidrojenaz aktivitesi belirlenebilmektedir. Nötral Kırmızı ve MTT testleri ise toksik maddeye maruz kalma sonucu hücre canlılığının veya sitotoksitenin saptanması için kullanılan en yaygın yöntemlerdendir (Fotakis ve Timbrell, 2006).

2.2.7.1. MTT Analizi

Canlı hücreler tarafından substratın kromojenik ürüne dönüştürülmesine bağlı olan canlılık deneyleri arasında MTT deneyi yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Kumar ve ark., 2018). Tetrazolyum bileşiklerinden biri olan MTT pozitif yüklü ve ökaryotik hücrelerin zarlarını kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir

özelliktir. İndirgenme sonucu suda çözünür formdaki MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] suda çözünmeyen özellikte ki formazana dönüşmekte ve kristal şeklinde çökelmektedir. Tetrazolyum halkası aktif mitokondri tarafından kırılmakta ve canlı hücreler renk reaksiyonu meydana getirebilmekte, ölü hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeme özelliklerini kaybederek renk değişimi oluşturmamaktadır (Riss ve Moravec, 2006; Tokur ve Aksoy, 2017).

Arı zehiri uygulanmış hücre pleytlerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrası kuyucuklarda bulunan besi ortamları ve arı zehiri çözeltileri çoklu pipet kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldı. Her bir kuyucukda bulunan hücrelerin yüzey yıkamasını yapmak için kuyucuklara 100 µl PBS eklendi, birkaç dk beklenerek uzaklaştırıldı. Karanlık ortamda her bir kuyucuğa 15 µl MTT solüsyonu eklendi. MTT solüsyonu 1 mL PBS içerisinde 5 µg MTT çözülürülerek hazırlandı. Pleytler inkübatöre kaldırılarak dört saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrası kuyucuklar üzerine 100 µl DMSO eklenerek formazanın çözünmesi sağlandı. Pleytlerin optik dansiteleri 540 nm dalga boyu kullanılarak mikrolept okuyucuda belirlendi.

2.2.7.2. Nötral Kırmızı Analizi

Nötral Kırmızı analizi canlı hücrelerin, supravital bir boya olan nötr kırmızıyı lizozomlarında tutma ve boyaya bağlanma özelliğine dayanmaktadır. Bu boya zayıf katyonik özellikte olduğundan pasif difüzyonla hücre zarlarına tutunur ve lizozomlarda birikerek, lizozomal matrisin anyonik ve/veya fosfat gruplarına bağlanır. Asitleştirilmiş bir etanol solüsyonu kullanılarak canlı hücrelerden ekstrakte edilebilir ve boyanın absorbansı bir spektrofotometre kullanılarak ölçülür (Repetto ve ark., 2008).

Arı zehiri uygulanmış hücre pleytlerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrası kuyucuklarda bulunan besi ortamları ve arı zehiri çoklu pipet kullanılarak ortamdan

uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa hücrelerin yüzey yıkamasını yapmak için 100 µl PBS eklendi ve sonrasında çoklu pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Yüzey yıkaması işlemi iki kez tekrarlandı. Her bir kuyucuğa 100 µl Nötral Kırmızı solüsyonu (40 µg/DMEM) eklendi. Pleytler inkübatöre kaldırılarak iki saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrası kuyucuklar üzerine 100 mikrolitre destain eklenerek optik dansiteler 540 nm dalga boyu kullanılarak mikropleyt okuyucuda belirlendi.

2.2.7.3. LDH Analizi

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerden biride hasarlı ya da ölü hücrelerden vasata geçen LDH aktivitesinin değerlendirilmesidir (Tokur ve Aksoy, 2017). LDH organizmada tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzim olup toksik madde ve hücre etkileşimi sonucu plazma zar bütünlüğünün bozulmasıyla hücre medyumuna geçebilmekte ve spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).

LDH ölçümleri ChronoLab Quantitative Detection of Lactate Dehydrogenase (Barselona, İspanya) test kiti kullanılarak yapılmıştır. Arı zehiri uygulanmış hücre pleytlerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrası, hücrelerin üzerinde bulunan besi ortamından 100 µl alınarak başka bir boş pleyte koyuldu. Üzerine 3 mL test belirteci ilave edildi. Bu işlem ile besi ortamında bulunan pirüvatın laktata dönüşümü katalize edilmekte, NADH, NAD⁺ 'a dönüşmektedir. Bu karışımdan 100 µl alınarak 96 kuyulu pleytlere aktarıldı ve başlangıç optik dansite değeri (t₀), 340 nm dalga boyunda belirlendi. Kronometre ile zaman tutularak birer dk arayla üç ayrı zamanda optik dansite değerleri (t₁-t₂-t₃) ölçüldü. Üç optik dansite değeri arasında ki fark belirlenerek ortalama değer hesaplandı. MTT ve Nötral Kırmızı analizinde sitotoksosite hesaplamasında kullanılan formülle, hesaplanan ortalama değer kullanılarak, % sitotoksosite hesaplandı.

2.2.7.4. Sitotoksisite Değerlendirilmesi

Arı zehiri uygulanan her iki hücre hattındaki sitotoksisite belirlenerek, % şeklinde gösterildi. Arı zehirinin uygulanmadığı, tümü canlı kabul edilen hücreler negatif (Max V), Triton-X uygulanan ve tümünün cansız olduğu düşünülen hücreler pozitif (Min V) kontrol grubu olarak belirlendi. Arı zehirinin çözündürüldüğü DMSO için çözücü kontrol grubu oluşturuldu. % sitotoksisite aşağıda belirtilen formül kullanılarak hesaplandı (Ulukaya ve ark., 2008).

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = [1 - (\text{test} - \text{Min V}) / (\text{Max V} - \text{Min V})] \times 100$$

IC50 değerlendirilmesi, klasik sigmoid-doz modellemesine göre yapıldı. Konsantrasyon ve sitotoksisite % yanıtları Graph Pad® Prism 8.0. (GraphPad Software, San Diego California USA) programından, regresyon eğrisi analizi SPSS 25.00 programından faydalanılarak yapıldı. En yüksek belirtme katsayısı (R²) değerlendirmeye alınarak IC50 değerinin belirlenmesinde kullanılacak olan eğrinin formülü belirlendi.

Doz, yöntem ve arı zehirinin elde edildiği il aynı olmak şartı ile hücre hatlarında dozlara karşılık yüzde sitotoksisite değerlerinin karşılaştırılması; doz, yöntem ve hücre hattı aynı olmak şartı ile arı zehirinin elde edildiği illere göre dozlara karşılık yüzde sitotoksisite değerlerinin karşılaştırılması amacıyla veriler SPSS 25.00'e uygun şekilde girildi. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) kullanılarak yapıldı. Varyans analizi sonucu farklılıklar Duncan ve Tukey testleri kullanılarak karşılaştırıldı. Doz, arı zehirinin elde edildiği il ve hücre hattı sabit olmak üzere MTT, Nötral Kırmızı ve LDH sonuçlarının karşılaştırması ve ilişkinin değerlendirilmesi, arı zehirlerinin illere göre değişen apamin, melittin ve fosfolipaz A2 içeriklerine göre hücre hatlarındaki IC50 değerlerinin karşılaştırılması Graph Pad® Prism 8.0 programında, Pearson korelasyon testi ile yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

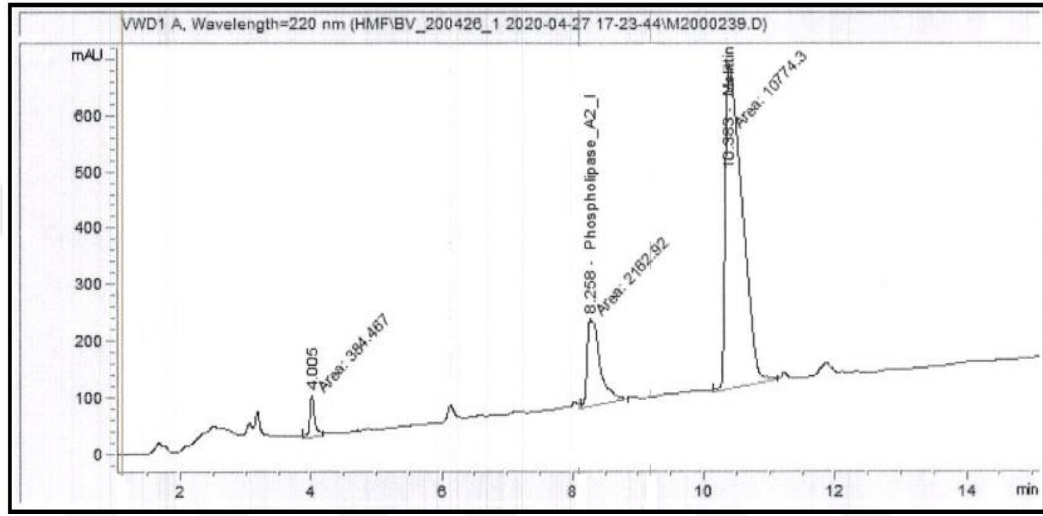
3.1.1. Arı Zehiri İçerik Analizi Sonuçları

VWD dedektör kullanılarak yapılan HPLC analiz sonuçlarına göre apamin oranı en düşük %3,84 ile Afyon, en yüksek %6,29 ile Muğla ilinden toplanan arı zehirinde; fosfolipaz A2 oranı en düşük Muğla iline ait zehirde (%10,87) , en yüksek Denizli iline ait zehirde (%13,87) bulunmuştur. Fosfolipaz A2 oranları bakımından Denizli ilini sırasıyla Balıkesir (%12,96) ve Afyon (%11,76) ve Ankara (%11,17) illeri izlemiştir. Melittin bakımından en yüksek içeriğe sahip il Denizli (%70,21) iken en düşük Afyon (%51,17) ili bulunmuştur. İllere göre apamin, fosfolipaz A2 ve melittin içerik oranları (%) Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. İllere göre apamin, fosfolipaz A2 ve melittin miktarları (%)

İl	Madde	Miktar (Yüzde)
Afyon	Apamin	3,84
	Fosfolipaz A2	11,76
	Melittin	51,17
Ankara	Apamin	5,00
	Fosfolipaz A2	11,17
	Melittin	63,92
Balıkesir	Apamin	3,89
	Fosfolipaz A2	12,96
	Melittin	65,50
Denizli	Apamin	4,42
	Fosfolipaz A2	13,87
	Melittin	70,21
Muğla	Apamin	6,29
	Fosfolipaz A2	10,87
	Melittin	57,13

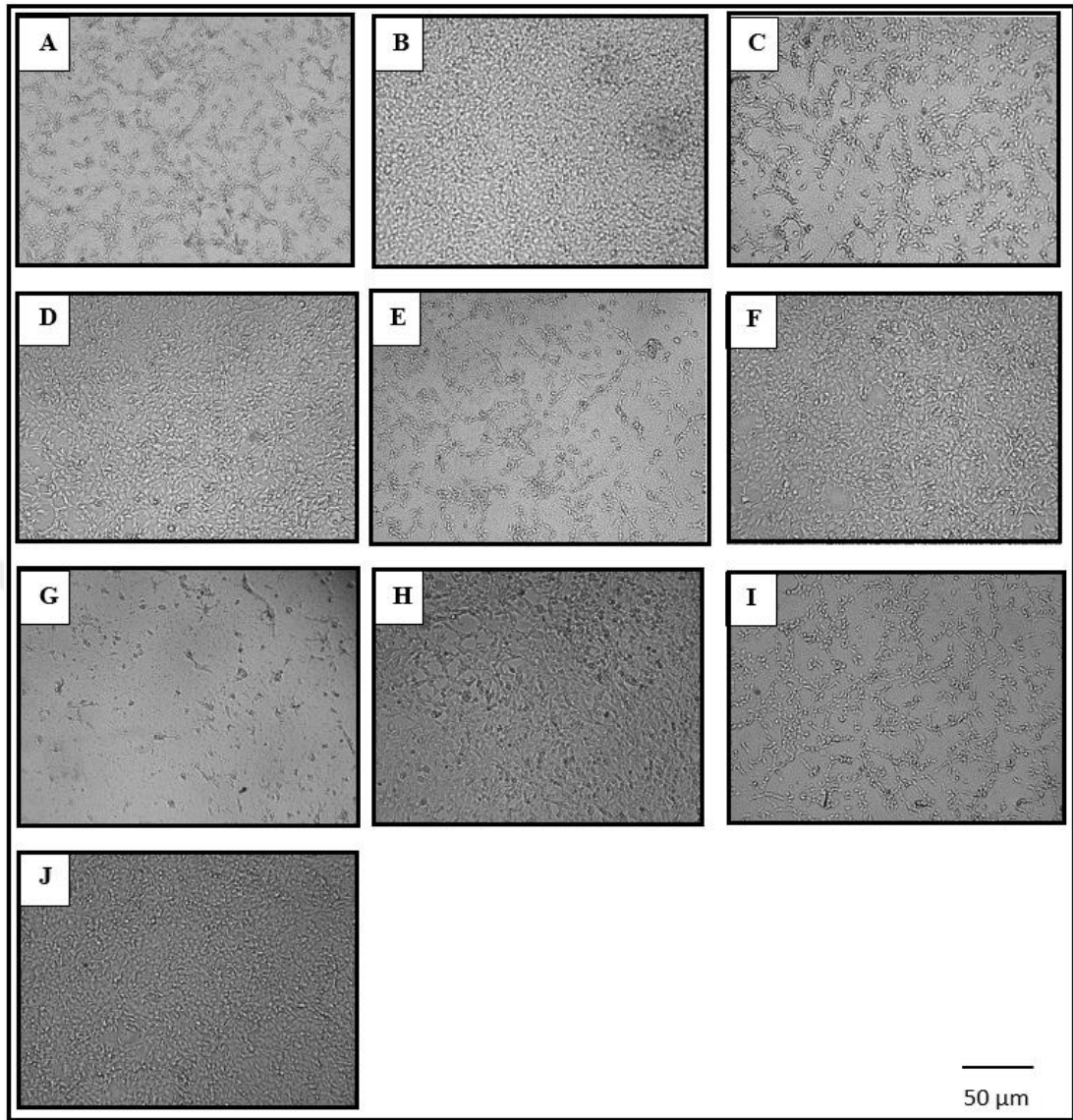
Çalışmada kullanılan; Afyon, Ankara, Balıkesir, Denizli ve Muğla illerinden elde edilen bal arısı zehirlerinin HPLC cihazında VWD dedektör kullanılarak içerik analizleri yapılmıştır. Tüm illerden toplanan bal arısı zehirleri için HPLC içerik (apamin, fosfolipaz A2 ve melittin) kromotogramları incelenmiştir. Örnek olarak Şekil 3.1’de Afyon ilinden elde edilen arı zehirinin HPLC (apamin, fosfolipaz A2 ve melittin) kromotogramı gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Afyon ilinden elde edilen arı zehirinin HPLC kromotogramı

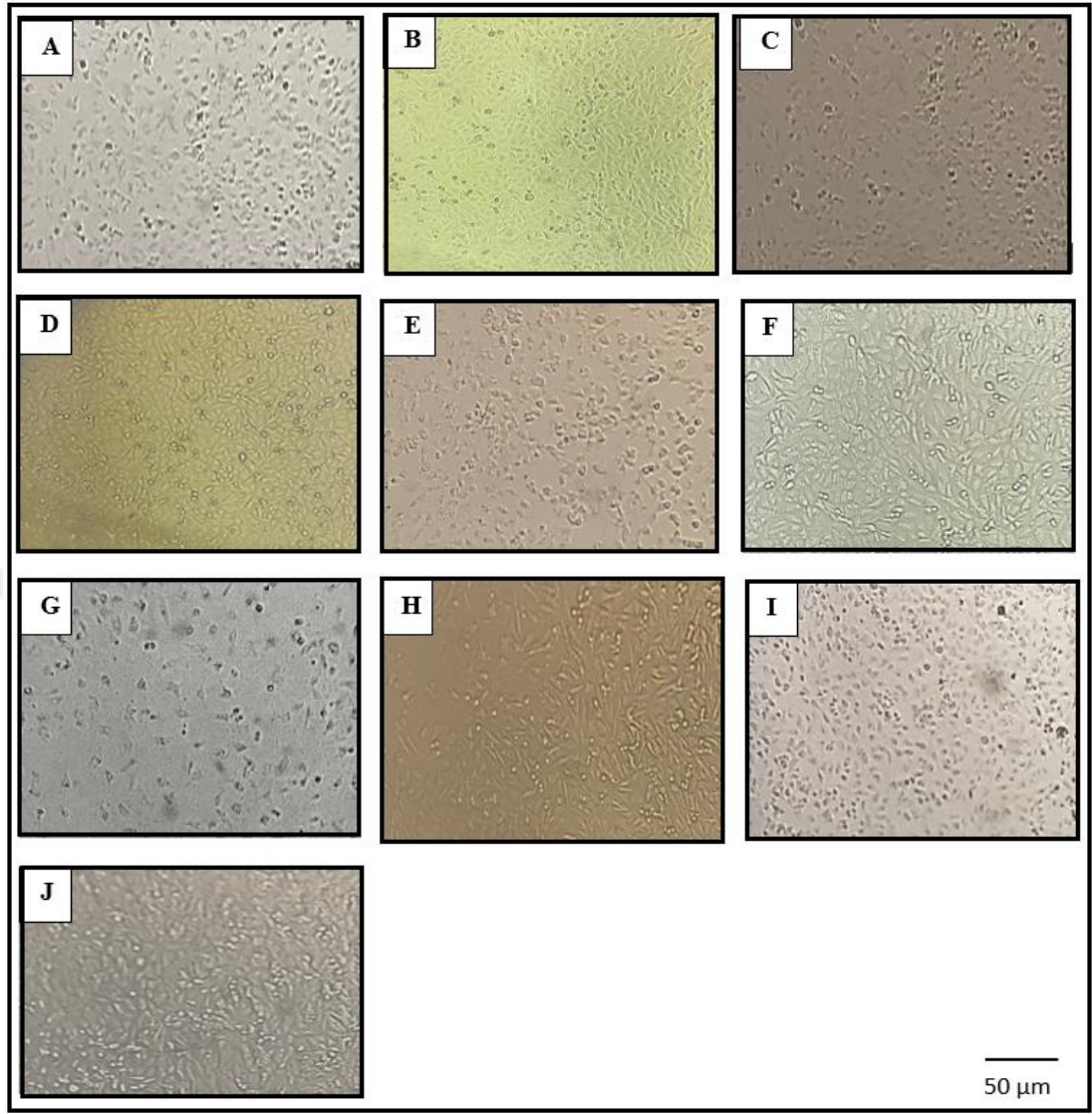
3.2. Hücrelerin Morfolojik İncelenmesi

Farklı pasaj numaralarına ait Caco-2 hücrelerine, uygun çözücü kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan arı zehiri uygulanması ve 24 saatlik inkübasyona bırakılması sonrası invert mikroskop altında morfolojik incelemeler yapıldı. Farklı illere ait arı zehirlerinin Caco-2 hücrelerine uygulanmasından 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda oluşan morfolojik farklılıklar Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Farklı illere ait arı zehirlerinin Caco-2 hücrelerine uygulanmasından 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda oluşan morfolojik görünüm (A: Afyon-1640 µg/mL; B: Afyon-0,80 µg/mL; C: Ankara-1890 µg/mL; D: Ankara-0,92 µg/mL; E: Balıkesir-2712 µg/mL; F: Balıkesir-1,32 µg/mL; G: Denizli-2640 µg/mL; H: Denizli-1,29 µg/mL; I: Muğla-2700 µg/mL; J: Muğla-1,32 µg/mL; Scale Bar= 50 µm).

Farklı pasaj numaralarına ait T98G hücrelerine, uygun çözücü kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan arı zehiri uygulanması ve 24 saatlik inkübasyona bırakılması sonrası invert mikroskop altında morfolojik incelemeleri yapıldı. Farklı illere ait arı zehirlerinin T98G hücrelerine uygulanmasından 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda oluşan morfolojik farklılıklar Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Farklı illere ait arı zehirlerinin T98G hücrelerine uygulanmasından 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda oluşan morfolojik görünüm (A: Afyon-205 µg/mL; B: Afyon-0,10 µg/mL; C: Ankara-118,13 µg/mL; D: Ankara-0,06 µg/mL; E: Balıkesir-84,75 µg/mL; F: Balıkesir-0,04 µg/mL; G: Denizli-82,50 µg/mL; H: Denizli-0,04 µg/mL; I: Muğla-337,5 µg/mL; J: Muğla-0,16 µg/mL; Scale Bar = 50 µm).

Caco-2 ve T98G hücrelerinde; arı zehiri uygulanmayan kontrol grubundaki hücrelerin morfolojilerinin düzgün yapılı ve normal olduğu, tüm illerde, uygulanan en yüksek konsantrasyonlarda, hücrelerin deforme olduğu ve büyük çoğunluğunun öldüğü, en düşük konsantrasyonlarda hücrelerin tamamına yakının yaşadığı gözlemlendi. Zehir uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm zehirlerin uygulanan en yüksek konsantrasyonlarında hücre membran bütünlüğünün bozulmuş olduğu gözlemlendi. Caco-2 hücrelerinde Denizli ilinden elde edilen zehirin uygulandığı hücrelerde, T98G hücrelerinde ise Denizli ve Muğla iline ait

zehirlerin uygulandığı hücrelerde, hücre ölümü morfolojisi gösteren hücrelerin daha fazla olduğu gözlemlendi.

3.3. MTT, Nötral Kırmızı ve LDH Analiz Sonuçları

Afyon, Ankara, Balıkesir, Denizli ve Muğla illerinden toplanan arı zehirlerinin sırasıyla; 1640, 1890, 2712, 2640 ve 2700 µg/mL'den başlayarak yarım dilüsyonlar halinde konsantrasyonları oluşturuldu ve Caco-2 hücrelerine uygulandı. T98G hücrelerine uygulanmak üzere ise Afyon, Ankara, Balıkesir, Denizli, Muğla illerinden toplanan arı zehirlerinin sırasıyla; 205; 118,13; 84,75; 82,5 ve 337,5 µg/mL'den başlayarak yarım dilüsyonlar halinde konsantrasyonları oluşturuldu. Hücreler, yapılan uygulanmanın ardından 24 saat inkübe edildi.

İstatistiki değerlendirmelerde; seçilen veriler arasındaki yüzde sitotoksosite değerlendirmesinde MS Excel (MS Office 2016), doz ve yüzde sitotoksosite değerleri ile regresyon eğrisi analizinde SPSS 25.00 ve Graph Pad® Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego California USA) programından faydalanıldı. En yüksek R² değeri kullanılarak IC50 hesaplanılacak eğrinin formülü belirlendi. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile yapıldı. Varyans analizi sonucu farklılıklar Duncan ve Tukey testleri ile karşılaştırıldı.

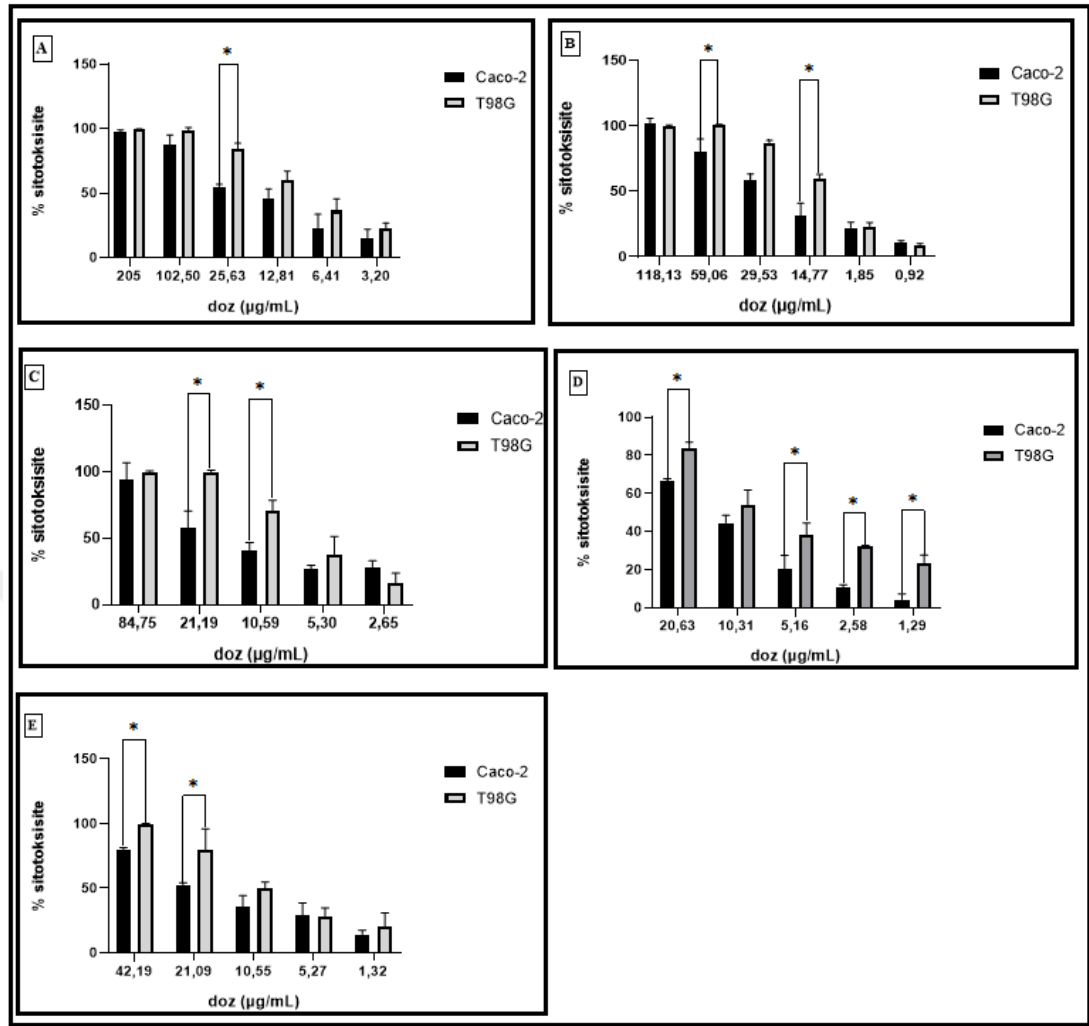
3.3.1. MTT Analizi

Hücrelerin 24 saat inkübasyonu sonrası kuyucuklardaki vasat ve arı zehiri çoklu pipet yardımı ile çekilerek kuyucuklara 100 µl PBS eklendi. Birkaç dk beklendikten sonra PBS çoklu pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. 5 µg/mL olacak şekilde hazırlanan MTT boyası her kuyucuğa 15 µl eklendi ve hücre pleytleri inkübatöre kaldırıldı. Işığa duyarlı bir yöntem olmasından dolayı işlemler karanlık ortamda gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası hücre pleytlerinde ki her kuyucuğun

üzerine 100 µl DMSO eklendi ve horizontal karıştırıcıda beş dk tutulduktan sonra optik dansite 540 nm’de ölçüldü. Caco-2 ve T98G hücrelerinin % canlılık oranları beş ile ait arı zehiri konsantrasyonlarının artışı ile orantılı şekilde azalma gösterdi. Hücre hatlarında çalışılan, tüm örneklerde, alınan % sitotoksosite cevapları ve artan konsantrasyonlar arasındaki ilişki pozitif bulundu. MTT test sonuçlarına göre hem Caco-2 hemde T98G hücre hattında IC50 değeri en yüksek olan il Afyon iken, en düşük IC50 değeri Denizli iline ait zehirde hesaplandı. İllere ve hücre hatlarına göre MTT analizi ile hesaplanan arı zehiri IC50 değerleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Belirli dozlarda, arı zehiri uygulanan Caco-2 ve T98G hücrelerinin, MTT analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevaplarının karşılaştırılması Şekil 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. MTT analiz sonuçlarına göre Caco-2 ve T98G hücreleri için bulunan IC50 değerleri

Arı Zehirinin Toplandığı İl	Caco-2-IC 50 (µg/mL)	T98G-IC 50 (µg/mL)
Afyon	18,08 ± 1,31	8,53 ± 0,42
Ankara	16,75 ± 0,53	7,70 ± 0,32
Balıkesir	15,13 ± 1,36	6,49 ± 0,34
Denizli	12,42 ± 0,19	5,98 ± 0,40
Muğla	16,56 ± 0,95	7,29 ± 0,58



Şekil 3.4. Arı zehirlerinin bazı konsantrasyonlarında Caco-2 ve T98G hücrelerinin, MTT analizi ile belirlenen % sitotoksiste cevaplarının karşılaştırılması (Ortalama/Standart hata). A: Afyon, B: Ankara, C: Balıkesir, D: Denizli, E: Muğla (*p<0,05)

Afyon iline ait arı zehirinin 25,63 µg/mL, Ankara ilinin 59,06 ve 14,77 µg/mL, Balıkesir ilinin 21,19 ve 10,59 µg/mL, Denizli ilinin 20,63; 5,16; 2,58 ve 1,29 µg/mL ve Muğla ilinin 42,19 ve 21,09 µg/mL konsantrasyonlarda iki hücre hattı arasında MTT analizi ile belirlenen % sitotoksiste cevapları arasındaki farkın istatistiksel bakımdan önemli olduğu, aynı dozlarda hücrelerin % sitotoksiste değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,05).

3.3.2. Nötral Kırmızı Analizi

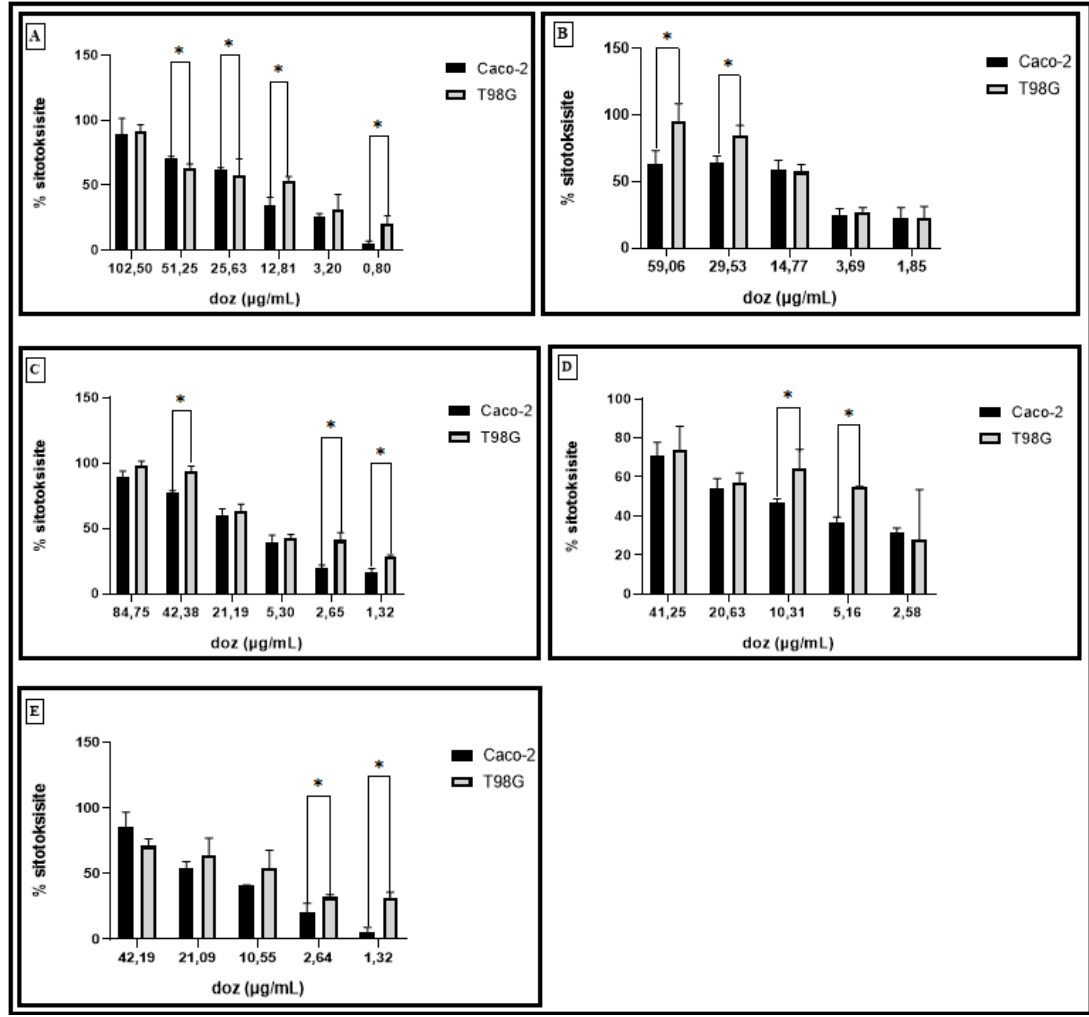
Hücrelere arı zehiri uygulanarak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki vasat ve arı zehiri çoklu pipet yardımı ile çekilerek kuyucuklara 100 µl PBS eklendi. Bu işlem iki kez tekrar edildi sonrasında PBS uzaklaştırıldı. Nötral Kırmızı boyası her kuyucuğa 100 µl koyularak hücre pleytleri inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon sonrası hücre pleytlerinde her kuyucuğa 100 µl SDS eklendi ve optik dansite 540 nm’de ölçüldü.

Nötral Kırmızı analizi ile hem Caco-2 hemde T98G hücrelerinde IC50 değeri en yüksek olan il Afyon, en düşük olan il Caco-2 hücrelerinde Balıkesir, T98G hücrelerinde Denizli bulunmuştur. İllerin hücre hatlarına göre Nötral Kırmızı analizi ile hesaplanan IC50 değerleri Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Nötral Kırmızı analizi sonuçlarına göre Caco-2 ve T98G hücreleri için bulunan IC50 değerleri

Arı Zehirinin Toplandığı İl	Caco-2 IC50 (µg/mL)	T98G- IC50 (µg/mL)
Afyon	14,72 ± 0,35	10,35 ± 0,97
Ankara	13,59 ± 1,29	8,57 ± 0,59
Balıkesir	11,47 ± 0,42	5,74 ± 0,42
Denizli	13,25 ± 0,77	4,90 ± 0,21
Muğla	14,51 ± 0,84	8,32 ± 0,49

Belirli dozlarda, arı zehiri uygulanan Caco-2 ve T98G hücrelerinin, Nötral Kırmızı analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevaplarının karşılaştırılması Şekil 3.5’de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Arı zehirlerinin bazı konsantrasyonlarında Caco-2 ve T98G hücrelerinin, Nötral Kırmızı analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevaplarının karşılaştırılması (Ortalama/Standart hata). A: Afyon, B: Ankara, C: Balıkesir, D: Denizli, E: Muğla ($p < 0,05$)

Afyon iline ait arı zehirinin 51,25; 25,63; 12,81 ve 0,80 µg/mL, Ankara iline ait arı zehirinin 59,06 ve 29,53 µg/mL, Balıkesir iline ait arı zehirinin 42,38; 2,65 ve 1,32 µg/mL, Denizli iline ait arı zehirinin 10,31 ve 5,16 µg/mL ve Muğla iline ait arı zehirinin 2,64 ve 1,32 µg/mL konsantrasyonlarında her iki hücre hattının Nötral Kırmızı analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevapları arasında ki farklılıkların önemli olduğu bulundu ($p < 0,05$).

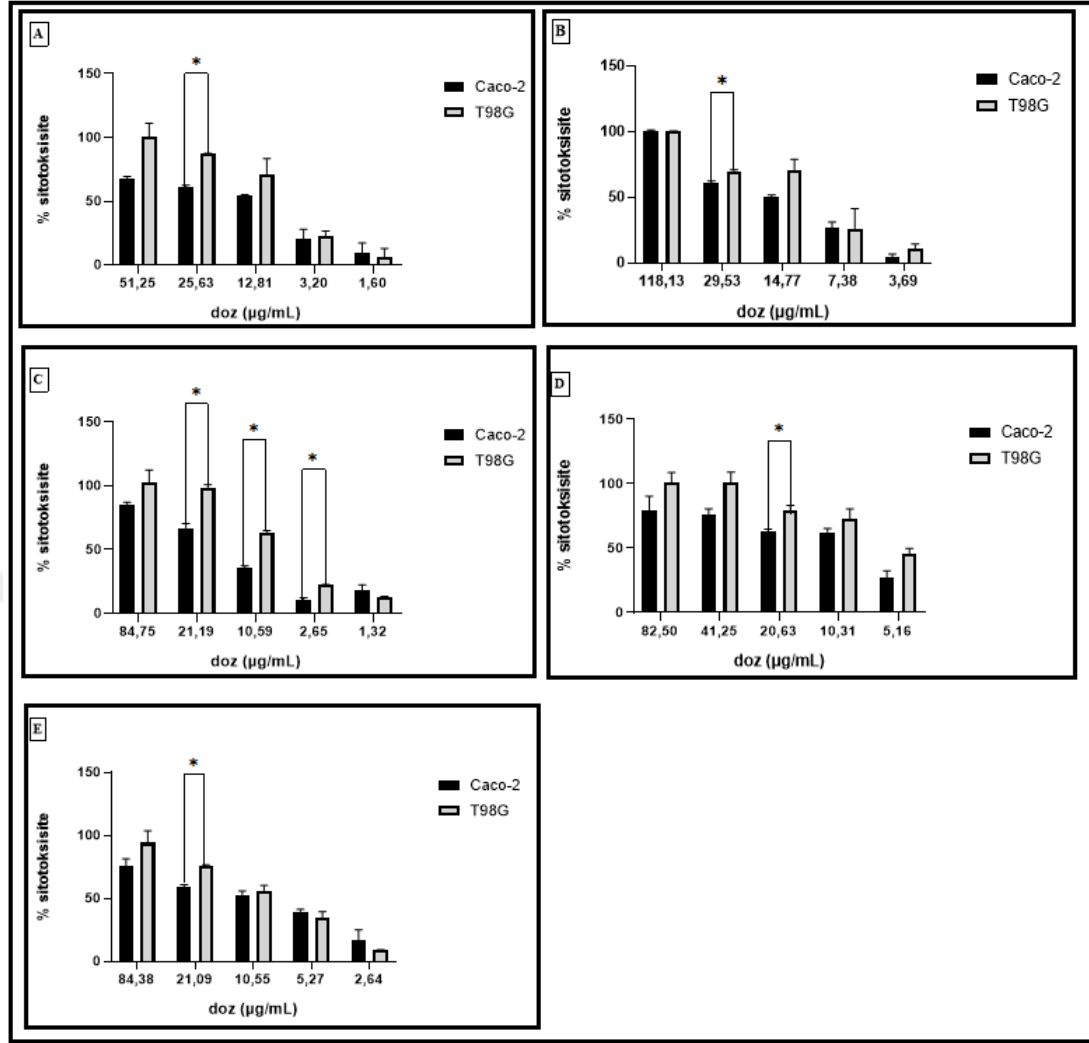
3.3.3. LDH Analizi

96 kuyucuklu pleytlerde bulunan, arı zehiri uygulaması yapılmış olan hücrelerin içerisinde bulundukları besi yeri 96 kuyucuklu başka bir boş pleyte 100 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Üzerine LDH çalışma solüsyonu eklenmiş, bu karışımdan 100 µl alınarak 96 kuyucuklu başka bir boş plate'e koyulmuş ve optik dansite 340 nm'de ölçülmüştür.

LDH testi sonuçlarına göre en yüksek IC50 değeri Caco-2 hücreleri için Afyon, T98G hücreleri için Ankara iline ait zehirde, en düşük ise her iki hücre hattında da Denizli iline ait zehirde belirlenmiştir. İllere ve hücre hatlarına göre LDH analizi ile hesaplanan arı zehiri IC50 değerleri Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Belirli dozlarda, arı zehiri uygulanan Caco-2 ve T98G hücrelerinin, LDH analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevaplarının karşılaştırılması Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

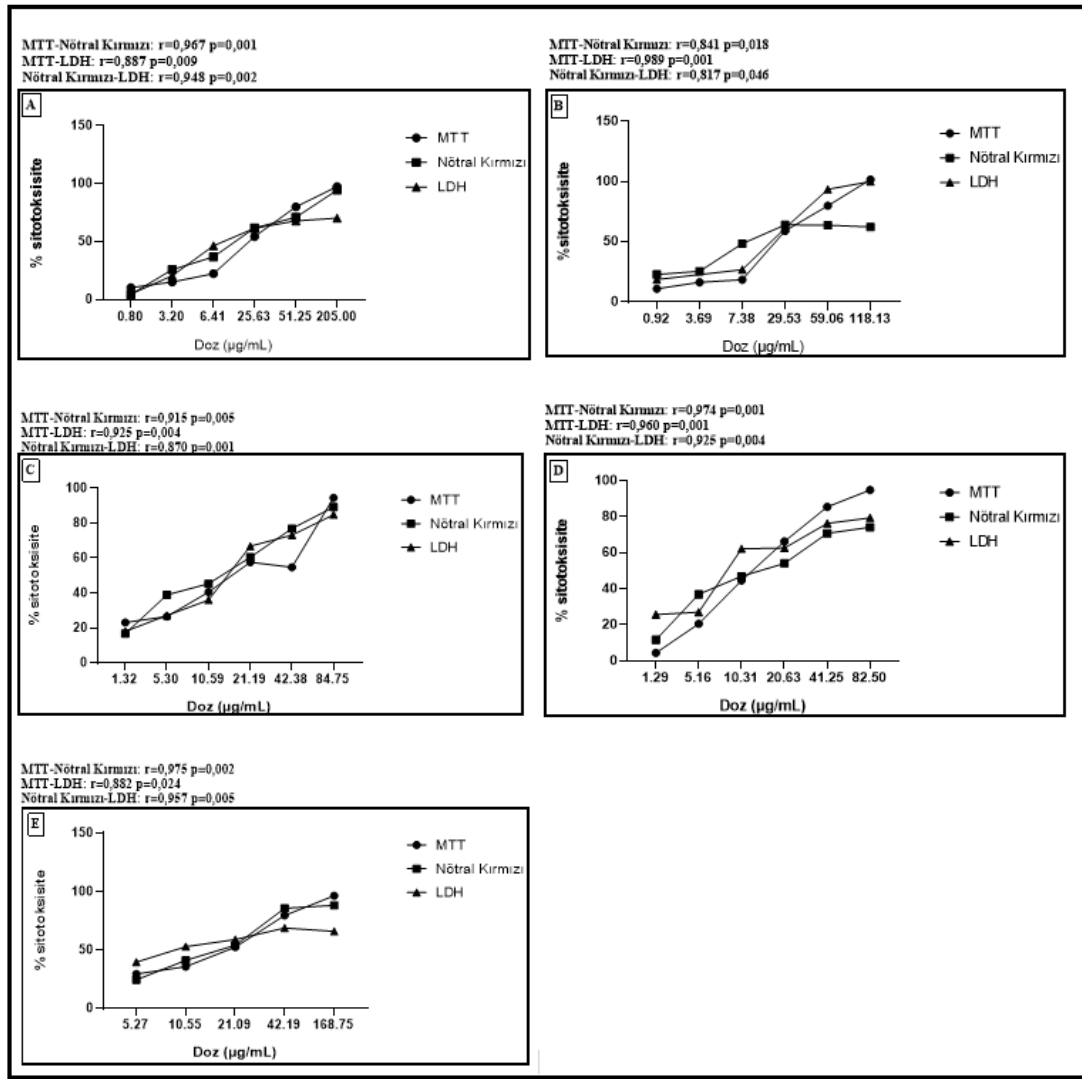
Çizelge 3.4. LDH analizi sonuçlarına göre Caco2 ve T98G hücreleri için bulunan IC50 değerleri

Arı Zehirinin Toplandığı İl	Caco-2 IC50 (µg/mL)	T98G-IC50 (µg/mL)
Afyon	19,52 ± 0,58	9,29 ± 0,50
Ankara	13,67 ± 0,85	10,64 ± 0,34
Balıkesir	11,59 ± 0,38	6,94 ± 0,40
Denizli	8,19 ± 0,61	5,04 ± 0,17
Muğla	14,43 ± 0,68	9,18 ± 0,54



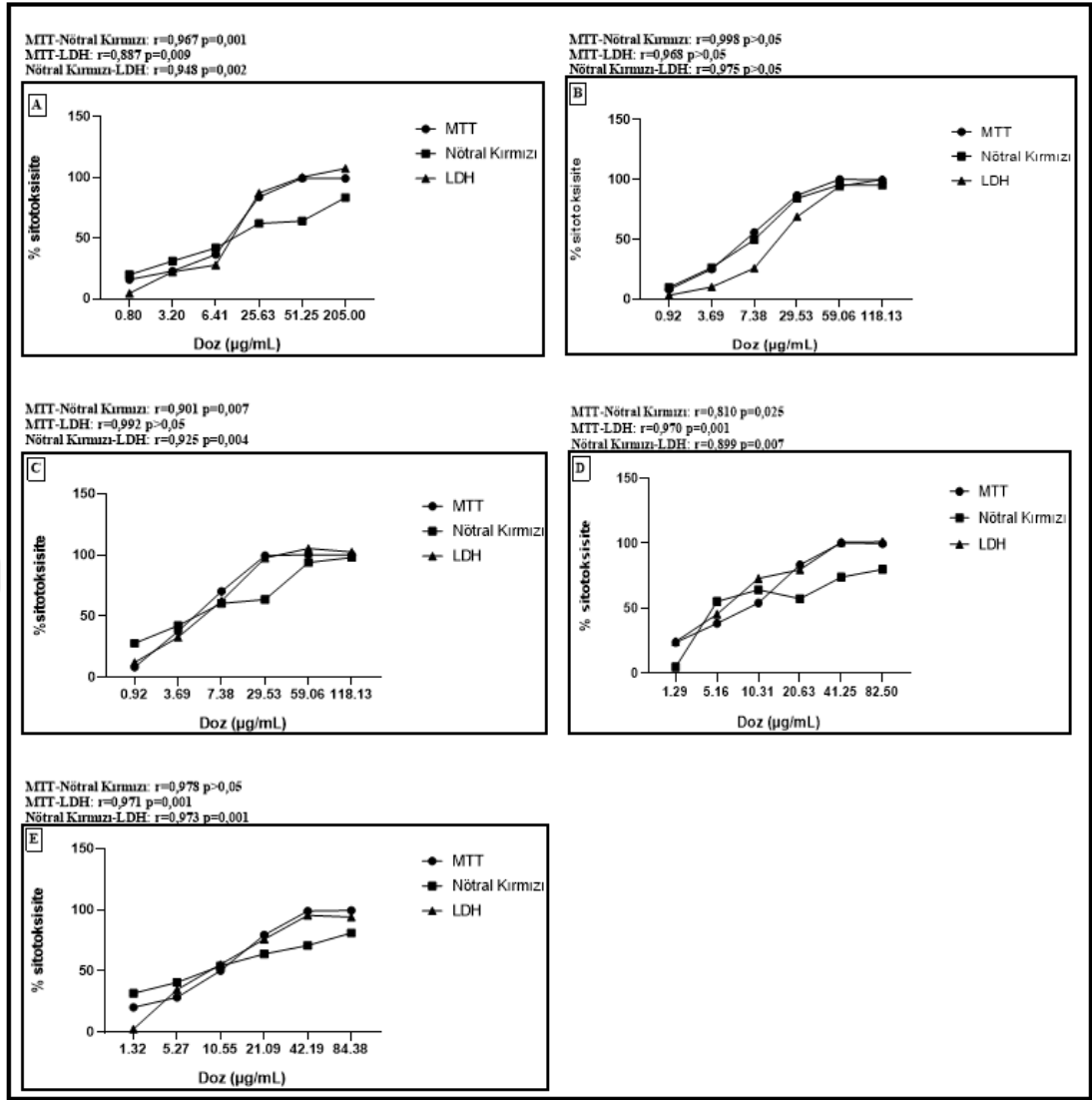
Şekil 3.6. Arı zehirlerinin bazı konsantrasyonlarında Caco-2 ve T98G hücrelerinin, LDH analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevaplarının karşılaştırılması (Ortalama/Standart hata). A: Afyon, B: Ankara, C: Balıkesir, D: Denizli, E: Muğla (* $p < 0,05$)

Afyon iline ait arı zehirinin 25,63 µg/mL, Ankara iline ait arı zehirinin 29,53 µg/mL, Balıkesir iline ait arı zehirinin 21,19; 10,59 ve 2,65 µg/mL, Denizli iline ait arı zehirinin 20,63 µg/mL ve Muğla iline ait arı zehirinin 21,09 µg/mL konsantrasyonlarında her iki hücre hattının LDH analizi ile belirlenen % sitotoksosite cevapları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Şekil 3.7’de Caco-2 hücrelerinde MTT, Nötral Kırmızı ve LDH analizleri ile doza göre belirlenen yüzde sitotoksosite değerleri arasındaki ilişki gösterilmiştir.



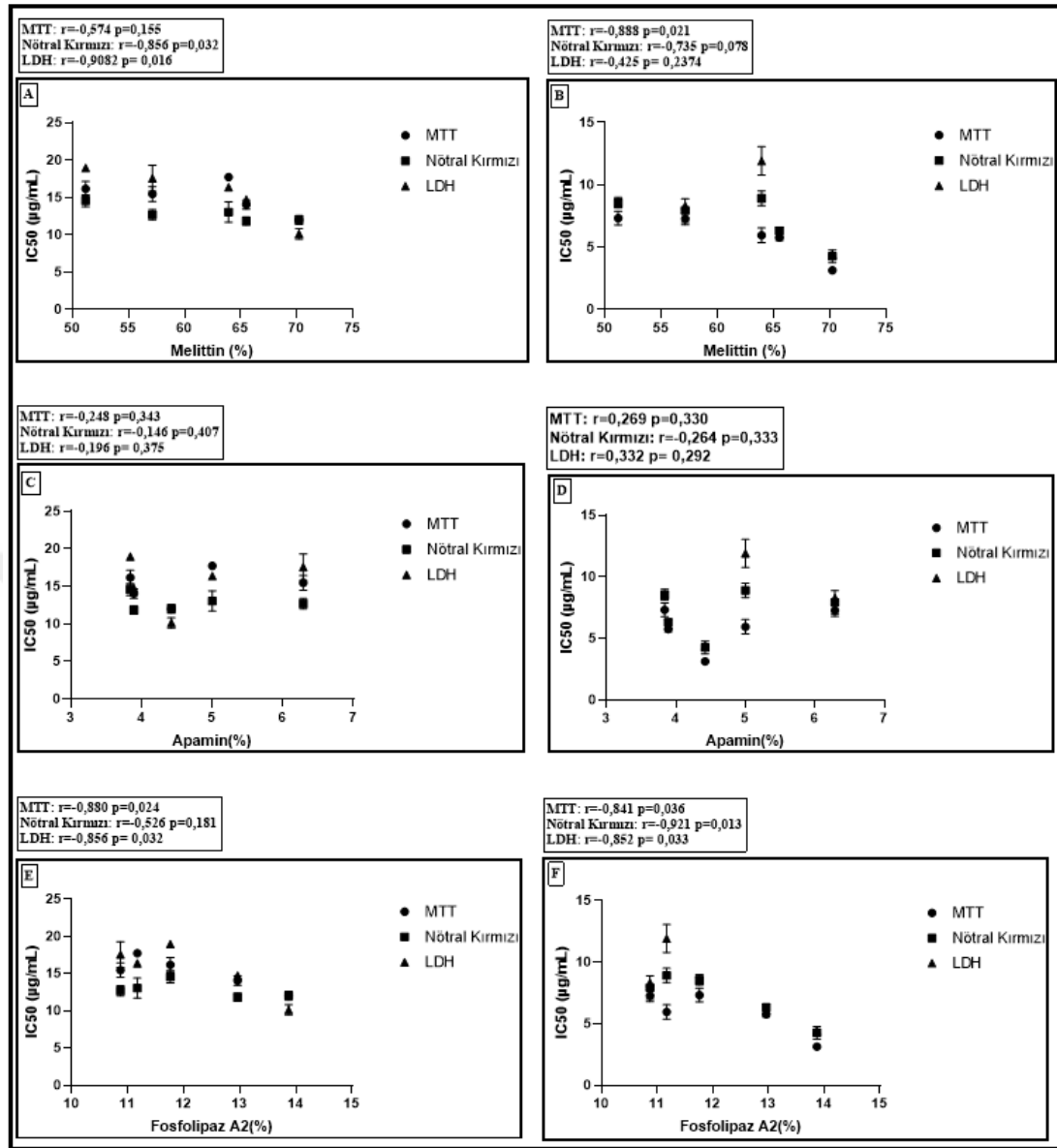
Şekil 3.7. Caco-2 hücrelerinde MTT, Nötral Kırmızı ve LDH analizleri ile doza göre belirlenen yüzde sitotoksosite değerleri arasındaki ilişki (r = Korelasyon Katsayısı, $p<0,05$ Yöntemlere göre dozlar arasındaki farklılıkların önemi, A: Afyon, B: Ankara, C: Balıkesir, D: Denizli, E: Muğla)

Caco-2 hücre hattında Afyon iline ait zehirde MTT ve Nötral Kırmızı, Nötral Kırmızı ve LDH yöntemleri arasında; Ankara iline ait zehirde MTT ve LDH yöntemleri arasında; Balıkesir iline ait zehirde MTT ve Nötral Kırmızı, MTT ve LDH yöntemleri arasında; Denizli iline ait zehirde tüm yöntemler arasında; Muğla iline zehirde MTT ve Nötral Kırmızı, Nötral Kırmızı ve LDH yöntemleri arasında alınan sonuçlar bakımından anlamlı bir ilişki bulundu ($r>0,90$, $p<0,05$). Şekil 3.8’de T98G hücrelerinde MTT, Nötral Kırmızı ve LDH analizleri ile doza göre belirlenen yüzde sitotoksosite değerleri arasındaki ilişki gösterilmiştir.



Şekil 3.8. T98G hücrelerinde MTT, Nötral Kırmızı ve LDH analizleri ile doza göre belirlenen yüzde sitotoksikite değerleri arasındaki ilişki (r = Korelasyon Katsayısı, $p<0,05$ Yöntemlere göre dozlar arasındaki farklılıkların önemi, A: Afyon, B: Ankara, C: Balıkesir, D: Denizli, E: Muğla)

T98G hücre hattında Afyon iline ait zehirde; MTT ve Nötral Kırmızı, Nötral Kırmızı ve LDH yöntemleri arasında; Balıkesir iline ait zehirde MTT ve Nötral Kırmızı, Nötral Kırmızı ve LDH yöntemleri arasında; Denizli iline ait zehirde MTT ve LDH yöntemleri arasında; Muğla iline ait zehirde MTT ve LDH, Nötral Kırmızı ve LDH yöntemleri arasında alınan sonuçlar bakımında kuvvetli bir ilişki bulundu ($r>0,90$, $p<0,05$). Şekil 3.9’da arı zehirlerinin farklı apamin, melittin ve fosfolipaz A2 miktarları ve hücrelerin IC50 değerleri arasındaki ilişki gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Arı zehirlerinin farklı apamin, melittin ve fosfolipaz A2 miktarları ve hücrelerin IC50 ($\mu\text{g/mL}$) değerleri (A: Caco-2 hücrelerinde illere göre melittin miktarları-IC50 değerleri, B: T98G hücrelerinde illere göre melittin miktarları-IC50 değerleri, C: Caco-2 hücrelerinde illere göre apamin miktarları-IC50 değerleri, D: T98G hücrelerinde illere göre apamin miktarları-IC50 değerleri, E: Caco-2 hücrelerinde illere göre fosfolipaz A2 miktarları-IC50 değerleri, F: T98G hücrelerinde illere göre fosfolipaz A2 miktarları-IC50 değerleri)

Caco-2 hücrelerinde, arı zehirlerinin farklı melittin içerikleri ve tüm analiz yöntemleri ile hesaplanan IC50 değerleri arasında negatif korelasyon olduğu, illere göre değişen melittin miktarları ve Nötral Kırmızı, LDH analizlerinde hesaplanan IC50 değerlerinin istatistiksel bakımından önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$). T98G hücrelerinde ise arı zehirlerinin farklı melittin içerikleri ve tüm analiz yöntemleri ile hesaplanan IC50 değerleri arasında negatif korelasyon bulunmuş, MTT analizi ile hesaplanan IC50 değerlerinin istatistiksel bakımından önemli olduğu

görülmüştür ($p<0,05$). Caco-2 hücrelerinde MTT ve LDH analizleri sonucunda hesaplanan IC50 değerleri ve arı zehirlerinin farklı apamin miktarları arasında pozitif, Nötral Kırmızı analizinde negatif korelasyon bulunmuş, sonuçların istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). T98G hücrelerinde tüm analiz yöntemlerinde hesaplanan IC50 değerleri ve arı zehirlerinin farklı apamin miktarları arasında pozitif korelasyon bulunurken sonuçların istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). Caco-2 hücrelerinde tüm analiz yöntemlerinde hesaplanan IC50 değerleri ve arı zehirlerinin farklı fosfolipaz A2 miktarları arasında negatif korelasyon bulunurken, illere göre değişen fosfolipaz A2 miktarları ve MTT, LDH analizleriyle hesaplanan IC50 değerlerinin istatistiksel bakımından önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$). T98G hücrelerinde tüm analiz yöntemlerinde hesaplanan IC50 değerleri ve arı zehirlerinin farklı fosfolipaz A2 miktarları arasında negatif korelasyon bulunurken, illere göre değişen fosfolipaz A2 miktarları ve tüm analiz yöntemleriyle hesaplanan IC50 değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

4. TARTIŞMA

Ekosisteme önemli bir tozlaştırıcı role sahip olmaları yönüyle katkı sağlayan bal arıları, birçok arı ürünü üretmektedirler. Bal, propolis, arı sütü, arı poleni, bal mumu ve arı zehiri gibi ürünler biyoaktif bileşenler içermekte, yüzyıllardır farklı medeniyetler tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Al Naggar ve ark., 2021; Sevin ve ark., 2021). Apiterapi; arı veya ürünlerinin terapötik/koruyucu amaçla hastalıkların önlenmesinde veya tedavisinde kullanılmasıdır (Weis ve ark., 2022). Apiterapide kullanılan ürünlerden biri olan arı zehiri arıların kendilerini savunmak için kullandıkları önemli bir maddedir (Lyu ve ark., 2018). Arıların abdominal boşluklarındaki zehir bezlerinde bulunan arı zehiri; melittin, apamin, adolapin, mast hücre degranülasyon peptidi gibi biyolojik aktif birçok peptid, fosfolipaz A2, hyaluronidaz enzimleri, histamin, dopamin, norepinefrin gibi peptid olmayan bileşenler bulundurmaktadır (Habermann, 1972; Oršolić, 2012).

HPLC analiz yöntemi ile arı zehiri içeriğindeki bileşenler belirlenebilmektedir (Abd El-Wahed ve ark., 2019; Rybak-Chmielewska ve Szczesna, 2004). Çalışmamızda kullanılan arı zehirlerinin içerik analizleri yapılırken HPLC analiz yöntemi ve VWD dedektör kullanıldı. Analiz sonuçlarına göre melittin, apamin ve fosfolipaz A2 oranlarının iller arası farklılık gösterdiği belirlendi. Nedeninin ise arının ırkı, yaşadığı bölgenin iklim, bitki örtüsü coğrafi koşulları, zehirin elde edilmesinde kullanılan yöntemin farklılıklarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Anadolu bal arısı zehirleri ile ticari olarak elde edilen arı zehirlerinin kimyasal içerik bakımından karşılaştırıldığı bir çalışmada, HPLC-UV kullanılarak zehirlerin, melittin, apamin, fosfolipaz A2 içeriği ve HPLC-RID kullanılarak şeker profil analizi yapılmış, analiz edilen bu içeriklerin ticari arı zehri örneklerinde, Anadolu bal arısından toplanan zehire göre daha düşük olduğu, maltoz ve erloz dışında şeker içerikleri bakımından ise her iki grup arasında bir farklılık olmadığı belirtilmiştir (Samancı ve Kekeçoğlu, 2019).

Kanser malign hücelere dönüşen normal hücelerde ki genetik değışiklikler ile başlayan, çok aşamalı bir sürece sahip ve çok faktörlü heterojen bir hastalıktır. Bu hüceler kontrolsüz büyümeleri, invaziv olmaları ve bulundukları yerden uzak bölgelere metastaz yapmaları ile karakterizedir. Farklı kanser tipleri arasında, glioblastoma sık görülebilen ve agresif olan malign beyin tümörüdür (Fabiani, 2020). Kolorektal kanserler ise Avrupa’da yaygın olarak teşhis edilmekte ve kanser kaynaklı ölüm nedenlerinde ön sıralarda yer almaktadır (Cardoso ve ark., 2021).

Günümüzde, artan tümör prevalansında tedavide yeni ilaç ve stratejiler oluşturulması gerekliliğı doğmuştur (Lyu ve ark., 2018). Biyotoksinler sitotoksik özelliklerinden dolayı potansiyel antikanser ilaç adaylarıdır (Shin ve ark., 2016). Örneğın, biyotoksinler içerisinde yer alan yılan zehirlerinden *Bothrops jararaca* venomunun, tümör gelişimi, deney hayvanlarının hayatta kalma oranları ve EAT (Ehrlich asit tümör) ve fare peritoneal hücelerinde toksik/mitotik etkilerinin değeriendirildiğı bir çalışmada, zehirin %99 oranında tümör büyümesini engellediğı, hem tümör hem de peritoneal hücelerde toksik etki oluşturduğı bildirilmiştir (Da Silva ve ark., 2002). Son yıllarda da biyotoksinlerin antitümöral özelliklerine değinen çalışmalar yapılmıştır (Abdel-Ghani ve ark., 2019; Antolikova ve ark., 2019).

Terapötik bir ajan olarak veya geleneksel kanser tedavisinde tamamlayıcı olarak apiterapiden yararlanılmaktadır (Badria ve ark., 2017). Doğal biyoaktif moleküllerin, tümör hücresi davranışlarını değıştirdiğı, sinyal yollarını hedefleyerek hücelerin kanserleşme süreçlerine müdahale edebildiğı bilinmektedir (Fabiani, 2020). Bir biyotoksin olarak arılardan elde edilen arı zehiri, apoptozise neden olarak, hücre döngüsünün durmasını sağlayarak, nekrozise neden olarak ya da direkt litik etki göstererek antikanser etki göstermektedir (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2013; Huh ve ark., 2012).

Arı zehiri farklı yöntemler kullanarak elde edilebilmektedir. Farklı kanser tiplerine karşı bal arısı ürünlerinin potansiyel sitotoksik etkilerinin izlendiğı bir çalışmada arı zehirleri Mısır’da farklı bölgelerden, farklı teknikler kullanarak

toplanmış; ve arı zehirinin karaciğer (HeP-G2), meme (MCF-7) ve kolorektal (Caco-2) kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan arı zehirlerinin üç kanser hücre tipinde de sitotoksik etkili olduğu, hücre tipi ve zehirin toplanma yöntemine göre değişmekle birlikte hücrelerde %86,28 ile %93,92 arasında sitotoksik etki olduğu bulunmuştur (Badria ve ark., 2017). Diseke yöntem ile toplanan arı zehirindeki protein miktarının elektroşok aleti ile toplanan zehirdekine göre daha fazla olmasından dolayı kanser hücrelerinde daha yüksek inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda ise arı zehirlerini toplamak için kullandığımız yöntem elektroşok yöntemi olup diseke yöntemine göre daha pratik olması ve aynı anda birçok arıdan zehir toplanmasına olanak verdiği için tercih edildi.

Arı zehirinin hücre kültürüne ya da canlı organizmalara uygulanabilir forma gelmesi için bir çözücü yardımıyla homojen hale getirilmesi gerekmektedir. Arı ürünlerinin murin tümörlerde (meme ve kolon karsinoma); büyüme, metastaz yapma yeteneği, apoptoz ve nekrozun indüklenmesi bakımından etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada liyofilize arı zehiri distile su içerisinde farklı konsantrasyonları hazırlanarak çözündürülmüştür (Orsolice ve ark., 2003). Yapılan diğer çalışmalarda arı zehirinin, formik asit (Gauldie ve ark., 1976) fizyolojik tuzlu su (Khalil ve ark., 2021) ve çalışmamızda yaptığımız şekilde DMSO (Tusiimire ve ark., 2016) içerisinde de çözünebildiği gösterilmiştir.

Arı zehiri ve bileşenlerinin olası moleküler etkileri; hücrede, apoptozun indüklenmesi; anjiyogenez, metastaz ve proliferasyonun inhibisyonudur (Oršolić, 2012). Yapılan çalışmalarla zehir kuru maddesinin yaklaşık %50'sini oluşturan melittinin çeşitli kanser hücreleri üzerinde; antitümör (Kikuchi ve ark., 1989; Lazarev ve ark., 2002), anjiyogenezi ve metastazı engelleyici (Liu ve ark., 2008; Song ve ark., 2007), tümör hücre apoptozunu indükleyici ve hücre büyümesini engelleyici (Hu ve ark., 2010; Li ve ark., 2006) etkileri gösterilmiştir.

MTT, LDH, Nötral Kırmızı analizi, toksik maddeye maruziyette sitotoksitenin veya hücre canlılığının tespitinde en yaygın kullanılan yöntemlerdir (Fotakis ve Timbrell, 2006). Arı zehirinin hücrede neden olduğu sitotoksik etki mitokondriyal ya da diğer yollar ile gerçekleşebilmektedir. Sonuçların birbiri ile karşılaştırılarak sitotoksik etkinin oluşumunun genel anlamda değerlendirilmesi amacıyla bu tez çalışmasında üç yöntemde birlikte kullanılmıştır. Her üç analiz yöntemi ile de değerlendirildiğinde arı zehirinin kanser hücrelerinde hücre membran bütünlüğünü bozarak ve hücre metabolizmasını değiştirerek etki gösterdiği düşünülmektedir.

İn vitro olarak, K1735M2, fare melanoma ve *in vivo* olarak transplante edilebilir B16 melanomada arı zehirinin etkilediği potansiyel mekanizmaları araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, B16 murin melanoma hücreleri (20 µl, 1×10^6 hücre) C57BL/6 farelerine transplante edilmiştir. Tümör oluşumunun ardından deney grubuna 12 gün boyunca intraperitoneal yolla arı zehiri tedavisi uygulanmıştır. Hücrelerde primer tümör büyümesinin engellendiği, 1, 3, 9 mg/kg dozlarda uygulanan arı zehirinin tümör hücresinde oluşturduğu inhibisyonun yüzde oranlarının sırasıyla; 20; 52,8 ve 50,2 olduğu belirtilmiştir. *İn vitro* deneylerde K1735M2 hücrelerinde arı zehiri uygulamasının ardından 24 saatlik inkübasyon sonucunda MTT testi yapılmış, IC50 değeri 10 µg/mL olarak hesaplanmış ve 1,4-28 µg/mL konsantrasyon aralığında, arı zehiri uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kanser hücrelerinde önemli derece hücre büyümesinin engellendiği belirtilmiştir (Liu ve ark., 2002).

Yapılan başka bir çalışmada arı zehiri içeriğinde bulunan polipeptidlerin insan hepatoma hücre hattı SMMC-7721’de hücre büyümesini inhibe etmesi ve apoptoza neden oluşu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla incelenmiştir. Arı zehirinde bulunan polipeptidler laboratuvar ortamında ekstrakte edilmiş ve çeşitli konsantrasyonları SMMC-7721 hücrelerine uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından MTT testi yapılarak IC50 değeri hesaplanmış ve 6,68 µg/mL bulunmuştur. 10 µg/mL konsantrasyonda 8 saat inkübasyon sonucu hücrelerin canlılık oranı %67,3 olarak belirlenmiştir. *İn vivo* çalışmalarda ise logaritmik üreme fazında olan SMMC-7721 hücreleri (200 µl, 5×10^6) farelere implante edilmiş, tümör çapı 0,5 cm’e

ulaştığında deney grubuna 0,75; 1,5 ve 3 mg/kg dozlarda intraperitoneal yol ile arı zehiri polipeptidleri uygulanmıştır. Uygulamanın sonunda tümör çapları ve net ağırlıkları ölçülmüş, relatif tümör inhibisyonları hesaplanmıştır. Relatif tümör inhibisyonları 0,75; 1,5; 3 mg/kg dozlarda sırasıyla %18,7; %31,4 ve %48,2 olarak bildirilmiştir (Hu ve ark., 2010).

Arı zehirinin insan lösemi, U937 hücrelerinde, hücre büyümesi ve canlılığı üzerine potansiyel etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada hücrelere 0–3 µg/mL doz aralığında arı zehiri uygulanarak, hücreler 48 saat inkübe edilmiştir. Zehir uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında zehirin, yüksek dozlarda (2-3 µg/mL) hücre büyümesini ve canlılığını önemli derecede azalttığı, 2 µm dan fazla uygulamalarda hücrenin küçülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşumu gözlemlenmiştir (Moon ve ark., 2006).

Bal arısı zehiri ile yüklü sitozan nanopartiküllerinin farklı kanser hücre hatları üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada arı zehirinin doza bağlı kanser hücrelerinin büyümesini engellediği, tüm kanser hücre hatlarının arı zehirine, boş nanopartiküllere ve arı zehiri yüklü nanopartiküllere karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir. Arı zehiri uygulanan hücreler 24 saat inkübe edilmiş ve MTT testi ile IC50 değerleri hesaplanmıştır. Kolorektal (Caco-2), larinks (Hep-2) ve meme (MCF-7) hücrelerinde IC50 değerleri sırasıyla; 9,2; 8,11 ve 10,70 µg/mL hesaplanırken arı zehiri yüklü nanaopartiküllerin uygulandığı Caco-2 HeP-G2 ve MCF7 hücrelerinde IC50 değerleri sırasıyla 7,7; 8,6 ve 8,0 588 µg/mL hesaplanmıştır (El-Dek ve ark., 2019).

Setuximab ve arı zehiri kombinasyonunun kolon kanseri hücre hatlarında sinerjistik etkilerinin çalışıldığı bir araştırmada; setuximab, arı zehiri ve kombinasyonlarının sitotoksik etkinliklerinin değerlendirilmesi için uygulamaların ardından 48 saat sonra MTT canlılık testi yapılmış; HCT-116 ve Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde IC50 değerleri sırasıyla 13 µg/mL ve 10,5 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Shadeed ve ark., 2022).

Arı zehiri ve bileşenlerinin Hs683, T98G ve U373 insan glioma hücrelerinde antikanser özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada hücrelere arı zehiri ve melittin uygulaması yapılmış ve 72 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonrası MTT testi ile IC50 değerleri hesaplanmıştır. Hs683, T98G ve U373 hücrelerinde IC50 değerleri arı zehiri için sırasıyla 7,12; 15,35 ve 7,60 µg/mL, melittin için 7,77; 31,53 ve 12,34 µg/mL bulunmuştur. (Lebel ve ark., 2021).

Arı zehirinin, sitotoksik, antiproliferatif, antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada; farklı kovanlardan erişkin işçi arılar rastgele seçilmiş, zehir bezleri stereo mikroskop altında diseke edilmiştir. Zehir bezlerinin santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatant liyofilize edilmiş ve tümörojenik C6, HT29, HeLa hücreleri ve Vero hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. LDH analizi yapılmış ve arı zehirinin konsantrasyona bağlı olarak yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği, arı zehiri uygulanmamış kontrol grubu ile kıyaslandığında hücrelerin sayısının azaldığı, küçüldüğü, hücrede apoptotik cisim ve atipik kenarların oluşumunun gözlemlendiği belirtilmiştir. IC50 değerinde ki konsantrasyonda, hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin şiddeti oldukça belli olup, hücrelerin fibroblast benzeri görünümünü kaybettiği, parçalandığı ve dejenere olduğu belirtilmiştir (Gülmez ve ark., 2017).

Çalışmamızda aynı yöntemler kullanılarak, aynı hücre hattı için bulduğumuz IC50 değerleri arasındaki farklılıkların, farklı illerden elde edilen arı zehirlerinin içerik miktarlarından; arıların farklı ırk ve alt türlere ait olabileceğinden, zehirin yaşadıkları coğrafi bölge ve iklime bağlı değişkenlik gösterebileceğinden, arı zehirinin ekstraksiyonunda veya çözündürülmesinde kullanılan çözücülerin kimyasal özelliklerinden ve/veya farklı laboratuvar koşullarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenler göz önüne alındığında farklı illere ait zehirlerin sitotoksik etkinlikleri değişkenlik göstermektedir. En düşük IC50 değerleri MTT canlılık analizinde her iki hücre hattı için Denizli ilinde, Nötral Kırmızı analizinde Caco-2 hücreleri için Balıkesir, T98G hücreleri için Denizli ilinde, LDH analizinde ise her iki hücre hattı için Denizli ilinde bulundu.

Daha önce yapılan çalışmalarda arı zehirinin sitotoksik özelliğinin melittin kaynaklı olabileceği gösterilmiştir. Çalışmamızda tüm zehirlerin içerik miktarları incelendiğinde en yüksek melittin oranına sahip zehirin Denizli, en düşük zehirin Afyon ilinden elde edilende olduğu belirlendi. Caco-2 ve T98G hücrelerinde, MTT ve LDH analizlerine göre Denizli ilinin IC50 değeri göz önüne alındığında diğer illere oranla daha yüksek melittin ve fosfolipaz A2 içeriğine sahip olduğu, yüksek sitotoksik etkinliğinin bu maddeler ile ilişkili olabileceği ancak arı zehiri içerisinde bulunan başta apamin olmak üzere diğer bileşenlerinde potansiyel sitotoksik etkilerinin olabileceği düşünülmektedir. Her üç analiz yönteminin sonuçlarına göre, zehirinin mitokondriyal sinyal yollarını, hücre zarı yapısını, hücre metabolizmasını etkileyerek ve/veya lizozomal hasara neden olarak, sitotoksositeye neden olabileceği görüldü. IC50 değerleri göz önüne alındığında Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğin T98G hücrelerindeki kadar düşük olduğu anlaşılmaktadır. T98G hücrelerinin arı zehirine daha duyarlı olmasının nedeni olarak hücrelerin farklı metabolik aktiviteye ve fiziksel yapıya sahip olması düşünüldü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Apiterapi hastalıklara karşı koruyucu amaçla ve/veya hastalıkların tedavi edilmesi için arı ürünlerinin kullanılmasıdır. Apiterapi kapsamında bal başta olmak üzere birçok arı ürününden faydalanılmaktadır. Bu ürünlerden biri olan arı zehiri içeriğinde bulundurduğu aktif bileşenler sayesinde farmakolojik bakımdan önemlidir. Birçok doğal üründe olduğu gibi arı zehirinde de içerik miktarları, birçok değişkene bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Ülkemiz arıcılık bakımından oldukça önemli bir potansiyele sahip olup birçok bölgesinde arıcılık yapılmaktadır. Bu çalışmanın sonuçlarının, ülkemizin farklı illerinde bulunan arılardan elde edilen zehir içeriklerinin karşılaştırılması ve farklı kanser hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin belirlenmesi bakımından bilimsel çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Literatürde, Türkiye’de Afyon, Ankara, Balıkesir, Denizli ve Muğla illerinde yetiştiriciliği yapılan bal arılarından elde edilen zehir içeriğinin belirlenerek kolorektal adenokarsinoma ve glioblastoma multiforme kanser hücre hatlarında sitotoksik etkinliğinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği çalışmalara rastlanmamıştır. Buna istinaden çalışmamız Türkiye’de ki farklı illerden elde edilen bal arısı zehirlerinin bileşiminde ki apamin, fosfolipaz A2 ve melittin oranlarının belirlenmesi ve antikanserojenik etkinliklerinin karşılaştırmalı olarak ortaya konulması bakımından önemlidir.

Çalışma kapsamında öncelikle arılardan zehir elde etmek için günümüzde sıklıkla tercih edilen yöntemlerden birisi olan elektroşok yöntemi kullanılarak arı zehirlerinin elde edilmesi planlanmıştır. Afyon, Ankara, Balıkesir, Denizli, Muğla illerinde yetiştiriciliği yapılan bal arılarından toplanan zehirler uygun muhafaza şartlarına uyularak içerik analizlerinin yapılması için Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Gıda Analizleri Uygulama ve Araştırma Merkezi’ne ulaştırılmıştır. Analizler Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Gıda Analizleri Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından gerçekleştirilmiştir.

Kanser tedavisi ve/veya kanserden korunmada günümüzde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler, adjuvant tedavi, immunoterapi, akıllı ilaçlar gibi belli başlı yöntemlerin kullanılmasının yanı sıra alternatif/tamamlayıcı yöntemlerden de destekleyici ve/veya tedavi edici amaçlarla yararlanıldığı bilinmektedir. Geleneksel tedavi yöntemleri olarak bilinen batı tıbbını destekleyici ve tamamlayıcı amaçlarla kullanılan yöntemlerden biri olan apiterapi kapsamında birçok arı ürününden faydalanılmaktadır. Bu ürünler içerisinde yer alan bal arısı zehiri içeriğinde bulundurduğu bileşenlerden dolayı sağlıklı ve kanserli hücreler üzerinde birçok biyolojik ve yan etkilere neden olabilmektedir. Ancak direkt toksik etkisinden dolayı arı zehiri kullanımı sınırlıdır. Terapötik amaçlı kullanımlarının geliştirilmesi için kapsamlı klinik öncesi çalışmalar gerekmektedir.

Çalışma kapsamında *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında arı zehirlerinin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkinliği değerlendirilmiştir. Hücrelerin zehir uygulandıktan sonra 24 saatlik inkübasyonları sonucu morfolojik görünimleri incelendiğinde zehirin Caco-2 ve T98G hücrelerinin proliferasyonunu artıran konsantrasyona bağlı olarak engellediği görülmüştür. Hücre canlılıkları MTT, Nötral Kırmızı ve LDH testleri ile değerlendirilmiş ve IC50 değerleri hesaplanmıştır. Hücre hatları arasında, genel olarak canlılık test yöntemleri, dozlar ve alınan cevaplar arasında ilişki bulunmuştur.

MTT analizine göre her iki hücre hattı için IC50 değeri en yüksek Afyon, en düşük Denizli ilinde bulunmuştur. Nötral Kırmızı analizine göre IC50 değeri en yüksek olan il Caco-2 ve T98G hücreleri için Afyon iken, en düşük Caco-2 hücreleri için Balıkesir, T98G için Denizlidir. LDH analizi ile hesaplanan IC50 değerleri Caco-2 hücrelerinde en yüksek Afyon en düşük Denizli ilinde bulunurken T98G için en yüksek Ankara en düşük Denizli’de bulunmuştur. Hücre hatlarında genel anlamda doz artışı ve %sitotoksosite yanıtları arasında pozitif ilişki, yöntemlere göre dozlara alınan cevaplar bakımından paralellik ve yöntemler arasında korelasyon bulunmuştur.

Caco-2 ve T98G hücrelerinde, arı zehirlerinin farklı melittin ve fosfolipaz A2 içerikleri ve tüm analiz yöntemleri ile hesaplanan IC50 değerleri arasında negatif bir ilişki bulunmuştur. Caco-2 hücrelerinde MTT ve LDH analizleri sonucunda hesaplanan IC50 değerleri ve arı zehirlerinin farklı apamin miktarları arasında pozitif, Nötral Kırmızı analizinde negatif korelasyon bulunmuş, sonuçların istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). T98G hücrelerinde tüm analiz yöntemlerinde hesaplanan IC50 değerleri ve arı zehirlerinin farklı apamin miktarları arasında pozitif korelasyon bulunurken sonuçların istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). Caco-2 hücrelerinde tüm analiz yöntemlerinde hesaplanan IC50 değerleri ve arı zehirlerinin farklı fosfolipaz A2 miktarları arasında negatif korelasyon bulunurken, illere göre değişen fosfolipaz A2 miktarları ve MTT, LDH analizleriyle hesaplanan IC50 değerlerinin istatistiksel bakımından önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$). T98G hücrelerinde tüm analiz yöntemlerinde hesaplanan IC50 değerleri ve arı zehirlerinin farklı fosfolipaz A2 miktarları arasında negatif korelasyon bulunurken, illere göre değişen fosfolipaz A2 miktarları ve tüm analiz yöntemleriyle hesaplanan IC50 değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Caco-2 hücrelerinde, MTT analizi ile hesaplanan IC50 değerlerinde; Afyon ve Denizli, Ankara ve Balıkesir, Ankara ve Denizli; LDH analizinde Afyon ve Denizli illerine ait zehirler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). T98G hücrelerinde MTT analizi ile hesaplanan IC50 değerlerinde Afyon ve Denizli, Ankara ve Denizli, Balıkesir ve Denizli, Denizli ve Muğla; Nötral Kırmızı analizinde Afyon ve Denizli, Ankara ve Denizli, Denizli ve Muğla illerine ait zehirler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Apiterapi kapsamında yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde arı zehiri geleneksel tedavi yöntemleri içinde önemli bir yere sahiptir. Sitotoksik etkisi düşünüldüğünde kanser tedavisi için potansiyel bir antikanser ajan olma özelliği vardır. Çalışma kapsamında elde edilen arı zehirlerinin farklı hücrelerde ki sitotoksik etkinliklerinin daha detaylı anlaşılabilmesi için hangi moleküler mekanizmlar üzerinden etki gösterdiğinin araştırılması gerekmektedir. Arı zehirinin sitotoksik etkinliğinden sorumlu olduğu düşünülen melittin gibi sağlıklı hücreler içinde sitolitik

etkiye sahip maddeler içeren ürünlerin, sitotoksitesinden istenilen amaçla yararlanabilmek ve kanser hücrelerine seçici olmasını sağlamak için uygulanabilir formda geliştirilmesi adına geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.



ÖZET

Türkiye’de Bulunan Arı Irklarından Elde Edilecek Arı Zehiri Bileşiminin Analizi ve Antikanserojen Etkilerinin İn Vitro Olarak Araştırılması

Apiterapi, arı ürünlerinin, tamamlayıcı olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde ve/veya hastalıklardan korunmak amacıyla kullanılmasıdır. Bu doktora tez çalışmasında, ülkemizde Afyon, Ankara, Balıkesir, Denizli, Muğla illerinde ki *Apis mellifera* L. arılarından zehirlerin elektroşok yöntemi kullanılarak elde edilmesi, bu zehirlerin apamin, fosfolipaz A2 ve melittin bakımından içerik analizlerinin yapılması, zehirlerin kolorektal adenokarsinoma ve glioblastoma multiforme kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkinliklerinin ortaya konulması hedeflenmektedir. Çalışmada, işlem yapılmayan negatif kontrol grubu, çözücü kullanılan çözücü kontrol grubu, Afyon-Ankara-Balıkesir-Denizli-Muğla illerinden elde edilen bal arısı zehirlerinin uygulandığı gruplar ve triton-x uygulanan pozitif kontrol grubu olmak üzere *in vitro* deney grupları oluşturulmuştur. İlk olarak, kovanlara yerleştirilen arı zehiri toplama aleti yardımıyla ve elektroşok yöntemiyle, arılara zarar vermeden, zehir örnekleri toplanmıştır. DMSO içerisinde arı zehirlerinin farklı konsantrasyonları oluşturulmuştur. Arı zehirleri Caco-2 ve T98G hücrelerine uygulanarak 24 saat inkübe edilmiş ve süre bitiminde yüzde hücre canlılıkları MTT, Nötral Kırmızı ve LDH analiz yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Her iki hücre hattında da tüm arı zehirlerine ait IC50 değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş, her iki hücre hattında da yüzde sitotoksikite cevaplarında konsantrasyona bağlı artış görülmüştür. Sonuçlar istatistiki bakımdan değerlendirilmiştir. MTT ve LDH analizlerine göre her iki hücre hattında da, Nötral Kırmızı analizinde ise sadece T98G hücrelerinde sitotoksik etkinliği en fazla olan arı zehirinin Denizli olduğu belirlenmiştir. Nötral Kırmızı analizine göre Caco-2 hücreleri için sitotoksik etkinliği en fazla olan il Balıkesir olarak belirlenmiştir. Caco-2 hücrelerinde Denizli ilinden elde edilen zehirin IC50 değeri MTT analiziyle $12,42 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$, LDH analiziyle $8,19 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$, T98G hücre hattında MTT analiziyle $5,98 \pm 0,40 \mu\text{g/mL}$, LDH analiziyle $5,04 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. Caco-2 hücrelerinde MTT, Nötral Kırmızı ve LDH analizlerinde, sitotoksik etkinlik en düşük Afyon ilinde bulunmuş ve IC50 değerleri sırasıyla; $18,08 \pm 1,31 \mu\text{g/mL}$, $14,72 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, $19,52 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. T98G hücrelerinde ise en düşük sitotoksik etki MTT ve Nötral Kırmızı analizlerinde Afyon ilinde, LDH analizinde Ankara ilinde belirlenmiştir. Arı zehirlerinin değişen apamin, melittin ve fosfolipaz A2 miktarları ve hücreler üzerinde ki sitotoksik etkinlikleri değerlendirilmiş ve genel anlamda zehirlerin melittin, fosfolipaz A2 miktarları ve IC50 değerleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Belirtilen değerlendirmeler doğrultusunda, çalışmamızdaki arı zehirlerinin etkinliği ve etki mekanizmalarının daha kapsamlı değerlendirilmesi için, farklı inkübasyon süreleri ve konsantrasyonlarda da değerlendirilmeleri, hücre içi etki mekanizmalarının araştırılması ve araştırmaların *in vivo* deneylerle desteklenmesi yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Apis mellifera* L., Arı Zehiri, Glioblastoma Multiforme, Hücre Kültürü, HPLC, Kolorektal Kanser

SUMMARY

Analysis of Bee Venom Active Compounds from Bee Species of Turkey and Investigation of Its Potential InVitro Anticarcinogenic Effects

Apitherapy is the use of bee products as complementary, for the treatment and/or prevention of various diseases. In this PhD thesis we aimed to collect bee venom via electroschock method from *Apis mellifera* L. in Afyon, Ankara, Balıkesir, Denizli, Muğla province in Turkey, analysis of their contents in terms of apamine, phospholipase A2 and melittine and determination of their cytotoxic effects on both colorectal adenocarcinoma and glioblastoma multiforme. *In vitro* experimental groups were designed as negative control group without any treatment, solvent control group with only applied solvent, bee venom groups of Afyon-Ankara-Balıkesir-Denizli-Muğla and positive control group applied triton-x. Initially samples were collected with bee venom collection device placed on the hives and by the electroschock method without harming the bees. Bee venom solutions were prepared using DMSO and diluted different concentrations. These dilutions were applied to Caco-2 and T98G cell lines and cells were incubated 24 hours. At the end of the period, cells viability were determined using MTT, Neutral Red and LDH analysis methods. IC50 values of all bee venoms were calculated for both cell lines. A dose dependent increase observed in cytotoxicity responses in both cell lines. Cytotoxic activity in both cell lines in MTT and LDH analysis and only in T98G cell line in Neutral Red analysis belongs to the poison that belongs to Denizli province. According to Neutral Red analysis in Caco-2 cell lines, the highest cytotoxic activity belongs to Balıkesir province. In Caco-2 cell lines, IC50 values of bee venom that belongs to Denizli was founded in MTT and LDH analysis; $12,42 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ and $8,19 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$ whereas in T98G cell lines, $5,98 \pm 0,40$ and $5,04 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ respectively. According to MTT, Neutral Red and LDH analysis, in Caco-2 cell lines, the lowest cytotoxic activity was found in bee venom that belongs to Afyon and IC50 values were found $18,08 \pm 1,31 \mu\text{g/mL}$, $14,72 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, $19,52 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$. In MTT and Neutral Red analysis, in T98G, the lowest cytotoxic activity belongs to Afyon province whereas Ankara in LDH analysis. Variable values of apamin, melittin and phospholipase A2 of bee venoms and the cytotoxic effects on the cells were determined and it was found that there is a negative correlation between the venoms and IC50. In order to more comprehensive evaluations of the efficacy and mechanism of action of bee venoms, it would be beneficial to support this *in vitro* experimental data with *in vivo* studies, investigating the intracellular mechanism of action and evaluating the different incubation times and concentrations.

Key words: *Apis mellifera* L, Bee Venom, Cell Culture, Colorectal Cancer, Glioblastoma Multiforme HPLC

KAYNAKLAR

- ABD EL-WAHED AA, KHALIFA SA, SHEIKH BY, FARAG MA, SAEED A, LARIK FA, KOCA-CALISKAN U, ALAJMI MF, HASSAN M, WAHABİ HA, HEGAZY MEF, ALGETHAMİ AF, BUTTNER S, EL-SEEDI HR (2019). Bee venom composition: from chemistry to biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, **60**: 459-484.
- ABDEL-GHANI LM, RAHMY TR, TAWFİK MM, KAZIRI I, AL-OBALDI A, ROWAN EG, PLEVİN R, ABDEL-RAHMAN MA (2019). Cytotoxicity of Nubein6.8 peptide isolated from the snake venom of *Naja nubiae* on melanoma and ovarian carcinoma cell lines. *Toxicon*, **168**: 22-31.
- ABDELA N, JILO K (2016). Bee venom and its therapeutic values: A review. *Advances in Life Science and Technology*, **44**: 18-22.
- AĞAN AF, KEKEÇOĞLU M (2020). Melittin ve kanser tedavisi: Nanoteknolojik bakış açısı. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **20**: 221-231.
- AKKAYA H, ALKAN S (2007). Beekeeping in Anatolia from the Hittites to the present day. *Journal of Apicultural Research*, **46**: 120-124.
- AKKOCA AN, YANIK S, OZDEMİR ZT, CİHAN FG, SAYAR S, CİNCİN TG, ÇAM A, OZER C (2014). TNM and modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **7**: 2828.
- AKSİT H, BİLDİK A (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **19**: 55-63.
- AKYOL E (2015). Arı sütünün yapısı, insanlar ve arılar için önemi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **15**: 16-21.
- AL NAGGAR Y, GIESY JP, ABDEL-DAİM MM, JAVED ANSARI M, AL-KAHTANI SN, YAHYA G (2021). Fighting against the second wave of COVID-19: Can honeybee products help protect against the pandemic?. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **28**: 1519-1527.
- ALİ MAASM (2012). Studies on Bee venom and its medical uses. *International Journal of Advancements in Research and Technology*, **1**: 69-83.
- ALİUSTAOĞLU M (2009). Temel kanser fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, **22**: 46-49.
- ALTINTAŞ L, BEKTAŞ N (2019). Apiterapi: 1. Arı zehri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **19**: 82-95.
- ALTINSOY S (2010). Kinapril HCL ve hidroklorotiyazidi birlikte içeren kombine farmasötik preparatlardan bu maddelerin aynı anda analizi için yeni kromatografik yöntem geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ANNILA I (2000). Bee venom allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, **30**: 1682-1687.
- ANTOLIKOVA NR, KELLO M, ZIGOVA M, TISCHLEROVA V, PETRILLA V, PIRNIK Z, MOJZISOVA G, MOJZIS J (2019). *Naja ashei* venom induces mitochondria-mediated apoptosis in human colorectal cancer cells. *Acta Biochimica Polonica*, **66**: 207-213.
- ARIGÜL APAN M, ZORBA M, KAYABOYNU Ü (2021). Bal arısı ve bal arısı ürünleri. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **6**: 202-223.

- ATABİLEN B, AKBULUT G (2019). Different mechanisms and the role of nutrition in the formation of colorectal cancer. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, **39**: 89–107.
- ATTIA WY, GABRY MS, EL-SHAikh KA, OTHMAN GA (2008). The anti-tumor effect of bee honey in Ehrlich ascite tumor model of mice is coincided with stimulation of the immune cells. *Egypt J Immunol*, **15**: 169–183.
- AYDIN Y, TEKEOĞLU İ (2018). Tamamlayıcı tıp ve güncel apiterapi uygulamaları. *Journal of Biotechnolgy and Strategic Health Research*, **2**: 64–73.
- AYGÜN G, AKBULAK C (2017). Ardahan ili organik hayvancılık potansiyelinin değerlendirilmesi. *Dumlupınar Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, **53**: 144–161.
- BACHMAYER H, KREIL G, SUCHANEK G (1972). Synthesis of promelittin and melittin in the venom gland of queen and worker bees: Patterns observed during maturation. *Journal of Insect Physiology*, **18**: 1515–1521.
- BADRIA F, FATHY H, FATEHE A, ELIMAM D, GHAZY M (2017). Evaluate the cytotoxic activity of honey, propolis, and bee venom from different localities in Egypt against liver, breast, and colorectal cancer. *Journal of Apitherapy*, **2**: 1–4.
- BAEK YH, HUH JE, LEE JD, CHOI DY, PARK DS (2006). Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by α 2-Adrenoceptors. *Brain Research*, **1073**: 305–310.
- BARAN OE (2010). Kolorektal kanser tanılı hastaların yakınlarında kanserde korunmaya yönelik tutum ve davranış değişikliklerinin değerlendirilmesi. Doktora Tezi. İzmir. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı.
- BARBAROS B, DIKMEN M (2015). Kanser İmmünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **31**: 177–181.
- BEKTAŞ N, ALTINTAŞ L, TUTUN H, SEVIN S (2016). Apiterapide arı zehirinin kullanımı. 5. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, Muğla, Türkiye. s.:352-353.
- BENTON AW, MORSE RA, STEWART JD (1963). Venom collection from honey bees. *Science*, **142**: 228–230.
- BOGDANOV S (2016). Bee Venom: production, composition, quality. In: The Bee Venom Book, Chapter 1. Muehlethurnen, Switzerland. Erişim Adresi: [www.bee-hexagon.net]. Erişim Tarihi:12/11/2021.
- BOVI TS, ONARI P, SANTOS SAA, JUSTULIN LA, ORSI RO (2017). Apitoxin harvest impairs hypopharyngeal gland structure in Apis mellifera honey bees. *Apidologie*, **48**: 755–760.
- BUKU A, PRICE JA (2001). Further studies on the structural requirements for mast cell degranulating (MCD) peptide-mediated histamine release. *Peptides*, **22**: 1987–1991.
- BURUCU, V (2021). Ürün Raporu Arıcılık. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü. Erişim Adresi:[https:arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge]. Erişim Tarihi: 23/7/2022.
- BURUCU V, GÜLSE BAL HS (2018). Arıcılık işletmelerinin pazarlama olanakları: Kastamonu İli Azdavay İlçesi örneği. *TEAD*, **4**: 23–35.
- BÜYÜKDOĞAN M (2009). Kolorektal kanserde genetik ve etyolojik faktörler. *Selçuk Tıp Derg*, **25**: 171–180.
- CALVERT PM, FRUCHT H (2002). The genetics of colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine*,

137: 603–612.

- CANDA AE, TERZİ C (2008). Kalıtsal kolorektal kanser ve polipozis sendromları. *Kolon ve Rektum Hastalıkları Dergisi*, **18**: 53–62.
- CAO Y, YU RQ, LIU Y, ZHOU HX, SONG LL, CAO Y, QIAO DR (2010). Design, recombinant expression, and antibacterial activity of the cecropins-melittin hybrid antimicrobial peptides. *Current Microbiology*, **61**: 169–175.
- CARDOSO R, GUO F, HEISSER T, HACKL M, IHLE P, DE SCHUTTER H, VAN DAMME N, VALERIANOVA Z, ATANASOV T, MAJEK O, MUZIK J, NILBERT MC, TYBJERG AJ, INNOS K, MAGI M, MALILA N, BOUVIER AM, BOUVIER V, LAUNOY G, WORONOFF AS, CARIOU M, ROBASZKIEWICZ M, DELAFOSSE P, PONCET F, KATALINIC A, WALSH PM, SENORE C, ROSSO S, VINCERZEVSKE I, LEMMENS V, ELFERINK MAG, JOHANNESSEN TB, KORNER H, PFEFFER F, BENTO MJ, RODRIGUES J, ALVES DA COSTA F, MIRANDA A, ZADNIK V, ZAGAR T, LOPEZ DE MUNAIN MARQUES A, MARCOS-GRAGERA R, PUIGDEMONT M, GÁLGERAN J, CARULLA M, CHIRLAQUE MD, BALLESTA M, SUNDQUIST K, SUNDQUIST J, WEBER M, JORDAN A, HERRMANN C, MOUSAVI M, RYZHOV A, HOFFMEISTER M, BRENNER H (2021). Colorectal cancer incidence, mortality, and stage distribution in European countries in the colorectal cancer screening era: an international population-based study. *The Lancet Oncology*, **22**: 1002–1013.
- CARPENA M, NUNEZ-ESTEVEZ B, SORIA-LOPEZ A, SIMAL-GANDARA J (2020). Bee venom: An updating review of its bioactive molecules and its health applications. *Nutrients*, **12**: 3360.
- CERAN D, DEMİRHAN İ (2011). DNA onarım mekanizmasında meydana gelen mutasyonların kolorektal kanser oluşumundaki rolü. Bitirme Ödevi, Kayseri. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- CHANG SN, KIM SH, KIM HJ, JEONG YJ, LEE KC (2022). In vitro and in vivo investigation of the radiation-sensitizing effects of melittin in breast cancer cells. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **28**: 1–10.
- CHEN HHW, KUO MT (2017). Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget*, **8**: 62742–62758.
- CORNARA L, BIAGI M, XIAO J, BURLANDO B (2017). Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in Pharmacology*, **8**: 412.
- ÇAĞLIYAN A (2015). Bitlis İli'nde arıcılık faaliyetleri. *Coğrafya Dergisi*, **30**: 1–25.
- ÇAPRAZLI T, KEKEÇOĞLU M (2021). Bal arısı zehirinin kompozisyonunu ve üretim miktarını etkileyen faktörler. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **21**: 132–145.
- ÇELİK K (2019). Apiterapi El Kitabı. Ankara: Sonçağ Akademi Yayınları, 2. Baskı.
- ÇEVİRİMLİ MB, SAKARYA E (2018). Türkiye arıcılık sektöründe mevcut durum, sorunlar ve çözüm önerileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **15**: 58–67.
- DA SILVA RJ, DA SILVA MG, VILELA LC, FECCHIO D (2002). Antitumor effect of Bothrops jararaca venom. *Mediators of Inflammation*, **11**: 99–104.
- DALLY JE, MONCK MA (2020). Biotechnology products: validation of analytical methods. *In Specification of Drug Substances and Products*, **22**: 587-603.
- DAVIS PH (1982). Flora of Turkey and East Aegean Islands. Edinburg: University Press, 7. Baskı.

- DE GRAAF DC, BROCHETTO BRAGA MR, DE ABREU RMM, BLANK S, BRIDTS CH, DE CLERCK LS, DEVREESE B, EBO DG, FERRIS TJ, HAGENDORENS MM, JUSTO JACOMINI DL, KANCHEV I, KOKOT ZJ, MATYSIAK J, MERTENS C, SABATO V, VAN GASSE AL, VAN VAERENBERGH M (2021). Standard methods for *Apis mellifera* venom research. *Journal of Apicultural Research*, **60**: 1–31.
- DEMPSEY CE (1990). The actions of melittin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes*, **1031**: 143–161.
- DENISOW B, DENISOW-PIETRZYK M (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the science of food and agriculture*, **96**: 4303–4309.
- DEREBAŞI E, CANBAKAL E (2009). Arı zehirinin kimyasal yapısı ve tıbbi çalışmalarda kullanımı. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, **2**: 32–34.
- DE VITA JR VT, CHU E (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, **68**: 8643–8653.
- DO N, WEINDL G, GROHMANN L, SALWICZEK M, KOKSCH B, KORTING HC, SCHAFER-KORTING M (2014). Cationic membrane-active peptides - anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin. *Experimental Dermatology*, **23**: 326–331.
- DOĞAN N, HAYOĞLU İ (2012). Propolis ve kullanım alanları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, **16**: 39–48.
- DOĞAROĞLU M (2007). Beekeeping Potential of Turkey. 1st Balkan Countries Beekeeping Congress, İstanbul, Turkey. p.: 29.
- DOTIMMAS EM, HAMID KR, HIDER RC, RAGNARSON U (1987). Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **911**: 285–293.
- EL-DEK SI, HASSAN MI, MOHAMED AF, ABDEL WAHAB AWK (2019). Apoptotic and necrotic effects of chitosan nanoparticles loaded with the honeybee, *Apis Mellifera* venom on different cancer cell lines. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **49**: 115–122.
- EL-SEEDI H, EL-WAHED AA, YOSRI N, MUSHARRAF SG, CHEN L, MOUSTAFA M, ZOU X, AL-MOUSAWI S, GUO Z, KHATIB A, KHALIFA S (2020). Antimicrobial properties of *apis mellifera*'s bee venom. *Toxins*, **12**: 451.
- ELIEH ALİ KOMİ D, SHAFAGHAT F, ZWIENER RD (2018). Immunology of bee venom. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, **54**: 386–396.
- ELMORE S (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, **35**: 495–516.
- ELSAYED N, EL-DIN HS, ALTEMIMI AB, AHMED HY, PRATAP-SINGH A, ABDELMAKSOUH TG (2021). In vitro antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Egyptian Citrus Beebread. *Molecules*, **26**: 2433.
- ERKEKOĞLU P, BAYDAR T (2021). Güncel in vitro sitotoksikite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, **41**: 45–63.
- FABIANI R (2020). Antitumoral properties of natural products. *Molecules*, **25**: 650.
- FAROOQUI T, A FAROOQUI A (2010). Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: A critical review. *Current Nutrition & Food Science*, **6**: 186–199.

- FENNELL JF, SHIPMAN WH, COLE LJ (1968). Antibacterial action of melittin, a polypeptide from bee venom. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **127**: 707–710.
- FIRATLI Ç, GENÇ F, KARACAOĞLU M, GENÇER HV (2000). Türkiye arıcılığının karşılaştırmalı analizi, sorunlar-öneriler. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, Ankara. s: 811–825.
- FIRATLI Ç (1987). Races of honey bees. Training course on apiculture at Development Foundation of Turkey. A. İnci (ed.) FAO. Ankara.
- FOTAKIS G, TIMBRELL JA (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, **160**: 171–177.
- FRANGIEH J, SALMA Y, HADDAD K, MATTEI C, LEGROS C, FAJLOUN Z, EL OBEID D (2019). First characterization of the venom from *Apis mellifera syriaca*, a honeybee from the middle east region. *Toxins*, **11**: 191.
- GAJSKI G, GARAJ-VRHOVAC V (2013). Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **36**: 697–705.
- GAULDIE J, HANSON JM, RUMJANEK FD, SHIPOLINI RA, VERNON CA (1976). The peptide components of bee venom. *European Journal of Biochemistry*, **61**: 369–376.
- GEBARAA ECE, PUSTIGLIONI AN, DE LIMA LAPA, MAYER MPA (2003). Propolis extract as an adjuvant to periodontal treatment. *Oral health & preventive dentistry*, **1**: 29–35.
- GHISALBERTI EL (1979). Propolis: A review. *Bee World*, **60**: 59–84.
- GOODENBERGER ML, JENKINS RB (2012). Genetics of adult glioma. *Cancer Genetics*, **205**: 613–621.
- GREEN JM (1996). Peer reviewed: A practical guide to analytical method validation. *Analytical chemistry*, **68**: 305A-309A.
- GU H, HAN SM, PARK KK (2020). Therapeutic effects of apamin as a bee venom component for non-neoplastic disease. *Toxins*, **12**: 195.
- GÜLLÜ İH, AKALIN İ (2005). Metastaz Biyolojisi. *Üroonkoloji Dergisi*, **4**: 16–19.
- GÜLMEZ Y, AYDIN A, CAN İ, TEKİN Ş, CACAN E (2017). Cellular toxicity and biological activities of honey bee (*Apis mellifera* L.) venom. *Marmara Pharmaceutical Journal*, **21**: 251–260.
- GÜR D, SOYSAL Mİ, KEKEÇOĞLU M. (2018). Trakya ve Yığılca bal arılarının morfolometrik yöntemlerle karşılaştırılması. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, **15**: 14–25.
- HABERMANN E (1972). Bee and wasp venoms: The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science*, **177**: 314–322.
- HABRYKA C, KRUCZEK M, DRYGAS B (2016). Bee products used in apitherapy. *World Scientific News*, **48**: 254–258.
- HAGHI G, HATAMI A, MEHRAN M (2013). Qualitative and quantitative evaluation of melittin in honeybee venom and drug products containing honeybee venom. *Journal of Apicultural Science*, **57**: 37.
- HAIT WN, GRAIS L, BENZ C, CADMAN EC (1985). Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: Phenothiazines and melittin. *Cancer Chemotherapy and*

Pharmacology, **14**: 202–205.

- HALATSCH ME, SCHMIDT U, BEHNKE MURSCH J, UNTERBERG A, WIRTZ CR (2006). Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treatment Reviews*, **32**: 74–89.
- HELLNER M, WINTER D, VON GEORGI R, MUNSTEDT K (2008). Apitherapy: usage and experience in German beekeepers. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **5**: 475–479.
- HEMANN MT, LOWE SW (2006). The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death and Differentiation*, **13**: 1256–1259.
- HENNESY EJ (2016). Selective inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL: Balancing antitumor activity with on-target toxicity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **26**: 2105–2114.
- HOEIJMAKERS JH (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, **361**: 1475–1485.
- HOSSEN MS, SHAPLA UM, GAN SH, KHALIL MI (2016). Impact of bee venom enzymes on diseases and immune responses. *Molecules*, **22**: 25.
- HU H, CHEN D, LI Y, ZHANG X (2010). Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **58**: 83–89.
- HUH JE, KANG JW, NAM D, BAEK YH, CHOI DY, PARK DS, LEE JD (2012). Melittin suppresses VEGF-A-induced tumor growth by blocking VEGFR-2 and the COX-2-mediated MAPK signaling pathway. *Journal of Natural Products*, **75**: 1922–1929.
- HWANG DS, KIM SK, BAE H (2015). Therapeutic effects of bee venom on immunological and neurological diseases. *Toxins*, **7**: 2413–2421.
- ICH (2005). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Current Step 4 Version, p.: 17.
- INOUE SI, KOYA MIYATA S, USHIO S, IWAKI K, IKEDA M, KURIMOTO M (2003). Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: Correlation with reduced DNA damage. *Experimental Gerontology*, **38**: 965–969.
- IP SW, LIAO SS, LIN SY, LIN JP, YANG JS, LIN ML, CHEN GW, LU HF, LIN MW, HAN SM, CHUNG JG (2008). The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In Vivo*, **22**: 237–245.
- IWADATE M, ASAKURA T, WILLIAMSON MP (1998). The structure of the melittin tetramer at different temperatures: An NOE-based calculation with chemical shift refinement. *European Journal of Biochemistry*, **257**: 479–487.
- JAMASBI E, LUCKY SS, LI W, HOSSAIN MA, GOPALAKRISHNAKONE P, SEPAROVIC F (2018). Effect of dimerized melittin on gastric cancer cells and antibacterial activity. *Amino Acids*, **50**: 1101–1110.
- JAMASBI E, MULARSKI A, SEPAROVIC F (2016). Model membrane and cell studies of antimicrobial activity of melittin analogues. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **16**: 40–45.
- JANOUT V, KOLLAROVA H (2001). Epidemiology of colorectal cancer. *Acta-Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae*, 5–10.

- JO M, PARK MH, KOLLIPARA PS, AN BJ, SONG HS, HAN SB, KIM JH, SONGH MJ, HONGH JT (2012). Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **258**: 72–81.
- KABAT GC, ETGEN AM, ROHAN TE (2010). Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma?. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **19**: 2421–2427.
- KAFALI H (2008). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolon sonrası türevlendirme ile 7 adet sulfonamid tespitinin metot validasyonu, Doktora Tezi. Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- KAFTANOĞLU O (2001). Bal arılarında ırk kavramı ve ırk seçimi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **1**: 11–20.
- KAMBUR M, KEKEÇOĞLU M (2018). Türkiye bal arısı (*Apis mellifera* L.) alttürlerinde genetik çeşitlilik kaybı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, **33**: 73–84.
- KARADENİZ T (2015). Meyve yetiştiriciliğinde polinasyonun önemi, verim ve kaliteye etkisi. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, **14**: 8–12.
- KARAVELİ S, ÖZBAYIR T, KARACABAY K (2014). Kolorektal kanser ameliyatı geçiren hastaların ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası dönemde yaşadıkları deneyimlerin incelenmesi. *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, **17**: 90–96.
- KARIM R, PALAZZO C, EVRARD B, PIEL G (2016). Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: current state-of-the-art. *Journal of Controlled Release*, **227**: 23–37.
- KARLIDAĞ S, KÖSEMAN A (2015). Türkiye ve Malatya’da arıcılığın yeri ve önemi. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, **13**: 27–31.
- KARTLAŞMIŞ K, KÖKBAŞ U, KAYRIN L (2016). Apoptozis biyokimyası. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **25**: 52–69.
- KAUFMANN SH, EARNSHAW WC (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, **256**: 42–49.
- KEKEÇOĞLU M, GÜRCAN EK, SOYSAL MI (2007). Türkiye arı yetiştiriciliğinin bal üretimi bakımından durumu. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi*, **4**: 227–236.
- KELLE İ (2007). Apiterapi. *Dicle Tıp Dergisi*, **34**: 311–315.
- KENCE A (2006). Türkiye bal arılarında genetik çeşitlilik ve korunmasının önemi. *Uludağ arıcılık dergisi*, **6**: 25-32.
- KHALIL A, ELES AWY BH, ALİ TM, AHMED OM (2021). Bee venom: From venom to drug. *Molecules*, **26**: 4941.
- KHEIROLLAHI M, DASHTI S, KHALAJ Z, NAZEMROAIA F, MAHZOUNI P (2015). Brain tumors: Special characters for research and banking. *Advanced Biomedical Research*, **4**: 4.
- KIKUCHI Y, MIYAUCHI M, NAGATA I (1989). Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation by calmodulin inhibitors and the possible mechanism. *Gynecologic Oncology*, **35**: 156–158.
- KIM SJ, PARK JH, KIM KH, LEE WR, KIM KS, PARK KK (2011). Melittin inhibits atherosclerosis in LPS/high-fat treated mice through atheroprotective actions. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, **18**: 1117–1126.

- KIM WH, AN HJ, KIM JY, GWON MG, GU H, LEE SJ, PARK JY, PARK KD, HAN SM, KIM MK, PARK KK (2017). Apamin inhibits TNF- α - and IFN- γ -induced inflammatory cytokines and chemokines via suppressions of NF- κ B signaling pathway and STAT in human keratinocytes. *Pharmacological Reports*, **69**: 1030–1035.
- KIM YI, MASON JB (1996). Nutrition chemoprevention of gastrointestinal cancers: A critical review. *Nutrition Reviews*, **54**: 259–279.
- KIRPIK MA, AYDOĞAN MN, ÖRTÜCÜ S, HASENEKOĞLU İ (2010). Kafkas Arısı (*Apis mellifera caucasia* Pollmann, 1889) (Hymenoptera: Apidea)’nın, dış yüzey ve sindirim sistemi mikrofungus florasının belirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **16**: 347–352.
- KNOWLES BH, FARNDAL RW (1988). Activation of insect cell adenylate cyclase by *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins and melittin. Toxicity is independent of cyclic AMP. *Biochemical Journal*, **253**: 235–241.
- KOÇAK N, YILDIRIM İH, CİNG YILDIRIM S (2011). p53 ve p53 gen ailesi üyeleri olan p63 ve p73’ün hücrel işlevleri. *Dicle Medical Journal* **38**: 530–535.
- KODAY Z, KARADAĞ H (2020). Türkiye’deki arıcılık faaliyetleri ve bal üretiminin bölgesel dağılımı (2007-2008). *Atatürk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, **24**: 495–510.
- KOKOT ZJ, MATYSIAK J, KLOS J, KEDZIA B, HOLDERNA-KEDZIA E (2009). Application of principal component analysis for evaluation of chemical and antimicrobial properties of honey bee (*Apis mellifera*) venom. *Journal of Apicultural Research*, **48**: 168–175.
- KOLLIPARA PS, KIM JH, WON D, LEE SM, SUNG HC, CHANG HS, LEE KT, LEE KS, PARK MH, SONG MJ, SONG HS, HONG JT (2014). Co-culture with NK-92MI cells enhanced the anti-cancer effect of bee venom on NSCLC cells by inactivation of NF- κ B. *Archives of Pharmacol Research*, **37**: 379–389.
- KONDRATSKYI A, KONDRATSKA K, SKRYMA R, PREVARSKAYA N (2015). Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1848**: 2532–2546.
- KONG GM, TAO WH, DIAO YL, FANG PH, WANG JJ, BO P, QIAN F (2016). Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway. *World Journal of Gastroenterology*, **22**: 3186–3195.
- KONUKOĞLU D, TURHAN MS (2005). Anjiyogenezin temel moleköl mekanizmaları ve tümör anjiyogenezini. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **36**: 42–48.
- KRELL R (1996). Value-added products from beekeeping, *FAO Agricultural Services Bulletin*, **124**: 227-239.
- KREX D, KLINK B, HARTMANN C, VON DEIMLING A, PIETSCH T, SIMON M, SABEL M, STEINBACH JP, HEESE O, REIFENBERGER G, WELLER M, SCHACKERT G (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*, **130**: 2596–2606.
- KUMAR P, NAGARAJAN A, UCHIL PD (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2018**: 469–471.
- KUTLUCA S, GENÇ F, KORKMAZ A (2008). Propolis. Samsun İl tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi, Samsun, s.: 6-42.
- KUWANA T (2018). The role of Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (MOMP) in apoptosis: studying Bax pores by Cryo-Electron Microscopy. *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, **27**: 39–62.

- KWON YB, LEE JD, LEE HJ, HAN HJ, MAR WC, KANG SK., BEITZ AJ, LEE JH (2001). Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*, **90**: 271–280.
- LAKHAN SE, HARLE L (2009). Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: A case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, **3**: 1–3.
- LAZAREV VN, PARFENOVA TM, GULARYAN SK, MISYURINA OY, AKOPIAN TA, GOVORUN VM (2002). Induced expression of melittin, an antimicrobial peptide, inhibits infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* in a HeLa cell line. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **19**: 133–137.
- LEANDRO LF, MENDES CA, CASEMIRO LA, VINHOLIS AHC, CUNHA WR, DE ALMEIDA R, MARTINS CH G (2015). Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, **87**: 147–155.
- LEBEL AA, KISEMBO MV, SOUCY MFN, HEBERT MPA, MORIN P, BOUDREAU LH (2021). Molecular characterization of the anticancer properties associated with bee venom and its components in glioblastoma multiforme. *Chemico-Biological Interactions*, **347**: 109622.
- LEE DS, SINNO S, KHACHEMOUNE A (2011). Honey and wound healing. *American Journal of Clinical Dermatology*, **12**: 181–190.
- LEE G, BAE H (2016). Bee venom phospholipase A2: Yesterday's enemy becomes today's friend. *Toxins*, **8**: 48.
- LEE HL, PARK MH, SON DJ, SONG HS, KIM JH, KO SC, SONG MJ, LEE WH, YOON JH, HAM YW, HAN SB, HONG JT (2015). Anti-cancer effect of snake venom toxin through down regulation of AP-1 mediated PRDX6 expression. *Oncotarget*, **6**: 22139–22151.
- LEE J, LEE DG (2014). Melittin triggers apoptosis in *Candida albicans* through the reactive oxygen species-mediated mitochondria/caspase-dependent pathway. *FEMS Microbiology Letters*, **355**: 36–42.
- LEE MK, LEE DG, SHIN SY, LEE SG, KANG JH, HAHM KS (1996). Antifungal activities of peptides with the Sequence 10-17 of Magainin 2 at the N-termini against *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiology*, **34**: 274–278.
- LI B, GU W, ZHANG C, HUANG XQ, HAN KQ, LING CQ (2006). Growth arrest and apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line Bel-7402 induced by melittin. *Onkologie*, **29**: 367–371.
- 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**: 1964-1973.
- LIU CC, YANG H, ZHANG LL, ZHANG Q, CHEN B, WANG Y (2014). Biotoxins for cancer therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **15**: 4753–4758.
- LIU CC, HAO DJ, ZHANG Q, AN J, ZHAO JJ, CHEN B, ZHANG LL, YANG H (2016). Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **78**: 1113–1130.
- LIU X, CHEN D, XIE L, ZHANG R (2002). Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **54**: 1083–1089.

- LOPEZ-GARCIA B, GANDIA M, MUMOS A, CARMONA L, MARCOS JF (2010). A genomic approach highlights common and diverse effects and determinants of susceptibility on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to distinct antimicrobial peptides. *BMC Microbiology*, **10**: 1–18.
- LUN M, LOK E, GAUTAM S, WU E, WONG ET (2011). The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology*, **105**: 261–273.
- LYU C, FANG F, LI B (2018). Anti-tumor effects of melittin and its potential applications in clinic. *Current Protein & Peptide Science*, **20**: 240–250.
- MAHADY GB, LIU C, BEECHER CWW (1998). Involvement of protein kinase and g proteins in the signal transduction of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, **48**: 93–102.
- MAHMOODZADEH A, ZARRINNAHAD H, BAGHERI KP, MORADIA A, SHAHBAZZADEH D (2015). First report on the isolation of melittin from Iranian honey bee venom and evaluation of its toxicity on gastric cancer AGS cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, **78**: 574–583.
- MANSOUR GH, EL-MAGD MA, MAHFOUZ DH, ABDELHAMID IA, MOHAMED MF, IBRAHIM NS, Hady A. ABDEL WAHAB A, ELZAYAT EM (2021). Bee venom and its active component Melittin synergistically potentiate the anticancer effect of Sorafenib against HepG2 cells. *Bioorganic Chemistry*, **116**: 105329.
- MATANIC AVC, CASTILLA V (2004). Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **23**: 382–389.
- MAU SE, VILHARDT H (1997). Cross talk between substance P and melittin-activated cellular signaling pathways in rat lactotroph-enriched cell cultures. *Journal of Neurochemistry*, **69**: 762–772.
- MEDERIOS KCP, FIGUEREDO CAV, FIGUEREDO TB, FREIRE KRL, SANTOS FAR, ALCANTARA-NEVES NM, SILVA TMS, PIUVEZAM MR (2008). Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**: 41–46.
- MEMARIANI H, MEMARIANI M, MORAVVEJ H, SHAHIDI-DADRAS M (2020). Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **39**: 5–17.
- MEMARIANI H, MEMARIANI M, SHAHIDI DADRAS M, NASIRI S, AKHAVAN MM, MORAVVEJ H (2019). Melittin: from honeybees to superbugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**: 3265–3276.
- MILLNER A (1996). An introduction to understanding honeybees, their origins, evolution and diversity. Available via *Bibba electronic journal*. Erişim adresi: [http://www.bibba.com]. Erişim Tarihi: 10/12/2020.
- MOON DO, PARK SY, HEO MS, KIM KC, PARK C, KO WS, CHOI YH, KIM GY (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**: 1796–1807.
- MORENO M, GIRALT E (2015). Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, **7**: 1126–1150.
- MUNSTEDT K, MANNLE H (2020). Bee products and their role in cancer prevention and treatment.

Complementary Therapies in Medicine, **51**: 102390.

NEGRI E, FRANCESCHI S, PARPINEL M, LA VECCHIA C. (1998). Fiber intake and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **7**: 667–671.

NYGREN P (2001). What is cancer chemotherapy?. *Acta Oncologica*, **40**: 166–174.

OHGAKI H, KLEIHUES P (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology*, **170**: 1445–1453.

ONBAŞLI D, YUVALI ÇELİK G, KAHRAMAN S, KANBUR M (2019). Apiterapi ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **16**: 55–62.

ONUR E, TUĞRUL B, BOZYİĞİT F (2009). DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **7**: 61–70.

OREN Z, SHAI Y (1997). Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: Structure-function study. *Biochemistry*, **36**: 1826–1835.

ORSOLIC N (2012). Bee venom in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, **31**: 173–194.

ORSOLIC N, KNEZEVIC A, SVER L, TERZIC S, HACKENBERGER BK, BASIC I (2003). Influence of honey bee products on transplantable murine tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, **1**: 216–226.

OSTROM QT, BAUCHET L, DAVIS FG, DELTOUR I, FISHER JL, LANGER CE, PEKMEZCİ M, SCHWARTZBAUM JA, TURNER MC, WALSH KM, WRENSCH MR, BARNHOLTZ-SLOAN JS (2014). The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro-Oncology*, **16**: 896–913.

OTHON CM, KWON OH, LIN MM, ZEWAİL AH (2009). Solvation in protein (un) folding of melittin tetramer – monomer transition. *PNAS*, **106**: 1293–1298.

OWNBY CL, POWELL JR, JIANG MS, FLETCHER JE (1997). Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon*, **35**: 67–80.

ÖZDEMİR G, ERSÖZ E, DİLEK NM (2021). Apiterapi ve sağlık. *Black Sea Journal of Health Science*, **4**: 168–174.

ÖZDİL F, OSKAY D (2016). Trakya Bölgesindeki Bal Arılarında (*Apis Mellifera* L.) Mtdna Sitokrom C Oksidaz Altbirim I (Coi) geni analizi, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

ÖZTÜRK C, KORKMAZ A (2005). Karniyol Arısı'nın (*Apis mellifera carnica* Pollm 1978) Türkiye arıcılığı için önemi. *Alatarım*, **4**: 48–51.

PACAKOVA V, ŠTULIK K, THI HAU P, JELINEK I, VINS I, SYKORA D (1995). Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. *Journal of Chromatography A*, **700**: 187–193.

PAITHANKAR HV (2013). HPLC method validation for pharmaceuticals: A review. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*, **2**: 229–240.

PALMER MR, SMITH DR, KAFTANOĞLU O (2000). Turkish Honeybees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *Journal of Heredity*, **91**: 42–46.

PARAY BA, AHMAD A, KHAN JM, TAUFİQ F, PATHAN A., MALİK A, AHMED MZ (2021).

- The role of the multifunctional antimicrobial peptide melittin in gene delivery. *Drug Discovery Today*, **26**: 1053–1059.
- PARK MH, CHOI MS, KWAK DH, OH KW, YOON DY, HAN SB, SONG HS, SONG MJ, HONG, JT (2011). Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF- κ B. *The Prostate*, **71**: 801–812.
- PARLAKAY O, YILMAZ H, YAŞAR B, SEÇER A, BAHADIR B. (2008). Türkiye’de arıcılık faaliyetinin mevcut durumu ve trend analizi yöntemiyle geleceğe yönelik beklentiler. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **22**: 17–24.
- PASCOAL A, ESTEVINHO MM, CHOUPINA AB, SOUSA-PIMENTA M, ESTEVINHO LM (2019). An overview of the bioactive compounds, therapeutic properties and toxic effects of apitoxin. *Food and Chemical Toxicology*, **134**: 11.
- PATIL SA, HOSNI-AHMED A, JONES TS, PATIL R, PFEFFER LM, MILLER DD (2013). Novel approaches to glioma drug design and drug screening. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **8**: 1135–1151.
- POLLO B (2011). Neuropathological diagnosis of brain tumours. *Neurological sciences*, **32**: 209–211.
- PORCZA L, SIMMS C, CHOPRA M (2016). Honey and cancer: current status and future directions. *Diseases*, **4**: 30.
- POSTE G, FIDLER IJ (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, **283**: 139–146.
- PREMRATANACHAI P, CHANCHAO C (2014). Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **4**: 337–344.
- QI J, LIU Y, XU H, XUE T, SU Y, LIN Z (2022). Anti-cancer effect of melittin-Au25(MHA)18 complexes on human cervical cancer HeLa cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **68**: 103078.
- RADY I, SIDDIQUI IA, RADY M, MUKHTAR H (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, **402**: 16–31.
- RAFAT N, MONFARED AS, SHAHIDI M, POURFALLAH TA (2016). The modulating effect of royal jelly consumption against radiation-induced apoptosis in human peripheral blood leukocytes. *Journal of Medical Physics/Association of Medical Physicists of India*, **41**: 52–57.
- REPETTO G, DEL PESO A, ZURITA JL (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*, **3**: 1125–1131.
- RIEMENSCHNEIDER MJ, REIFENBERGER G (2009). Astrocytic tumors. *Recent Results in Cancer Research*, **171**: 3–24.
- ROSSI D, GAIDANO G (2003). Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Molecular Hematology*, **88**: 212–218.
- RUTTNER F (1988). Geographic Variability. In: Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, Chapter 4.
- RUTTNER F, POURASGHAR D, KAUHAUSEN D (1985). Die Honigbienen Des Iran. 2. Apis Mellifera Meda Skorikow, Die Persische Biene. *Apidologie*, **16**: 241–264.
- RYBAK-CHMIELEWSKA H, SZCZESNA T (2004). HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) *Venom*, **48**: 103–109.

- SAMANCI T, KEKEÇOĞLU M (2019). Comparison of commercial and Anatolian Bee venom in terms of chemical composition. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **19**: 61–68.
- SANCAK K, ZAN SANCAK A, AYGÖREN E (2013). Dünya ve Türkiye’de Arıcılık. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, **5**: 7–13.
- ŠARIC A, BALOG T, SOBOCANEC S, KUŠIC B, ŠVERKO V, RUSAK G, LIKIC S, BUBALO D, PINTO B, REALI D, MAROTTI T (2009). Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, **47**: 547–554.
- SCHAUUE D, MCBRIDE WH (2015). Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **12**: 527–540.
- SCHULTZ DR, HARRINGTON WJ (2003). Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **32**: 345–369.
- ŞENEL E, DEMİR E (2018). Bibliometric analysis of apitherapy in complementary medicine literature between 1980 and 2016. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, **31**: 47–52.
- SEVIN S, YARSAN E (2021). Investigation of the effects of pine and chestnut honey on wound healing. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **22**: 319–328.
- SEVIN S, CEYLAN A., ÖZGENÇ Ö, AKDENİZ G, YILMAZ F, KABAKCI D, YARSAN E. Investigation of the effects of different disinfectans solutions on honey bees (*Apis mellifera*). *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **21**: 143-151.
- SHADEED SH, EL-DESOUKY MA, KOTB NS, ELHAKIM HKA (2022). Synergistic effect of cetuximab in combination with bee venom: A novel approach for the treatment of colon cancer. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, **13**(2).
- SHIN JM, JEONG YJ, CHO HJ, PARK KK, CHUNG IK, LEE IK, KWAK JY, CHANG HW, KIM CH, MOON SK, KIM WJ, CHOI YH, CHANG YC (2013). Melittin suppresses HIF-1 α /VEGF expression through inhibition of ERK and mTOR/p70S6K pathway in human cervical carcinoma cells. *PLoS ONE*, **8**: e69380.
- SHIRZAD M, KORDYAZDI R, SHAHINFARD N, NIKOKAR M (2013). Does royal jelly affect tumor cells?. *Journal of HerbMed Pharmacology*, **2**: 45–48.
- SHKENDEROV S, KOBUROVA K (1982). Adolapin-A newly isolated analgetic and antiinflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon*, **20**: 317–321.
- SİLİCİ S (2014). Arı Poleni ve Arı Ekmeği. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **14**: 99–105.
- SIMPSON JR, HORTON J, SCOTT C, CURRAN WJ, RUBIN P, FISCHBACH J, ISAACSON S, ROTMAN M, ASBELL SO, NELSON JS, WEINSTEIN AS, NELSON DF (1993). Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: Results of three consecutive radiation therapy oncology group (RTOG) clinical trials. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **26**: 239–244.
- ŞİMŞEK AB, DİCLE A (2013). Primer beyin tümörü: klinik özellikler, tedavi ve bakım. *DEUHYO ED*, **6**: 102–113.
- SINGH R (2013). Hplc method development and validation: an overview. *J Pharm Educ Res*, **4**: 26–33.
- ŞİRİN Y, ÇAKIR HE, CAN Z, YILDIZ O, KOLAYLI, S (2016). Bal arısı zehrinin karakterizasyonunda SDS -PAGE elektroforez kullanılabilirliğinin araştırılması. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **16**: 49–56.

- SIG AK, GÜNEY M, OZ SIG Ö, SAN H (2019). Arı zehri: Tıbbi bakış. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory*, **10**: 414–421.
- SIRALI R (2017). Anadolu Arısı (*Apis Mellifera Anatoliaca*)’nın bazı önemli özellikleri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **17**: 82–92.
- SIRALI R (2021). Batı ülkelerinde arı zehrinin insan sağlığı açısından kullanımının kronolojik olarak incelenmesi. *Namık Kemal Üniversitesi Sosyal Bilimler Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, **3**: 1–6.
- SIRALI R, CINBIRTOĞLU Ş (2018). Bal arılarının tozlaşmadaki ve bitkisel üretimdeki önemi. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, **10**: 28–33.
- SHABIR GA (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A*, **987**: 57-66.
- SMITH DR (2002). Genetic Diversity in Turkish Honey Bees. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **2**: 10–17.
- SÖĞÜT ERTAŞ Ö, KAYALI A (2005). Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış: an overview on analytical method validation. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **34**: 41–57.
- SOLIMAN C, EASTWOOD S, TRUONG VK, RAMSLAND PA, ELBOURNE A (2019). The membrane effects of melittin on gastric and colorectal cancer. *PLoS ONE*, **14**: e0224028.
- SON DJ, LEE JW, LEE YH, SONG HS, LEE CK, HONG JT (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology and Therapeutics*, **115**: 246–270.
- SORUCU A (2019). Arı Ürünleri ve Apiterapi. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, **10**: 1–15.
- SOYTÜRK M (2019). Kolorektal kanser epidemiyoloji ve risk faktörleri. Erişim Adresi: [http://www.tihud.org.tr/uploads/content/kongre/7/7.28.pdf]. Erişim Tarihi: 11/10/2021.
- SÖNMEZ R, SETTAR A (1987). Önemli arı ırkları, ırk özellikleri ve Türkiye’deki bulgular. Türkiye I. Arıcılık Kongresi, Ankara. N. Sönmez (Ed.) Tarım, Orman ve Köyişleri bakanlığı yayını no. 154.
- SUBRAHMANYAM M (1991). Topical application of honey in treatment of burns. *British Journal of Surgery*, **78**: 497–498.
- SURENDRA NS, JAYARAM GN, REDDY MS (2011). Antimicrobial activity of crude venom extracts in honeybees (*Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*) tested against selected pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, **5**: 2765–2772.
- SVENSSON B (1991). The Importance of Honeybee-pollination for the Quality and Quantity of Strawberries in Central Sweden. *Acta Horticulturae*, **288**: 260-264.
- SWELLAM T, MIYANAGA N, ONOZAWA M, HATTORI K, KAWAI K, SHIMAZUI T, AKAZA H (2003). Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: In vivo and in vitro studies. *International Journal of Urology*, **10**: 213–219.
- TEMEL MK (2015). The development of cytotoxic chemotherapeutics in the twentieth century. *Türk Onkoloji Dergisi*, **30**: 96–108.
- TERRA RMS, GUIMARAES JA, VERLI H (2007). Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **25**: 767–772.

- TERWILLIGER TC, EISENBERG D (1982). The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *Journal of Biological Chemistry*, **257**: 6016–6022.
- THOMPSON M, ELLISON SLR, WOOD R (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, **74**: 835–855.
- TOBELEM G (2007). VEGF: A key therapeutic target for the treatment of cancer-insights into its role and pharmacological inhibition. *Targeted Oncology*, **2**: 153–164.
- TOKUR O, AKSOY A (2017). In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **6**: 112–118.
- TOMASINSIG L, SCOCCHI M, METTULIO R, ZANETTI M (2004). Genome-wide transcriptional profiling of the Escherichia coli response to a proline-rich antimicrobial peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 3260–3267.
- TOSTESON MT, HOLMES MR, TOSTESON DC (1985). Melittin Lysis of Red Cells. *J.Membr.Biol*, **87**: 35–44.
- TOZKOPARAN B, AYTAÇ SP (2007). Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **27**: 139–164.
- TÜREDİ S (2021). Deneysel Diyabette Deri Hasarına Karşı Propolisin İyileştirici Etkilerinin Araştırılması. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **18**: 322–328.
- TUSIIMIRE J, WALLACE J, WOODS N, DUFTON MJ, PARKINSON JA, ABBOTT G, CLEMENTS CJ, YOUNG L, PARK JK, JEON JW, FERRO VA, WATSON DG (2016). Effect of bee venom and its fractions on the release of pro-inflammatory cytokines in PMA-differentiated U937 cells Co-stimulated with LPS. *Vaccines*, **4**: 1–15.
- ULUKAYA E, ÖZDİKİCİOĞLU F, ORAL AY, DEMİRCİ M (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology In Vitro*, **22**: 232–239.
- URBANSKA K, SOKOŁOWSKA J, SZMIDT M, SYSA P (2014). Glioblastoma multiforme - An overview. *Współczesna Onkologia*, **18**: 307–312.
- WACHINGER M, KLEINSCHMIDT A, WINDER D, VON PECHMANN N, LUDVIGSEN A, NEUMANN M, HOLLE R, SALMONS B, ERFLE V, BRACK-WERNER R (1998). Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *Journal of General Virology*, **79**: 731–740.
- WAHEED M, HUSSAIN MB, JAVED A, MUSHTAQ Z, HASSAN S, SHARIATI MA, KHAN MU, MAJEED M, NIGAM M, MISHRA AP, HEYDARI M (2019). Honey and cancer: A mechanistic review. *Clinical Nutrition*, **38**: 2499–2503.
- WEHBE R, FRANGIEH J, RIMA M, OBEID D, EL SABATIER JM, FAJLOUN Z (2019). Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules*, **24**: 2997.
- WEI AD, GUTMAN GA, ALDRICH R, CHANDY KG, GRISSMER S, WULFF H (2005). International union of pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, **57**: 463–472.
- WEIS WA, RIPARI N, CONTE FL, DA SILVA HONORIO, M SARTORI AA, MATUCCI RH, SFORCIN JM (2022). An overview about apitherapy and its clinical applications. *Phytomedicine Plus*, **2**: 100239.

WELLER M, WICK W, ALDAPE K, BRADA M, BERGER M, PFISTER SM, NISHIKAWA R, ROSENTHAL M, WEN PY, STUPP R, REIFENBERGER G (2015). Glioma. *Nature Reviews Disease Primers*, **1**(1): 1–18.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2000). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine (No.WHO/EDM/TRM2000.1).

WONG RS (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, **30**: 1–14.

XI Y, XU P (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, **14**: 101174.

YAACOB NS, NENGSIH A, NORAZMI MN (2013). Tualang honey promotes apoptotic cell death induced by tamoxifen in breast cancer cell lines. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**: 989841.

YAO J, ZHANG Z, LI S, LI B, WANG XH (2019). Melittin inhibits proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells by regulating key genes based on bioinformatics and experimental assays. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **24**: 655–670.

ZHENG J, LEE HL, HAM YW, SONG HS, SONG MJ, HONG JT (2015). Anti-cancer effect of bee venom on colon cancer cell growth by activation of death receptors and inhibition of nuclear factor kappa B. *Oncotarget*, **6**: 44437–44451.