

**DÜZCE-YIĞILCA BAL ARILARINDAN ELDE EDİLEN
ÜRÜNLERİN APİTERAPÖTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

AYŞEGÜL AKKOYUNLU

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÖRKEM DÜLGER**

DÜZCE, 2024

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DÜZCE-YIĞILCA BAL ARILARINDAN ELDE EDİLEN ÜRÜNLERİN
APİTERAPÖTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ayşegül Akkoyunlu tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Görkem DÜLGER

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Görkem DÜLGER

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Kerem CANLI

Dokuz Eylül Üniversitesi

Doç. Dr. Meral KEKEÇOĞLU

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Meliha Merve HIZ ÇİÇEKLİYURT

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi İlker KILIÇCIOĞLU

Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 30/05/2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

30 Mayıs 2024

Ayşegül Akkoyunlu

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimimde beni yüreklendiren çok değerli hocam Prof. Dr. Gökem Dülger'e bu uzun yolculukta gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Arı ürünlerinin temininde yardımlarını esirgemeyen ve doktora süreci boyunca değerli katkılarıyla yol gösteren kıymetli hocam Doç. Dr. Meral Kekeçoğlu'na çok teşekkür ederim.

Antibiyofilm çalışmalarım için gereken bakteri izolatlarının temini konusunda verdiği destekten ve çalışmalar süresince ufuk açan yönlendirmelerinden dolayı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Kerem Canlı'ya şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarımda değerli katkılarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi İlker Kılıçcioğlu'na, Uzm. Dr. Banu Hümeysra Keskin'e ve Ar. Gör. Bahar Gedik'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu yolda her zaman destekçim ve gayretlendirenim olan sevgili eşim Davut Ali Akkoyunlu'ya minnettarım.

Ve son olarak evlatlarım Rüveyda, Cihangir Mirza ve Yavuz Kaan sabrınız için teşekkür ederim. Herşey sizin için...

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2021.04.01.1260 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

30 Mayıs 2024

Ayşegül AKKOYUNLU

“Ve Rabbin bal arısına şöyle ilham etti: “Dağlardan, ağaçlardan ve insanların kurdukları çardaklardan kendine yuvalar edin. Sonra her türlü besleyici ürünlerden ye; Rabbinin koyduğu kanunlara boyun eğerek çizdiği yollardan git!” Onların karınlarından, farklı renk ve çeşitlerde şerbet (kıvamında bir sıvı) çıkar ki onda insanlara şifa vardır. İşte bunda da düşünen bir topluluk için açık delil bulunmaktadır.”
(Nahl 16/68-69)

Anneme, hürmetle...

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
SİMGELER	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
EXTENDED ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. APİTERAPİ	2
1.1.1. Bal	3
1.1.2. Arı Sütü	5
1.1.3. Propolis.....	6
1.1.4. Arı Zehri	7
1.1.5. Polen	8
1.1.6. Perga (Arı Ekmeği)	9
1.1.7. <i>Apis mellifera anatoliaca</i> Yığılca Ekotipi.....	10
1.2. <i>ESCHERİCHİA COLI</i>	11
1.3. BİYOFİLM.....	12
1.3.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	14
1.3.1.1. Tutunma	14
1.3.1.2. Olgunlaşma.....	15
1.3.1.3. Dağılma	16
1.4. KANSER.....	17
1.4.1. Kanser ve Mikrobiyota	19
1.4.2. Kolon Kanseri.....	21
1.4.2.1. HCT116 Kolon Kanseri Hücre Hattı	23
1.4.3. Apoptoz	23
1.4.3.1. Apoptozda Morfolojik Değişiklikler	23
1.4.3.2. Apoptozda Biyokimyasal Değişiklikler	24
1.4.4. Kaspazlar (Hücrel Giyotinler).....	24
1.4.5. Apoptoz Mekanizmaları	25
1.4.5.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yol	25
1.4.5.2. İntrinsik (İçsel) Yol	26
1.4.5.3. Ortak Yol.....	27
2. MATERYAL VE YÖNTEM	29
2.1. ARI ÜRÜNLERİNİN TEMİNİ VE HAZIRLANMASI	29
2.1.1. Arı Sütü Ekstraksiyonu	29
2.1.2. Arı Zehri Ekstraksiyonu.....	29
2.1.3. Perga Ekstraksiyonu	30
2.1.4. Polen Ekstraksiyonu	31
2.1.5. Bal Ekstraksiyonu	32
2.1.6. Propolis Ekstraksiyonu.....	32
2.2. ANTİBİYOFİLM AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ.....	33

2.2.1. Bakteri İzolatlarının Temini	33
2.2.2. Bakteri İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi	34
2.2.3. Arı Ürünlerinin Biyofilm İnhibisyon Aktivitesinin Ölçülmesi.....	35
2.3. ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ	36
2.3.1. Hücre Kültürü	36
2.3.1.1. Besiyeri Hazırlama	36
2.3.1.2. Hücrelerin Çözdürülmesi	36
2.3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	36
2.3.1.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	37
2.4. APOPTOTİK YOLAK ANALİZİ	38
2.4.1. Protein İzolasyonu.....	38
2.4.2. Protein Miktar Tayini.....	39
2.4.3. Apoptosis Belirteçlerinin İncelenmesi.....	39
2.4.3.1. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	39
2.4.3.2. Kaspaz-8 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	40
2.4.3.3. Kaspaz-9 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	40
2.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	40
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	42
3.1. ANTİBİYOFİLM AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ.....	42
3.1.1. Bakteri Kültürlerinin Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi	42
3.1.2. Arı Ürünlerinin Biyofilm İnhibisyon Aktivitesinin Değerlendirilmesi ...	43
3.2. ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ	49
3.3. APOPTOTİK YOLAK ANALİZİ	56
4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	61
5. KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	76

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Biyofilm oluşum aşamaları (Sauer vd., 2022).....	17
Şekil 1.2. Dünya genelinde 2020 verilerinde kanser vakalarının rakamları ve yüzdeleri.	19
Şekil 1.3. Epitel hücrelerinde neoplastik süreçler üzerindeki mikrobiyal etkiler (Cullin vd., 2021).	20
Şekil 1.4. Ekstrinsik (Dışsal-Ölüm Reseptörü) Yolak (O'Brien ve Kirby, 2008).....	26
Şekil 1.5. Sitokrom c'nin neden olduğu İntrinsik (Mitokondriyal-İçsel) Yolak (Wang, 2001).....	27
Şekil 2.1. Arı zehrinin toplandığı cam plaka.	29
Şekil 2.2. Cam plakadan arı zehrinin kazınması.....	30
Şekil 2.3. Perga maserasyonu.	30
Şekil 2.4. Polen maserasyonu.	31
Şekil 2.5. Perga ve polenden rotary evaporatorde metanolün uzaklaştırılması.	32
Şekil 2.6. Bal solüsyonlarının hazırlanması.....	32
Şekil 2.7. Arı ürünlerinin seyreltilmesi.....	33
Şekil 2.8. Bakteri izolatları.	34
Şekil 2.9. Antibiyofilm Çalışmaları.....	35
Şekil 2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	38
Şekil 3.1. E. coli izolatlarının farklı glikoz konsantrasyon içerikli MHB besiyerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri.....	42
Şekil 3.2 E. coli izolatlarının farklı glikoz konsantrasyon içerikli BHIB besiyerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri.....	43
Şekil 3.3. Arı sütünün E. coli biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.	43
Şekil 3.4. Arı zehrinin E. coli biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.	44
Şekil 3.5. Perganın E. coli biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.	45
Şekil 3.6. Polenin E. coli biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.	46
Şekil 3.7. Balın E. coli biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	47
Şekil 3.8. Propolisin E. coli biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.	48
Şekil 3.9. Arı sütünün 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.	50
Şekil 3.10. Arı zehrinin 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.	51
Şekil 3.11. Perganın 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.	52
Şekil 3.12. Polenin 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.	53
Şekil 3.13. Balın 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.	54
Şekil 3.14. Propolisin 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.	55
Şekil 3.15. Arı ürünlerinin iki farklı konsantrasyonu (%25 / %50) uygulanan HCT116 hücrelerinde Kaspaz 3 ekspresyonu sonuçları.	58
Şekil 3.16. Arı ürünlerinin iki farklı konsantrasyonu (%25 / %50) uygulanan HCT116 hücrelerinde Kaspaz 8 ekspresyonu sonuçları.	58
Şekil 3.17. Arı ürünlerinin iki farklı konsantrasyonu (%25 / %50) uygulanan HCT116 hücrelerinde Kaspaz 9 ekspresyonu sonuçları.	59

KISALTMALAR

10-HDA	10-hidroksi -2-desenoik asit
AI	Otoindükatör
ANOVA	Varyans Analizi
Apaf-1	Adaptör proteaz aktivasyon faktörü-1
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	Bikinkoninik asit
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
CAPE	Kafeik asit fenil ester
c-di-GMP	Siklik-diguanilik asit
CEC	Kolonik epitel hücre
CRC	Kolorektal kanser
DAGEM	Düzce Üniversitesi Arıcılık Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi
DD	Ölüm alanı
DISC	Ölüm tetikleyici sinyal kompleksi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
eDNA	Çevresel deoksiriboz nükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPS	Ekzopolisakkarit madde
eRNA	Enhancer ribonükleik asit
FADD	Fas ile ilişkili ölüm domaini
FBS	Fetal bovin serum
HCT116	İnsan kolon kanseri hücre hattı
IARC	Uluslararası Kanser Kayıtları Birliği
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NF-κB	Nükleer faktör kappa-B
OD	Optik Yoğunluk
OD _C	Cut-off değeri
PBS	Fosfat tampon solusyonu
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür (proteaz inhibitörü)
QS	Quorum sensing
RIPA	Hücre lizis tamponu
rpm	Dakika başına devir
RPMI	Memeli hücre tamponu
SD	Standart sapma
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNFR1	Tip 1 TNF reseptörü
TRADD	TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini
WST-1	Kolorimetrik hücre proliferasyonu kiti

SİMGELER

%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
*	Dipnot
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
Ca ⁺²	Kalsiyum
CO ₂	Karbondioksit
Cu ⁺¹	Bakır (I)
Cu ⁺²	Bakır (II)
dk	Dakika
Fe	Demir
g	Gram
mg	Miligram
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
Na	Sodyum
pH	Potansiyel hidrojen
U	Unite
v/v	Hacimce yüzde
w/v	Hacimde ağırlıkça yüzde
Zn	Çinko

ÖZET

DÜZCE-YIĞILCA BAL ARILARINDAN ELDE EDİLEN ÜRÜNLERİN APİTERAPÖTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ayşegül AKKOYUNLU

Düzce Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi
Danışman: Prof. Dr. Görkem DÜLGER

Mayıs 2024, 75 sayfa

Disbiyotik mikrobiyota ile kolon kanseri arasındaki ilişki son zamanlarda dikkat çekmeye başlamıştır. Bakterilerdeki antibiyotik direnci ve geleneksel kanser kemoterapisinin istenmeyen yan etkileri, alternatif doğal ajanların araştırılmasına yol açmıştır. Arı ürünleri yüksek antioksidan içeriği nedeniyle kolon kanserinde biyoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada endemik popülasyon olan *Apis mellifera anatolica* Yığılca bal arısı ekotipinden elde edilen arı ürünlerinin (bal, arı zehiri, arı sütü, polen, perga ve propolis) apiterapötik etkilerinin araştırılması amaçlandı. Arı ürünlerinin antibiyofilm kapasitesi, biyofilm oluşturabilen *Escherichia coli* üzerinde mikropilaka yöntemi kullanılarak belirlendi. Arı zehri %25 konsantrasyonda en yüksek inhibisyon etkiyi (%73,98) gösterdi. Bal, perga ve arı sütü biyofilm oluşumunu tüm konsantrasyonlarda %50'den fazla düzeylerde azaltmıştır. Propolisin ise %25'in altındaki değerleri en düşük antibiyofilm etkiye sahip olduğunu göstermiştir. HCT116 kolon kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferasyon etkisi WST-1 kiti ile araştırıldı. %50 konsantrasyonda 48 saatlik bal uygulamasından sonra hücre çoğalması %13,50'de kaldı. Arı sütü ve arı zehrinin yüksek inhibisyon etkileri de dikkat çekicidir. Propolisin en yüksek doz ve sürede dahi hücre canlılığını %60'ın altına indirememesi, diğer arı ürünlerine kıyasla antiproliferasyon etkisinin düşük olduğunu göstermektedir. Apoptotik yol analizi kaspaz 3, 8 ve 9 enzimine bağlı immünosorbent tahlil kitleri kullanılarak yapıldı. Tüm arı ürünleri kaspaz 8'e kıyasla kaspaz 9'un daha fazla ekspresyonuna sebep olmuştur. Kaspaz proteinlerini yukarı regüle eden bileşikler, proliferatif hastalıklar için umut verici terapötik hedeflerdir.

Anahtar Sözcükler: Antibiyofilm, Apiterapi, Kaspaz 3, 8, 9, WST-1.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF APITHERAPEUTIC EFFECTS OF PRODUCTS OBTAINED FROM DÜZCE-YIĞILCA HONEY BEES

Ayşegül AKKOYUNLU

Düzce University
Graduate Education Institute, Department of Biology
Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Görkem DÜLGER
May 2024, 75 pages

The association between dysbiotic microbiota and colon cancer has recently gained attention. Antibiotic resistance in bacteria and the undesirable side effects of conventional chemotherapy for cancer have prompted an investigation of alternative natural agents. Bee products, owing to their high antioxidant content, are used as biotherapeutic agents for colon cancer. Our study aimed to investigate the apitherapeutic effects of bee products (honey, bee venom, royal jelly, pollen, perga, and propolis) acquired from the ecotype *Apis mellifera anatolica* Yığılca honey bee, which is an endemic population. The antibiofilm capacity of bee products was determined using the microplate method on *Escherichia coli* capable of forming biofilms. Bee venom showed the highest inhibition effect (73.98%) at a concentration of 25%. Honey, perga, and royal jelly reduced biofilm formation by >50% at all concentrations. Values below 25% of propolis showed that it had the lowest antibiofilm effect. The antiproliferation effect on the HCT116 colon cancer cell line was investigated with the WST-1 kit. After 48 hours of honey treatment at a 50% concentration, cell proliferation remained at 13.50%. The high inhibitory effects of royal jelly and bee venom are also noteworthy. The fact that propolis cannot reduce cell viability below 60% even at the highest dose and duration shows that its antiproliferative effect is low compared to other bee products. Apoptotic pathway analysis was performed using caspase 3, 8, and 9 enzyme-linked immunosorbent assay kits. All bee products induced a higher expression of caspase 9 compared with caspase 8. Compounds that upregulate caspase proteins are promising therapeutic targets for proliferative diseases.

Keywords: Antibiofilm, Apitherapy, Caspase 3, 8, 9, WST-1.

EXTENDED ABSTRACT

INVESTIGATION OF APITHERAPEUTIC EFFECTS OF PRODUCTS OBTAINED FROM DÜZCE-YIĞILCA HONEY BEES

Ayşegül AKKOYUNLU

Düzce University
Graduate Education Institute, Department of Biology
Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Görkem DÜLGER
May 2024, 75 pages

1. INTRODUCTION

Apitherapy involves utilizing bee products such as honey, pollen, perga, royal jelly, propolis, and bee venom for the purpose of maintaining general health, preventing diseases, or treating ailments. Throughout centuries, humanity has benefited from bee products in preventing and treating various illnesses, and apitherapy has been recognized as complementary medicine in many countries. Today, the consumption of bee products as nutraceuticals and dietary supplements has increased due to their rich nutritional content. In recent years, research on the pharmacological effects of bee products has gained momentum. Alongside clinical trials, both in vitro and in vivo studies indicate that apitherapy could be effective in prophylaxis, maintaining homeostasis, and treating various diseases.

Biofilms are three-dimensional communities of microorganisms that irreversibly attach to each other or to a surface, embedded within their self-produced extracellular matrix. These structures are well-organized and undergo changes in characteristics such as growth rate and gene transcription. Phenotypically differentiated from planktonic forms, these multicellular-like entities not only provide a secure living space for bacteria against antibiotics, environmental stresses, and host immune responses but also serve as a form of energy acquisition and nutrient storage for bacteria.

A recent development in biofilm research is the emerging understanding that gastrointestinal biofilms may trigger carcinogenesis. Numerous studies report a correlation between bacterial biofilms found in the intestinal epithelium and colon cancer. The intestinal microbiota is separated from human colonic epithelial cells by a dense mucus layer. After contact with the epithelial mucosa, bacteria can develop

colonic mucosal inflammation and exert their pathological effects through biofilm formation. Colon mucosal biofilms have been found to produce a regulator that triggers cancer cell growth by altering the cancer metabolome.

Bioinformatic studies detected more pathogenic *E. coli* populations in cancer patients than in healthy people. It has been shown that pathogenic *E. coli* strains promote cancer development in infected eukaryotic cells thanks to their biofilm structure.

In this study, it was aimed to determine the different anticancer effects of bee products obtained from the Yığılca honey bee ecotype, *Apis mellifera anatolica*, an endemic population, that have not been studied before, including biofilm, cytotoxicity and proapoptotic effects.

2. MATERIAL AND METHODS

Six different bee products (honey, pollen, perga, propolis, royal jelly, and bee venom) were obtained from Duzce University Beekeeping Research Development and Application Center.

Stock solutions were prepared in sterile falcon tubes by diluting the stock solution of honey at a ratio of 1:2 (v/v) and the stock solution of bee venom at a ratio of 1:20 (w/v) with sterile distilled water. For preparing the extracts of pollen and perga, owing to their similar structure and content, 1:3 (w/v) pollen and 1:5 (w/v) perga were macerated in methanol for approximately 48 h. Both solutions were kept in a magnetic stirrer at 150 rpm for approximately 7 h until completely dissolved. The solutions were filtered using Whatman No. 4 paper. The prepared methanol extracts were first treated at 50 °C for 30 min and then at 65 °C for 5 min in a rotary evaporator to remove the methanol. The samples were dissolved in DMSO, and the stock solutions were stored in the dark at 4 °C. Royal jelly was diluted 1:2 (v/v) with cold PBS to prepare a stock solution. The prepared 10% Propolis extract was diluted with DMSO at a ratio of 1:2 before the studies, and a stock solution was prepared.

E. coli isolates obtained from Dokuz Eylül University Faculty of Science were examined for biofilm formation using the microplate biofilm assay. In 96-well microplates, 100 µL of MHB and BHIB media were added. These media were prepared with four different glucose concentrations: 0.5%, 1%, 3%, and 5%. Then, 100 µL of bacterial suspension from the fresh culture at 0.5 McFarland turbidity was added to each well. MHB and BHIB media supplemented only with glucose served as the control

group. The microplates were incubated at 37 °C for 48 hours. After incubation, wells were washed thrice with 200 µL PBS, dried at 65 °C for 20 minutes, and fixed with 200 µL 99% methanol for 5 minutes. Wells were then emptied, dried, and treated with 200 µL 0.3% crystal violet dye for 15 minutes. Microplates were washed thrice with distilled water, dried, and 200 µL 95% ethanol was added to each well. OD was recorded at 560 nm using a microplate reader. Among the isolates whose cutoff value was calculated according to the negative control, the *E. coli* strain that formed a strong biofilm was selected.

After the appropriate conditions are determined bee products' potential to prevent biofilm formation was tested using a microplate biofilm assay. Initially, 100 µL of sterile MHB medium was added to a flat-bottomed 96-well microplate. Then, 50 µL of four different concentrations (6.25%, 12.50%, 25%, and 50%) of diluted bee product solutions were added. Next, 50 µL of fresh *E. coli* culture adjusted to 0.5 McFarland turbidity was added, and the plate was incubated at 37 °C for 48 hours. Positive control contained 100 µL of *E. coli* and 100 µL of medium, while negative control had only 200 µL of medium. After incubation, washing and staining processes were repeated as described in the previous step. The experiment was duplicated. Percent inhibition of OD values measured at 560 nm was calculated using the following formula: “ $[(OD_{\text{positive control}} - OD_{\text{sample}}) / OD_{\text{positive control}}] \times 100$ ” .

For cell viability assessment, HCT116 colon cancer cells were cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 200 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin at 37 °C with 5% CO₂. Cell viability was evaluated using WST-1 assay. Cells were seeded in 96-well microplates and incubated for 24 hours. Then, bee product samples at concentrations of 50%, 25%, 12.5%, and 6.25% were added. After 24 and 48 hours, WST-1 reagent was added, and after 4 hours of further incubation, absorbance was measured at 540 nm.

To observe apoptotic pathway analysis, HCT116 cells were treated with 25% and 50% concentrations of bee products for 24 hours in 6-well plates. Protein isolation was performed using RIPA lysis buffer, and protein concentration was determined using BCA protein assay. Cell supernatant samples were subjected to colorimetric human caspase 3, 8, and 9 ELISA kits. Protein expression levels were measured at OD 450 nm on an ELISA reader.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Version 10.0.2(232)) software. Data are presented as mean $\pm$ SD. The significance of the effect levels compared to the control was determined using One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests with a 95% confidence limit ($p < 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

The results of the study provide convincing evidence for the significant effect of bee products on biofilm formation by *E. coli* and their antiproliferative effects on the HCT116 colon cancer cell line, as well as providing insights into their effects on key proteins that regulate apoptosis.

Long used in traditional and complementary medicine, bee products show a variety of therapeutic effects, including anti-cancer and antimicrobial properties. This study investigated the cytotoxic potential of bee products on HCT116 colon cancer cells and their effects against *E. coli* biofilm inhibition. Notably, bee venom exhibited significant biofilm inhibition (>70%) and a remarkable cytotoxic effect (72.50%), inducing apoptosis through caspase activation. Royal jelly showed a pronounced antiproliferative effect (86.54%) and upregulated intrinsic and extrinsic apoptosis markers. Propolis, while less effective in biofilm inhibition, demonstrated antiproliferative effects and increased caspase 9 expression. Honey, rich in antibacterial compounds, inhibited biofilm formation (>50%) and suppressed HCT116 cell growth (86.50%). Both pollen and perga displayed antibiofilm capacities and a bidirectional promotion of apoptosis in cancer cells. These findings underscore the therapeutic potential of bee products against cancer and microbial infections, offering natural remedies with selective cytotoxicity and diverse health benefits.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK

Known for their therapeutic potential in traditional and complementary medicine, bee products attract great attention for their various benefits, including fighting infections and cancer.

The study investigated the effect of various bee products on biofilm formation of *E. coli* and their antiproliferative effects on the HCT116 colon cancer cell line. Bee venom showed the highest inhibitory effect on biofilm formation, followed by honey, perga, royal jelly and pollen, while propolis showed a lower inhibitory effect. In terms of antiproliferative effects, royal jelly and honey showed the highest inhibition of cell

proliferation; Bee venom also showed significant effectiveness. Analysis of proteins that regulate apoptosis revealed that bee venom stimulates both intrinsic and extrinsic pathways, while other bee products also trigger apoptosis through various pathways.

Overall, the study highlights the therapeutic potential of bee products in combating bacterial infections, inhibiting cancer cell proliferation, and inducing apoptosis in cancer cells. Additional investigation into the particular bioactive substances and molecular mechanisms responsible for these effects is necessary to completely elucidate their therapeutic potential and optimize their application in managing and treating diseases.



1. GİRİŞ

Arı ürünleri farklı medeniyetler tarafından çağlar boyunca tedavi amaçlı kullanılmışlardır. Arı ürünlerinin direnç gelişimine olanak vermeden gösterdiği antimikrobiyal aktivitesi ve sağlıklı hücrelerle kanserli hücreleri ayıran seçici sitotoksik etkisi araştırmalarda öne çıkmaya başlamıştır (Weis vd., 2022).

Bal, besin değeri oldukça yüksek, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip, apiterapide sıkça kullanılan ürünler arasındadır (Al Naggar vd., 2021). Arı sütünün biyoaktif zengin içeriği hücre üretimi, doku yenilenmesi ve hücre metabolizmasında düzenleyici etki sağlayarak, bağışıklığı ve uzun ömürlülüğü destekler. Arı sütünün yapılan çalışmalarda tümörü küçülttüğü, metastazı baskılamaya yardımcı olduğu ve kronik yorgunluğu ortadan kaldırdığı görülmüştür (Al Naggar vd., 2021; Çelik vd., 2022). Propolis içerdiği bileşenlerin sinerjik etkisi, toksik olmaması nedeniyle enfeksiyon hastalıklarının tedavisi, cilt bozukluklarının giderilmesi (yara, akne, yanık) gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca apoptozu indükleyerek antitümör etki gösterdiği bildirilmektedir (Al Naggar vd., 2021). Apitoksin olarak da bilinen arı zehrinin önemli bir bileşeni olan melittinin hücresel ölüm mekanizmalarını (apoptoz ve nekroz) tetiklediği ve tümörü engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca çoklu ilaç direnci ve MRSA gibi biyofilm üreten bakterilerin arı zehrine duyarlı olduğu da belirtilmiştir (Kurek-Górecka vd., 2020; Al Naggar vd., 2021). Arı poleni ve perga içerdikleri flavonoidler ve probiyotikler ile bağırsak mikrobiyomunu düzenlemede, sindirim ve bağırsak bozukluklarını gidermede etkilidir. Bağışıklık tepkisini düzenledikleri, normal hücrelere toksik etki olmadan antiproliferatif etki gösterdikleri de çalışmalarla ortaya konmuştur. Perga, polene göre protein ve yağ miktarı azken, daha yüksek oranda K vitamini, indirgenmiş şeker ve sindirim enzimleri içermektedir (Khalifa vd., 2020; Al Naggar vd., 2021).

Gastrointestinal kanalda mevcut diyet etkenlerine ve sindirim bileşenlerine bağlı olarak onkometabolitlerin veya tümör baskılayıcı metabolitlerin kompozisyonu ve fonksiyonu bağırsak mikrobiyotası tarafından düzenlenmektedir (Bultman, 2017). Bu katman, bakteri-epitel temasını ve dolayısıyla mukozal inflamatuvar reaksiyonları engelleyerek çeşitli yabancı antijenlere toleransı sağlar. Buna karşılık, bakteriler, bir biyofilm

oluşumu ile kolonu koruyan mukus tabakasına sızarak, epitelyal mukoza ile temasa geçebilir. Bu durumda biyofilm patolojik bir etki göstererek, kronik mukozal iltihaplanma geliştirebilir. Kolonik mukozal biyofilmlerin, kanser metabolomunu değiştirerek hücrel proliferasyonu arttıran ve kanser büyümesini tetikleyen bir düzenleyici ürettiği belirlenmiştir (Johnson vd., 2015; Mirzaei vd.,2020).

Bazı *Escherichia coli* suşları, bağırsak mikrobiyal dengesini bozabilmekte, intra ve ekstra-intestinal enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Kosari vd., 2020).

Biyoinformatik çalışmalarda patojenik *E. coli* popülasyonu sağlıklı insanlara oranla kanser hastalarında daha fazla tespit edilmiştir. *E. coli* suşlarının, enfekte olan ökaryotik hücrelerde, hücreleri kanser gelişimine yönlendirdiği ortaya konmuştur (Mirzarazi vd., 2022). Örneğin, kolon kanseri hastalarının tümörlerinde mukoza ile ilişkili ve internalize *E. coli* suşunun normal dokuya göre daha yüksek düzeyde olduğu rapor edilmiştir. Mukozoda *E. coli* kolonizasyonu, tümör, nodül ve metastaz evresi gibi kolon kanserinin kötü prognostik faktörleriyle ilişkilendirilmiştir (Bonnet vd., 2014).

Kolon kanserinde kullanılan kemoterapötik ajanlar, sağlıklı hücrelerde istenmeyen yüksek toksisite oluşturur. Kaspaz aracılı apoptoz, hastalıkla mücadelede ve metastazın durdurulmasında kullanılacak önemli bir yoldur (Manimaran ve Azman, 2023).

Normal hücreleri kanserleşmeden koruyan veya mevcut kanser hücrelerini hedefleyen ve hücreyi kontrollü apoptotik yolağa sokan ajanların araştırılması önem kazanmıştır. Geçmişten günümüze önemli yeri olan arı ürünleri bu amaca ulaşmada yardımcı olabilir.

Bu çalışmada, Yığılca bal arısı ekotipinden elde edilen arı ürünlerinin biyofilm, sitotoksik ve pro-apoptotik etkiler olmak üzere daha önce çalışılmamış diferansiyel antikanser aşamalarının belirlenmesi amaçlandı.

1.1. APİTERAPİ

Apiterapi; genel sağlığı korumak, hastalığı önlemek veya iyileştirmek amacıyla bal, polen, arı sütü, propolis, arı zehri gibi arı ürünlerinden yararlanmaktır. İnsanlık yüzyıllar boyu çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde arı ürünlerinden faydalanmış ve apiterapi birçok ülkede tamamlayıcı tıp olarak kullanılmıştır. Günümüzde de arı ürünlerinin içerdikleri besin maddelerinin çeşitliliği ve zenginliği

nedeniyle nutrasötik ve besin takviyesi olarak tüketimi artmıştır (Al Naggar vd., 2021; Weis vd., 2022).

Son yıllarda arı ürünlerinin farmakolojik aktivitesine ilişkin çalışmalar hız kazanmıştır. Klinik araştırmalarla birlikte *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar da, profilakside, homeostazın sağlanmasında ve çeşitli hastalıkların tedavisinde arı ürünlerinin kullanılabileceğini ortaya koymaktadır (Weis vd., 2022).

Arı ürünlerinin yüksek sağlık yanlısı özellikleri, içerdikleri şekerler, proteinler, yağ asitleri, fenolik bileşikler ve vitaminler gibi biyoaktif maddeler açısından oldukça zengin olmasından ileri gelmektedir. Bu bileşikler, arı ürünlerinin antimikrobiyal, antioksidan, antiviral, antiinflamatuvar, antifungal ve kardiyoprotektif gibi birçok fonksiyonel biyoaktif özelliğine katkıda bulunmaktadır. Bağışıklıkla ilgili çeşitli sendromların tedavisinde kullanılan arı ürünleri, prostat, akciğer ve karaciğer kanseri dâhil olmak üzere pek çok *in vitro* kanser hücre hattı çalışmalarında apoptozu indüklediği ve antikanser ajan olma potansiyeli rapor edilmiştir (Ayna vd., 2021; Al Naggar vd., 2021; Sawicki vd., 2023).

Arı ürünleri, biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve toksik olmayan yapı gibi çok yönlü biyolojik özelliklere sahiptir. Bu özellikleri, onların sağlık açısından doğal ürünler olarak değerlendirilmelerinin önünü açar.

Bal, propolis, polen ve perga, arıların bitkilerden topladığı bitkisel bileşenlere kendi salgılarını ekleyerek oluşturduğu ürünlerdir. Arı zehri ve arı sütünü ise arı, doğrudan kendi vücudundan kimyasal olarak üretilip salgılamaktadır (Şengül ve Vatansev, 2021; Al Naggar vd., 2021). Buna bağlı olarak arı ürünlerinin içeriği, arı ırkına, iklim özelliklerine, bitki örtüsüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Arı ürünlerinin apiterapötik olarak kullanımında, güvenilir kaynaklardan elde edilmesi büyük önem arz etmektedir (Özdemir vd., 2021).

1.1.1. Bal

Bal, çeşitli bal arısı türleri (*Apis sp.*) tarafından bitki çiçeklerindeki nektarlardan veya bitki floemini besleyen böceklerin salgılarından veya her ikisinin karışımından toplanarak üretilen doğal bir üründür. Toplanan bu kompleks ürün, arının kendine özgü salgılarıyla değişime uğrayarak petek gözlerinde olgunlaşması için depolanır (Premratanachai ve Chanchao, 2014).

Bal botanik kaynağa bağılı olarak bileşimi değışen, viskoz ve aromatik bir üründür. Botanik kaynakların farklılığı, arı ırklarının/izolatlarının farklı yiyecek arama stratejileri, mevsimsel, biyocoğrafik koşullar ve işleme, depolama faktörleri bal bileşiminde değışikliklere sebep olur. Bal esas olarak yüksek oranda şeker (fruktoz, glikoz, sukroz, maltoz, izomaltoz, trealoz, maltotrioz vb.), su ve enzimlerden (invertaz, α - ve β -amilaz, glikoz oksidaz, katalaz) oluşur. Bunun yanı sıra vitaminler (çoğunlukla B ve C), bazı mineraller (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn ve Zn), polen taneleri, polifenolik bileşikler (flavanoid, karetenoid ve fenolik asitler) nispeten düşük miktarlarda bulunsalar da balın en çok araştırılan özelliğı olan antioksidan etkisi bu maddelerden kaynaklanır (Premratanachai ve Chanchao, 2014; Szabat, vd., 2019; Weis vd., 2022).

Balın, apiterapide kullanımına ilişkin, yara iyileşmesi, oral mukozit tedavisi ve kardiyovasküler koruma açısından potansiyelini ortaya koyan pek çok çalışma yapılmıştır. Baldaki polifenolik bileşikler, anti-inflamatuar etki sayesinde, doku epitelizeşyonunu teşvik ederek yara iyileşmesini hızlandırır ve ağrıyı hafifletir. Bal, bağırsak mikrobiyotasının dengesinin korunması için probiyotik bakterilere iyi bir substrattır. Balın, ayrıca baş dönmesi, yorgunluk, nörolojik hastalıklar, göz hastalıkları, egzama, boğaz enfeksiyonu, bronşiyal astım, tüberküloz, hepatit, diyabet, solucan istilası, kabızlık, basur ve mide-bağırsak hastalıklarının tedavisinde de kullanıldığı ve olumlu sonuçlar elde edildiğı rapor edilmiştir (Silici, 2019; Weis vd., 2022).

Balın antibakteriyel etkinliğı düşük su içeriğı ve glikoz oksidaz enziminin varlığıyla yakından bağlantılıdır (Weis vd., 2022). Arıların hipofaringeal bezlerinde üretilen glikoz oksidaz enziminin, baldaki glikozu okside etmesi sonucu oluşan hidrojen peroksit, balın antibakteriyel etkisini belirleyen önemli bileşiklerden biridir (Silici, 2019).

Ayrıca su içeriğinin az, şeker miktarının yoğun olmasına bağılı olarak bal, yüksek ozmotik basınç özelliğı sayesinde bakteri büyümesi ve üremesini engeller, biyofilm oluşumunu sınırlandırır. Balın pH'ı da bakteri çoğalmasına elverişsiz ortam oluşturduğundan antimikrobiyal etkide önemli bir etkindir (Szabat, vd., 2019).

Son çalışmalar balın, birçok kanser hücresinde apoptoza neden olan antiproliferatif etkisini de göstermiştir. İçerdiği bileşiklerin hücre döngüsünün durmasına, oksidatif stresin azaltılmasına ve immün modülasyona neden olduğu da bildirilmektedir.

Bal, makrofajlar, B ve T lenfositlerin uyarılmasıyla bağışıklık sisteminin tetiklenmesi

ve kaspaz 9'a bağlı apoptotik yolların aktivasyonu ile tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu, tümörün küçültülmesi gibi etkilere sahiptir (Szabat, vd., 2019).

1.1.2. Arı Sütü

Genç işçi arıların hipofaringeal (boğaz) ve mandibular (çene altı) bezlerinde üretilen arı sütü, beyazımsı sarı renkte, asidik ekşi tadı olan viskoz bir maddedir. Besin değeri oldukça yüksektir ve larvaların beslenmesinde kullanılır. İşçi arılar larva dönemlerinin ilk 3 günü bu besinden faydalanırken, kraliçe arı tüm hayatı boyunca arı sütü ile beslenir. Kraliçe arı, işçi arılarla aynı diploid genomdan gelmesine rağmen onlardan iki kat daha büyüktür. Üreme için özel bir anatomi geliştirmiştir. Yalnızca birkaç hafta yaşayan işçi arılardan farklı olarak da 5-6 yıl kadar uzun bir ömür yaşar. Bu gerçekler insan sağlığı, fertilité ve uzun ömür için arı sütünün kullanılması fikrini destekler (Şengül ve Vatansev, 2021; Weis vd., 2022; Baptista vd., 2023).

Arı sütü su, proteinler, karbonhidratlar, lipitlerden oluşan, başta 10-hidroksi -2-desenoik asit (10-HDA) olmak üzere serbest yağ asitleri, flavon ve flavonoller, hormonlar, vitaminler ve mineraller gibi terapötik özelliklere sahip biyoaktif bileşenler bakımından zengin bir arı ürünüdür (Baptista vd., 2023). İnsan için gereken tüm esansiyel aminositleri içeren arı sütünde başta glutamik asit ve aspartik asit olmak üzere tanımlanan 29 aminoasit ve türevleri vardır (Şengül ve Vatansev, 2021).

İmmünomodülatör etki gösteren 10-HDA, arı sütünün kalite parametresi olan en önemli bileşenidir ve arı sütünde major yağ asidi olarak bilinir (Weis vd., 2022). Arı sütünün antibakteriyel etkisi 10-HDA bileşenine atfedilmekte, bunun yanı sıra royalisin, jelleinler, aspimin ve royalaktin gibi peptidlerin de antibakteriyel aktiviteye katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (Viuda-Martos vd., 2017). Arı sütü ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kanser hücrelerinin istilasını durdurduğu ve metastazı engellediği bildirilmiştir (Jovanović vd., 2018; Jovanović vd., 2023).

Arı sütü zengin biyoaktif bileşiklerin çeşitliliği göz önüne alındığında, apiterapide antioksidan, anti-aging, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, nörotrofik, antineoplastik, antidiyabetik, antiromatizmal, yorgunluk giderici, osteoporoz riskini önleyici ve yara iyileştirici özellikler dâhil olmak üzere birçok fayda gösterir. Kolesterol düşürücü ve hipotansif etkisi olan bir madde olarak kardiyovasküler hastalık riskini azaltabilir. Hormonal düzenleme ve menopoz semptomlarını gidermede faydalı etkileri vardır (Szabat, vd., 2019; Weis vd., 2022).

1.1.3. Propolis

Propolis, arıların ağaç kabuğu ve yaprak tomurcukları gibi reçineli maddelerle birlikte, bitki salgılarını da kullanarak, bir miktar enzimatik değişikliklerle ve balmumu ekleyerek ürettiği, toksik olmayan bir maddedir. Propolis kelimesi Yunanca “şehrin savunulması” anlamına gelir ve hakikaten de arılar tarafından kovan hijyenini ve ısını ve ısısını sağlamak, çatlakları doldurmak ve böcek gibi davetsiz misafirlere karşı korunmak için üretilirler.

Propolisin kimyasal içeriği coğrafi bölgeye, botanik kaynağa ve toplanma zamanına göre büyük değişkenlik göstermektedir. Buna rağmen 300’den fazla bileşenin bulunduğu ve zengin içeriği sayesinde insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri çalışmalarda bildirilmiştir. Propolisin lipid içeriği karbonhidrata oranla daha yüksektir. Yaklaşık %45-55’ini reçine; %25-35’ini yağ asitleri ve balmumu; %10’unu uçucu yağlar; %10’unu polifenolik bileşikler; %5’ini polen; geriye kalan %5’ini de organik bileşikler, vitamin(B1, B2, B6, C ve E vitaminleri) ve mineraller (Mg, Ca, K, Na, Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Co) oluşturur (Szabat, vd., 2019; Şengül ve Vatansev, 2021; Weis vd., 2022).

Yığılca propolisinin içeriğini anlamak amacıyla yapılan bir çalışmada, 3 farklı lokasyondan toplanan propolislerin kimyasal bileşenleri, aminoasit ve vitamin içeriği, toplam fenol-flavonoid içeriği belirlenmiştir. Propolis örneklerinin içeriği bölgelere göre değişmiştir. Kafeik asit oranı tüm örneklerde yüksek düzeyde bulunurken, trans-kalkon flavonoid türevi hiçbir bölgenin propolisinde tespit edilememiştir (Kekeçoğlu vd., 2022).

Propolis, apiterapide bileşenlerinin bolluğu nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde hem harici hem de dâhili olarak kullanılmaktadır. Grip ve soğuk algınlığında, cilt bozukluklarında (yaralar, yanıklar ve akne), psoriaziste, kulak burun boğaz rahatsızlıklarında, jinekolojik hastalıklarda, çürüklerin önlenmesi, diş eti iltihabı ve stomatit tedavisinde endikedir.

Propolisin kronik inflamasyonu azaltmak için, diğer arı ürünleriyle eş zamanlı kullanımı tavsiye edilmektedir. Propolisin antibiyotiğe dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde olumlu etki göstermiştir (Weis vd., 2022). Bakteriyel hücre bölünmesi ve protein sentezini engelleme yeteneği ile bakteri duvarını ve sitoplâzmasını tahrip ederek bakteri ölümüne neden olur (Şengül ve Vatansev, 2021). Ayrıca diş eti ve diş dokusunda hastalıklara neden olan mikroorganizmaları, mikrobiyom dengesini

koruyarak ortadan kaldırdığı belirtilmiştir (Weis vd., 2022).

Antibakteriyel aktivitesinin yanı sıra üretilen kollajen miktarını artıran antioksidan etkisi ile yara iyileşme sürecine de önemli destek sağlar. Ayrıca propoliste bulunan pek çok vitamin, mineral ve flavonoidin varlığı da bazı enzimatik reaksiyonları ve hücre metabolizmasını hızlandırır, kan dolaşımını iyileştirerek yara iyileşmesi üzerinde faydalı bir etki gösterir.

Propolis, kanser hücrelerine karşı seçici toksisitesi ve sağlıklı hücrelere karşı düşük toksisitesi nedeniyle kanser tedavisiyle ilgilenen araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Propolisin önemli bileşenlerinden kafeik asit fenil ester (CAPE)'in kanser önleyici etkisi bildirilmiştir (Szabat, vd., 2019). Propoliste bulunan kalkon gibi flavonoidler de kanser hücrelerinin bölünmesini engelleyebilen anti-tümör aktiviteye sahiptir. CAPE, flavonoid gibi bileşenler sayesinde propolisin, proliferasyon, anjiyogenez, metastaz, iltihaplanma ve kanser epigenetiğinin düzenlenmesi gibi kanser işaretlerine karşı umut verici biyolojik aktiviteler sergilediği bildirilmiştir. Propolisin kanser hücresinde DNA sentezini inhibe etme, apoptozu aktive etme ve lökosit fonksiyonunu düzenleme yeteneği de çalışmalarda gösterilmiştir. (Szabat, vd., 2019; WalyEldeen vd., 2023). Araştırmacılara göre propolisin meme kanseri, akciğer kanseri, ağız kanserinin yanı sıra yemek borusu, mide, kolon, prostat ve cilt kanserlerinin gelişimini engelleme etkisi vardır (Machado, vd., 2016; dos Santos, vd., 2019; Nasirli, vd., 2022; Falcão, vd, 2023).

Antibakteriyel ve antikanser özelliklerinin yanında *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar propolisin çok çeşitli etkilerini ortaya çıkarmıştır. Bunlar antialerjik, antifungal, antiviral, immünomodülatör, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, nöroprotektif, nefroprotektif, antidiyabetik, hipolipidemik, antihipertansif, yaşlanma karşıtı, ülser önleyici ve enfeksiyonlara karşı iltihap önleyici etkilerdir (Weis vd., 2022).

1.1.4. Arı Zehri

Apitoksin olarak da adlandırılan arı zehri, bal arılarının karın boşluğunda bulunan zehir bezlerinde üretilir. Keskin kokulu, acı tatta, asit reaksiyonlu, sarımtırak renkte, suda çözünebilen bir sıvıdır. Hava ile temasında hızla kuruyup, kristalleşir (Szabat, vd., 2019). Zehirdeki tüm maddeler arasında en büyük miktarda bulunan %88 oranla sudur. Kalan %12lik kısımdaki ana bileşenler ise melittin, apamin, mast hücresi degranüle edici peptid (MCD) gibi peptidlerin yanında, hyaluronidaz ve fosfolipaz A2 enzimleri ve histamin, dopamin, noradrenalin gibi aktif aminlerdir. Bu maddelerin tümü

apitoksinin özelliklerinden ve aktivitesinden sorumludur (Szabat, vd., 2019; Şengül ve Vatansev, 2021).

Farmakolojik önemli aktif maddeler içeren bu zehrin en önemli bileşeni, kimyasal yapının yaklaşık %50'sini oluşturan polipeptit yapıdaki melittindir. Melittin, fosfolipaz A2'ye yardımcı olarak hızla kana karışır ve hücrelerin parçalanmasına yardımcı olur. Arı zehrinde bulunan diğer önemli polipeptit ise apamindir. Arı zehrinde yaklaşık %2-3 oranında bulunan apamin merkezi sinir sistemini uyarırken aynı zamanda iltihap önleyici bir maddedir. Enzim yapısında olan fosfalipaz A2 arı zehrinde %12 dolayında bulunur ve etkili bir alerjen olduğu için zehrin yapısındaki en etkili maddelerden birisidir.

Peptidlerden zengin arı zehri, Multiple skleroz (MS) gibi otoimmün rahatsızlıklarda, romatoid artrit, osteoartrit gibi dejeneratif hastalıklarda, Alzheimer ve Parkinson gibi norodejeneratif hastalıklarda kullanılan apiterapötik bir ajandır. Arı zehri, içerik açısından detaylı olarak incelenmiş ve biyolojik etkilerinin hangi bileşenlerden kaynaklandığı araştırmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır (Şengül ve Vatansev, 2021). Ancak arı zehrinden izole edilen bileşikler ayrı ayrı sitotoksik bir etki gösterebilse de, bu bileşenler sinerjistik olarak hareket edebildiğinden, olumsuz etkilere yol açmadan bazı inflamatuvar durumların tedavisinde daha yararlı olabileceği bildirilmektedir (Weis vd., 2022). Arı zehrinin tümü ve içeriğindeki bileşenlerle ayrı ayrı yapılan çalışmalar sonucunda, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiartritik, antinosiseptif ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. (Karlıdağ ve Keskin, 2020; Şengül ve Vatansev, 2021).

1.1.5. Polen

İşçi arılar, çiçekli bitkilerin ana üreme hücresi olan poleni toplayarak, tükürük bezlerinden salgılanan amilaz, katalaz gibi enzimlerle karıştırır. Koloninin arı sütü üretimi ve yavru yetiştiriciliğinde protein gereksinimi için toplanır. Kovan girişine yerleştirilen polen tuzakları kullanılarak toplanan polen, besin değeri nedeniyle tüketimi her geçen gün artmaktadır. Diğer arı ürünlerinde olduğu gibi polenin de içeriği arının beslediği bitki çeşitliliğine, iklime ve coğrafi koşullara bağlı olarak değişmektedir. (Karlıdağ ve Keskin, 2020; Şengül ve Vatansev, 2021).

Arı polenindeki kimyasal bileşiklerin minimum ve maksimum değerleri arasında geniş bir aralık olmasına rağmen, ana bileşenleri proteinler, esansiyel aminoasitler,

karbonhidratlar, doymuş ve doymamış yağlar, fenolik bileşikler, vitaminler (A, B kompleksi, C ve E), potasyum, magnezyum, kalsiyum, fosfor, sodyum, demir, bakır, çinko, manganez ve selenyum gibi makro ve mikro elementler olarak özetlenebilir. Bu bileşimin zenginliği, arı polenini bir besin takviyesi olarak dikkate değer bir seçenek haline getirmektedir (Weis vd., 2022).

Arı poleni besleyici özelliklerinin yanında, aynı zamanda tedavi edici özellikleri nedeniyle de önemli bir gıda takviyesidir. Antioksidan, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikanser, immün sistemi düzenleyici ve antianemik aktivite sergiler. Polenin işlenme şekli, onu enzimler ve probiyotikler açısından zengin bir ürün haline getirir. Ülseratif kolit, kabızlık ve ishal gibi bağırsak sorunlarını giderir, inflamasyonu ve bağırsak geçirgenliğini azaltır. Polen apiterapide kas kütlesini artırma amaçlı reçete edilmiştir. Genel olarak geriatride, beslenme bozukluğu anoreksiyada, otoimmün hastalıklarda (tiroidit, multipl skleroz, lupus ve çölyak hastalığı), hafıza kaybında kullanımı tavsiye edilmektedir (Szabat, vd., 2019; Weis vd., 2022).

1.1.6. Perga (Arı Ekmeği)

Perga, bal arılarının poleni nektar ve sindirim enzimleriyle karıştırıp kovana balmumu ile paketlemesiyle elde edilir. Depolanan polen, zamanla mikroorganizmalardan gelen enzimlerin, nem ve sıcaklığın (35-36 °C) etkisiyle laktik asit fermentasyonuna tabi tutulur ve polenin kovana tesliminden yaklaşık iki hafta sonra perga halini alır.

Perganın bileşimi biyokimyasal olarak üretildiği polenin bileşimine benzemekle birlikte ondan biraz daha farklıdır. Laktik asit ve daha fazla miktarda K vitamini bulunması nedeniyle asitliği daha yüksektir. Polenden daha zengin karbonhidrat içerirken, protein ve yağ oranı polene göre düşüktür (Nagai vd., 2005; Szabat, vd., 2019).

Polenin pergaya dönüşümü esnasındaki biyokimyasal işlemler, polen zarfının çözülmesine ve polenin biyoaktif maddelerinin salınmasına sebep olur. Buna bağlı olarak perga, polene göre kolay sindirilebilen şekerler, yağlar, mineral bileşenler ve serbest aminoasit içeriği nedeniyle insan vücudu için emilimi ve sindirimi daha kolaydır (Kieliszek vd., 2018).

Bugüne kadar perga üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır, ancak besinsel değeri anlaşıldıkça daha fazla çalışma konusu olmaya başlamıştır. Son çalışmalarda *in vitro* antibakteriyel, antiviral, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidan, hepatoprotektif,

radıyoprotektif, immünomodülatör, anti-tümör ve adaptojenik özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir. Karaciğer, endokrin ve sinir sistemi fonksiyonları üzerinde olumlu etkileri vardır. Pergadan izole edilen crisin ve kaempferolün nöroprotektif, anksiyolitik ve antikonvülsan etkileri bildirilmiştir. Dokuları yeniler, hafızayı güçlendirir, alerjik reaksiyonları düzeltir (Kieliszek vd., 2018; Szabat vd., 2019).

Özellikle bir probiyotik kaynağı olduğundan, kolonoskopi yapılan veya antibiyotik tedavisi gören hastalarda bağırsak mikrobiyomunu düzenleyerek, sindirimi ve bağırsak bozukluklarını iyileştirebilir (Weis vd., 2022).

1.1.7. *Apis mellifera anatoliaca* Yığılca Ekotipi

Moleküler ve morfometrik çalışma sonuçlarına göre Türkiye'nin 7 coğrafik bölgesinde beş farklı arı ırkı olduğu bildirilmiştir. Ege, Akdeniz, İç Anadolu Bölgeleri ile Karadeniz Bölgesi'nin orta ve batı kesimlerinde *Apis mellifera anatoliaca*; Trakya kesiminde *Apis mellifera carnica*; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde *Apis mellifera meda*; Suriye sınırındaki Hatay civarında küçük bir bölgede *Apis mellifera syriaca*; Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nde *Apis mellifera caucasica* ırklarının yayıldığı gösterilmiştir (Kandemir vd.,2006; Kambur ve Kekeçoğlu 2018).

Bu alt türlerin yanı sıra, Türkiye'nin izole yerel alanlarında bulunan ve saf populasyon özelliğini koruyan pek çok ekotipler de tespit edilmiştir. Bunlarda biri de Batı Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Düzce ilinin, Yığılca ilçesinde yayılmış olan *Apis mellifera anatoliaca* Yığılca ekotipidir (Kekeçoğlu, 2010; Kekeçoğlu, 2018).

Yığılca ilçesi, Türkiye'nin kuzeybatısında yüksek dağların üzerinde kurulu olan, konumundan dolayı, doğal izole kırsal alanların bol olduğu bir bölgedir. Sanayileşmiş bölgelerden uzakta yer alan bu kırsal alanlarda, arı ürünlerinin kalitesini arttıracak birçok endemik flora türü bulunmaktadır. Coğrafyası ve iklim koşulları nedeniyle geleneksel gezici olmayan arıcılık daha yaygındır. Bu şartlar neticesinde Yığılca ekotipinin saf kalması mümkün olmuştur (Kekeçoğlu vd., 2022).

Yığılca arısı daha büyük boy, daha koyu renk ile karakterize edilirken, kanat ve bacak uzunlukları bakımından da diğer arı türlerinden ayrılmaktadır. Bal üretim kapasitesi *A.m.causica* ve *A.m. anatoliaca* alt türlerine oranla daha yüksektir (Kekeçoğlu, 2010; Kekeçoğlu, 2018).

1.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli, insan mikrobiyotasında önemli bir rol oynayan, Enterobacteriaceae ailesinden iyi karakterize edilmiş Gram-negatif bir bakteridir. İlk kez 1982 yılında gıda kaynaklı hastalıkların etkeni, önemli bir bağırsak patojeni olarak tanımlandı. Fırsatçı bir patojen olarak hareket etme potansiyeline sahip kommensal bir bakteri olan *E. coli* gastrointestinal sistemde baskın tür olmasının yanında biyofilmle ilişkili hastalıklarda en sık karşılaşılan türlerdendir. Genellikle bağırsak lümeninde zararsız ve sınırlı yaşarlar. Ancak bağışıklık sistemi baskılanmış konakçıda veya gastrointestinal bariyerlerin ihlali söz konusu olduğunda normalde hastalık yapmayan *E. coli* suşları enfeksiyonlara neden olabilirler. Yalnızca bağırsakta değil, insan vücudunun çeşitli yerlerinde de biyofilm oluşturarak enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Allocati vd., 2013; Ballén vd., 2022).

E. coli A, B1, B2, C, D, E ve F olmak üzere yedi filogenetik gruba ayrılmış olup ayrıca somatik (O), kapsüler (K) ve flagellar (H) antijenlerine göre de serotiplendirmeleri yapılmaktadır. Hastalık ve ölümlerin başlıca nedeni olan belirli patojenik *E. coli* türleri vardır. En iyi bilinen bağırsak patojenik türleri (InPEC) ishale neden olmalarından dolayı diyarejenik *E. coli* (DEC) olarak da belirtilir. InPEC grubu, Crohn hastalığı, enterik sendromlar ve kanamayla ilgili çeşitli toksin üreten *E. coli*'lerden oluşur. Bu grupta, enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Shiga-toksin üreten *E. coli* (STEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffüz aderent *E. coli* (DAEC) bulunmaktadır. Bağırsak dışı hastalıklara neden olan patojenik *E. coli* türleri ise ExPEC olarak adlandırılır. İnsanlarda idrar yolu enfeksiyonlarına, neonatal sepsise ve menenjitte neden olmaktadır (Omerovic vd., 2017; Aguirre-Sánchez vd., 2022).

E. coli enfeksiyon oluştururken belli bir strateji izlemektedir: (i) mukozal bölge kolonizasyonu; (ii) konakçı savunmasından kaçma; (iii) çoğalma; (iv) konakçı hasarı (Al-Harbi ve Al-Judaibi, 2020).

E. coli türünde biyofilm oluşumu iyi çalışılmış ve tanımlanmış, farklı aşamaları olan gelişimsel bir süreçtir. Gastrointestinal kanalda, konakçıdan ve kommensal bakterilerden gelen sinyallerin yanında çevresel koşullar da, *E. coli* biyofilm oluşumunun şekillenmesine katkıda bulunur (Ballén vd., 2022).

1.3. BİYOFİLM

İlk çoklu tür biyofilmleri, 1683 yılında Hollandalı bilim insanı Antonie van Leeuwenhoek tarafından kendi dişleri üzerinde oluşan beyaz birikintide çalışırken gözlemlendi. İlkel bir mikroskopla incelediği birikintide çıplak gözle görülmeyen ve hareket eden canlıların olduğunu fark etti. Onlara küçük hayvancıklar anlamına gelen “animakül” adını verdi (de Vos, 2015). “Biyofilm” terimi ise bir yüzeye bağlı mikrobiyal hücre topluluklarını tanımlamak için ilk olarak Bill Costerton tarafından 1978 yılında kullanılmıştır (Aydemir, 2018). Ancak artık yüzeye tutunmayan bir araya toplanarak agregasyon oluşturan bakteriler de biyofilm olarak kabul edilmektedir (Sauer vd., 2022).

Mikrobiyoloji tarihi boyunca bakterilerin yalnızca bireysel davranışlar sergileyen, asosyal organizmalar olduğu düşünülmekteydi. Artık günümüzde bakterilerin kimyasal ve elektriksel sinyaller aracılığıyla hücre-hücre iletişimi sağlayabildikleri ve grup davranışlarını koordine ederek, yüksek çok hücreli organizmalar gibi hareket edebildikleri kanıtlandı (Hickson vd., 2009; Flemming vd., 2016). Son 40 yıldır mikrobiyologlar bakterilerin doğada iki yaşam formunda bulunduğunu savunmaktadır. Birinci yaşam formunda bakteriler bağımsız, tek ve serbestçe yüzen planktonik formda görünürken, diğer yaşam formunda ise bakteriler mikrobiyal kümeler şeklinde biyofilm adı verilen yaşam formunda organize olmuşlardır (Sauer vd., 2022).

Biyofilmler, birbirine veya bir yüzeye dönüşümsüz olarak bağlanan mikroorganizmaların, kendi ürettikleri ekstraselüler matriks içerisinde gömülü oldukları, iyi organize olmuş, büyüme hızı ve gen transkripsiyonu gibi özelliklerle değişime uğrayan üç boyutlu topluluklardır. Fenotipik olarak planktonik formlardan farklılaşmış çok hücreli benzeri bu yapılar, bakteriler için antibiyotiklere, çevresel streslere, konak immün yanıtına karşı güvenli bir yaşam alanı oluşturmakla kalmayıp aynı zamanda bakteriler için enerji kazanımı sağlayabildikleri ve besin depolayabildikleri bir yaşam formudur (Karygianni vd., 2020; Ballén vd., 2022; Sauer vd., 2022).

Epidemiyolojik çalışmalara göre, insan vücudundaki enfeksiyonların %80 kadarı biyofilmle ilişkilidir. Ortopedik protezler, yapay kalp kapakçıkları, idrar sondaları, implantlar, kontakt lensler ve endotrakeal tüpler gibi pek çok tıbbi cihazda kolonize olan mikroorganizmalar yüzeyle ilişkili biyofilm oluşumu sonucunda, mevcut

enfeksiyonları kronik hastalıklara dönüştürebilmekte ve bu da mortalite ve morbidite oranlarını arttırmaktadır. Yüzeyle ilişkili olmayan biyofilmeler ise solunum yolu enfeksiyonlarına, diyabete, iyileşmeyen yaralar gibi yumuşak doku enfeksiyonlarına zemin hazırlamaktadır. Biyofilm oluşturma yeteneği, bakterilerin doğal ortamlarında uzun süre hayatta kalması, konakçının bağışıklık savunmasından kaçması ve antimikrobiyal maddelerin bu fiziksel bariyer içersine nüfuzunu kısıtlaması nedeniyle potansiyel tehdit oluşturmaktadır (Guchhait vd., 2022; Sauer vd., 2022).

Biyofilmlerde mikroorganizmalar kuru kütlenin %10'undan azını oluştururken, %90'dan fazlasını organizmaların kendileri tarafından salgılanan hidratlanmış hücre dışı polimerik maddeler (EPS) oluşturur (Flemming vd., 2016). EPS'nin bileşimi ve yapısı mikroorganizmaların türüne, yerel kayma hareketine, besin ve substratların varlığına ve konakçı ortama bağlı olarak değişmektedir. Mikrobiyal topluluk içinde tek tür veya çok tür olmasının EPS sentez ve organizasyonunda farklılık oluşturduğu gözlenmiştir. Biyofilm oluşumunda tanımlanan pek çok biyomolekül, iki ana kategoride incelenmektedir:

- (i) Hücre yüzeyi ile ilişkili olanlar: Flagella, tip IV pili ve fonksiyonel amiloidler örnek verilebilir. Hücrelerin yüzeye tutunmasında, bakteriyel yapışmada, mekanik stabilitenin sağlanmasında ve otoimmün tepkilerin düzenlenmesinde rol oynarlar.
- (ii) Hücre dışı olarak salgılananlar: Bakteriyel ekzopolisakkaritler, proteinler, sürfaktanlar ve hücre dışı nükleik asitler (eDNA ve eRNA) örnek olarak verilebilir. Hücre dışı salgılar, hücreSEL fizyolojiyi, biyofilmdeki organizmaların fizyolojik aktivitelerini belirler ve biyofilm mimarisinde hücreler arası boşluğu doldurarak mekanik stabilite sağlar.

Bakterilerdeki hücreden hücreye iletişim mekanizması olan quorum sensing (QS) sinyallerinin, EPS sentezini doğrudan etkilediği gösterilmiştir. QS, sinyal moleküllerinin hücreler arasında bilgi aktarımı için taşıyıcı olarak kullanıldığı ve ortamda biriken sinyal moleküllerinin yüksek konsantrasyonlarının tespit edilip, grup davranışlarının koordine edebileceği bir sistemdir. QS, EPS sentezi için yeterli enerji ve substrat materyali sağlamak üzere, ATP sentezindeki ve karbon metabolizma yollarındaki genlerin ekspresyonunu düzenleyerek EPS sentezini düzenler (Lv vd., 2023).

Olgun biyofilmlerin EPS ile sağlanan viskoelastikliği, sürekli sıvı kayma gerilimi veya yüksek mekanik basınç altında bile tutundukları yüzeyden ayrılmalarını zorlaştırır. EPS çeşitli antimikrobiyalere karşı difüzyon sınırlayıcı bir bariyer görevi görerek ilacın biyofilmin derin katmanlarına girmesini önler. EPS bileşenlerinin antimikrobiyallerle reaksiyonundan kaynaklı gecikmiş penetrasyon, enzimler tarafından antimikrobiyallerin inaktivasyonu veya bozunması ilaç toleransını artırır. Aynı zamanda antimikrobiyallerin biyofilm matriksi ile etkileşimi, antimikrobiyal toleransın spesifik genetik belirleyicilerini de değiştirebilir (Karygianni vd., 2020).

EPS özetle, hücre-hücre sinyalleşmesinde, ortamın su ve besin dengesini sağlamada, hücrelerin korunmasında ve gen ekspresyonlarında kritik rollere sahiptir (Muhammad vd., 2020).

1.3.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm yaşam döngüsü başlıca üç aşamada gerçekleşmektedir: tutunma, olgunlaşma ve ayrılma. Bu aşamaların oluşumunda, hücre yüzey mimarisi gibi bakterilerin kendi özellikleri ve çevresel ortamlardaki dışsal sinyaller, substratlar ve fiziksel kuvvetler etkilidir.

1.3.1.1. Tutunma

Tutunma aşaması, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki adımda gerçekleşmektedir.

Bakterilerin ilk tutunma aşaması, bakteri hücreleri ile yüzey arasındaki yapışmanın zayıf olmasından dolayı tersine çevrilebilir bir süreçtir. Bu süreçte elektrostatik, hidrofobik ve fiziksel etkileşimler, polarite, Van-der Waals kuvvetleri, bakterilerin yüzeye yapışmasını teşvik edebilir. Bunun yanı sıra yüzeyinin bileşimi, sıcaklığı, basıncı veya pH'ı bakterilerin yapışması için uygun değilse, çekme veya itme gibi dış ortam koşulları zorlayıcıysa, bakteriler planktonik duruma geri dönecektir (Öztürk vd., 2023; Li vd., 2023).

Ortam koşullarının üstesinden gelmeye yardımcı olan peritrik flagella, *E. coli*'nin aktif hareketliliği için mekanizma görevi görerek yüzeyle etkileşimi artırır ve tutunma için yüzeye teması sağlar. Flagella ayrıca yüzeyin algılanmasında da rol oynar (Ballén vd., 2022). Yüzeye tutunma gerçekleşikten sonra *E. coli* hücreleri hareketsiz hale geldiği için flagella sentezi baskılanır. Planktonik yaşamdan, sesil yaşama dönüşte siklik-diguanilik asit (c-di-GMP) adı verilen ikincil haberci rol oynar. Planktonik yaşamda c-

di-GMP konsantrasyonu düşüktür. Biyofilm oluşumu sırasında seviyesi yükselir. *E. coli*'de c-di-GMP molekülü hem flagellar motilitede, hem de biyofilm oluşumunda gerekli olan curli, selüloz ve PGA sentezinde rol oynamaktadır (Ballén vd., 2022).

Tutunmanın ikinci aşamasında ise bakteri ile yüzey arasında güçlü, geri dönüşü olmayan bir bağlanma gerçekleşir. Negatif yüklü olan bakteriler, çekme kuvvetinin itme kuvvetinden daha büyük olmasına bağlı olarak pozitif yüklü yüzeyde sabit kalır. Bakterilerin yüzeyle adezyonu ve birbirleriyle kohezyonu sonucu bu basamak geri döndürülemez hal alır. Bu aşamada artık mikrokoloni oluşumu gözlemlenir (Öztürk vd., 2023; Li vd., 2023).

Geri dönüşü olmayan bağlanmayı gerçekleştirmek üzere *E. coli* üç tür organeli kullanmaktadır: (i) Konjugatif pili (F pili); (ii) Curli fimbria; (iii) Tip1 fimbria.

- (i) Konjugatif pili (F pili): F plazmit üzerinde kodlanır ve hücreden hücreye yatay gen transferinde rol oynar. Hücre-hücre temasını sağlar, agregasyonu ve abiyotik yüzeylere bağlanmayı teşvik eder. F plazmidi, tutunma ve biyofilm olgunlaşmasıyla ilgili olan curli ve kolanik asit üretimini uyarmaktadır.
- (ii) Curli fimbria: *E. coli*'nin hücre yüzeyinde bulunan, hücre dışı matris proteinlerine bağlanan amiloid yapılardır. Hücre-yüzey ve hücre-hücre etkileşimini artırarak, hücre agregasyonunu ve biyofilm oluşumunu destekler. *E. coli*'yi korumanın yanında virülans özelliklerini de arttırdığı bulunmuştur.
- (iii) Tip1 fimbria: Bakterilerin birbirlerine yapışmasına ve başlangıçta bir yapışma katmanı oluşturmalarına olanak tanır. Fimbria ucunda bulunan FimH proteini sayesinde *E. coli* ökaryotik hücrelerde, EPS'de ve abiyotik yüzeylerde bulunan mannoza bağlanabilmektedir (Ballén vd., 2022).

1.3.1.2. Olgunlaşma

Bir sonraki aşamada, mikrokoloniler birleşir ve EPS oluşumuyla biyofilm üç boyutlu olgun bir hal alır. Mantar benzeri biyofilm yapısında besinleri ve suyu hücrelere taşıyan, istenmeyen maddeleri ortamdan uzaklaştıran dolaşım sistemi benzeri kanallar oluşur. Olgunlaşma süresince bakteriyel yüzey yapılarının üretimi engellenir. Bu nedenle mikrokolonilerin hareketliliği kısıtlanmıştır. Bu sesil hücrelerin gen ekspresyonları planktonik hücrelerden oldukça farklıdır (Öztürk vd., 2023; Li vd., 2023).

E. coli biyofilmlerinin olgunlaşma aşamasında üç ana polisakkarit rol oynamaktadır. Bunlar biyofilme şekil verir ve ayrıca yapısal destek sağlarlar.

- (i) Poli- β -1,6-N-asetil-D-glukozamin (PGA): Hücreden hücreye yapışmayı ve yüzeye tutunmayı destekleyen pozitif yüklü adezin polimeridir. Aynı zamanda biyofilmi satabilize etmektedir.
- (ii) Selüloz: Mikrobiyal selüloz, D-glikoza bağlı ve fibriller oluşturan β -(1,4) homopolisakkaritinden oluşur. Biyofilmin sert yapısından selüloz sentezi sorumludur.
- (iii) Kolanik asit: Bakteri hücresi etrafında koruyucu bir kapsül oluşturarak onları çevresel koşullardan koruyan, glikoz, galaktoz, fukoz ve glukuronik asitten oluşan negatif yüklü, dallanmış bir polimerdir. Düşük sıcaklıklarda sentezlenebilmesi sayesinde *E. coli*'nin hayatta kalmasında önemli rol oynar.

Bu polisakkaritlerin dışında hücre yüzey polisakkaritleri olan kapsüller polisakkaritler ve lipopolisakkaritler de *E. coli* biyofilmi oluşumuna dâhil olan bileşenlerdir. Kapsüller polisakkaritler, hücreyi sıkıca tutan ve yüzeyi saran yüksek molekül ağırlıklı yapılardır. Yüzey adezinlerini koruyarak biyofilm oluşumuna dolaylı katkı sağlamaktadırlar. Lipopolisakkaritler ise, hücre yüzeyinde bulunan yapışma faktörleriyle olan ilişkiye göre biyofilm oluşumunu artırıp, azaltabilmektedir (Ballén vd., 2022; Öztürk vd., 2023).

Bakterilerin gen ekspresyonunu hücre yoğunluğuna göre ayarlamasını sağlayan quorum sensing mekanizması da bu aşamada kendini göstermektedir. Bakteriler QS mekanizmasıyla salgılanan otoindüktörler (AI) olarak da adlandırılan küçük sinyal molekülleri sayesinde birbirlerinin varlığını algılayarak, yoğunluğa göre gen ifadesini düzenlerler. Bu sayede biyofilm olgunlaşması, hareketlilik ve virülans faktörlerinin ekspresyonu gibi davranışları düzenlemek mümkün olmaktadır.

E. coli'de en çok bilinen AI, biyofilm oluşumuyla ilgili olan LuxS enzimi tarafından üretilen AI-2 molekülüdür. Biyofilm oluşumunda AI-2 ekspresyonu yukarı regüle edilir ve LSR taşıyıcıları ile hızla dışarıya salgılanır. Optimum bakteri yoğunluğuna ulaşıldığında luxS geni aşağı regüle edilerek AI-2 üretimi engellenir (Ballén vd., 2022).

1.3.1.3. Dağılma

Son aşama, hücrelerin koparak biyofilmin dağılmasıdır. Ortamda besin ve oksijen azlığı, sıcaklık değişimi, yoğun rekabet gibi pek çok etken hücrelerin planktonik hale geçmesine sebep olabilir (Öztürk vd., 2023; Li vd., 2023). Dağılma, bakteri hücrelerinin fizyolojik ve çevresel koşullara yanıt olarak mevcut biyofilmden ayrılması ve genç bir

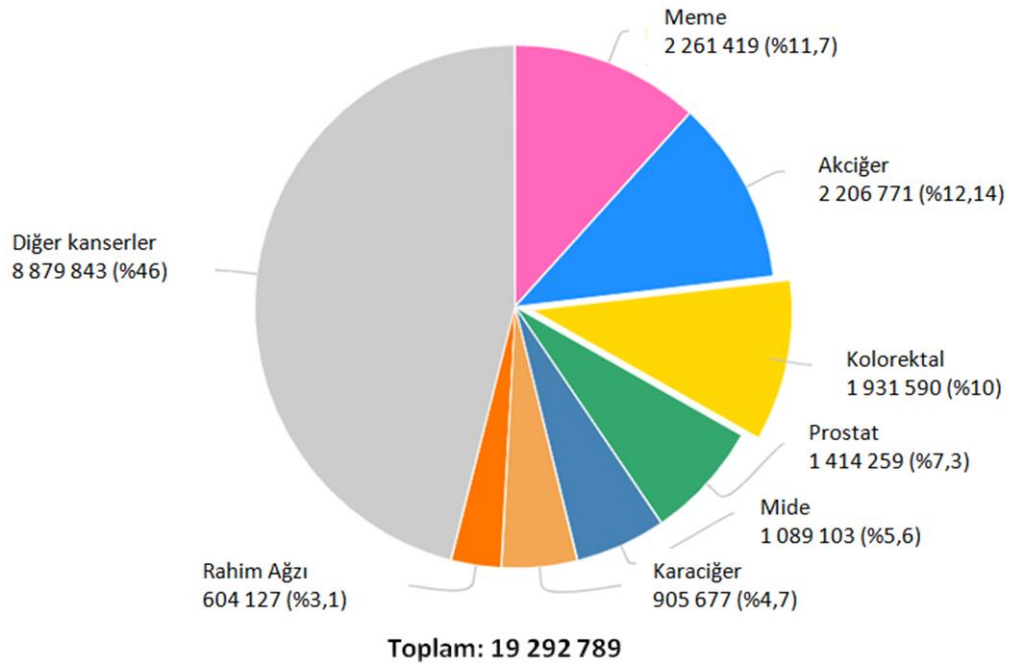
kritik düzenleyici genlerdeki (protoonkogen) biyokimyasal ve hücrel değişikliklerden kaynaklanan bir hücre proliferasyon hastalığıdır.

Hücre çoğalması tek başına kanser sebebi değildir. İnflamatuvar hücrelerin, DNA hasarına sebep olan faktörlerin ve büyüme faktörlerinin eşlik etmesiyle kanserleşme riski artar. Doku hasarı sonrası gelişen kronik inflamasyon, hücrelerin hızlı ve güçlü bir şekilde proliferasyona girmesiyle kanser indüksiyonuna sebep olur. Onkoproteinlerin kontrol edilememesi sonucu protoonkogenlerin onkogenlere dönüşmesi, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile karsinogenesis giden yolların aktifleşmesi, apoptozun inhibisyonu, kontrolsüz çoğalma, doğal bağışıklık sisteminin bozulması, hücrelerin kanserojenlere karşı daha fazla duyarlı hale gelmesi ve mutasyonların daha sık oluşması sonucu hücre tümörleşmeye gider.

Son 60 yılda kardiyovasküler hastalıklarda profilaksinin artmasına, enfeksiyon hastalıklarında aşı ve antibiyotik tedavilerinin geliştirilmesine bağlı olarak, erken yaşlarda (30-69) ölümlerin ilk sebebi artık kanser olarak bildirilmektedir (Bozgeyik, 2020).

Kanser insidansı verilerinde Dünya genelinde 2020’de sırasıyla en çok meme, akciğer ve kolorektal kanser türleri görölmüştür. Kanserden ölümlerde ilk iki sırada ise akciğer ve kolorektal kanserler bulunmaktadır. Kolorektal kanserin görölme sıklığı tüm kanser vakaları içinde %10 oranındadır. Kanser vakalarının çeşitliliği göz önüne alındığında bu oran azımsanamayacak kadar yüksektir. Kolorektal kanser grubu altında incelenen kolon kanseri ise %10’luk oranın %6’sını oluşturmaktadır (Şekil 1.2). Verilere 04.01.2024 tarihinde [Cancer Today \(iarc.fr\)](https://cancer.iarc.fr) sitesinden erişilmiştir.

2020 yılında Dünya genelinde yaş ve cinsiyet ayrımı olmaksızın görülen kanser vakaları



Şekil 1.2. Dünya genelinde 2020 verilerinde kanser vakalarının rakamları ve yüzdeleri.

İnsan vücudunda kolonize olmuş mikroorganizmalar da dâhil pek çok çevresel faktörün, neoplastik hücrelerin metabolizmasını ve fonksiyonunu değiştirebildiği, tümör mikro ortamını şekillendirebildiği bilinmektedir (El Tekle ve Garrett, 2023).

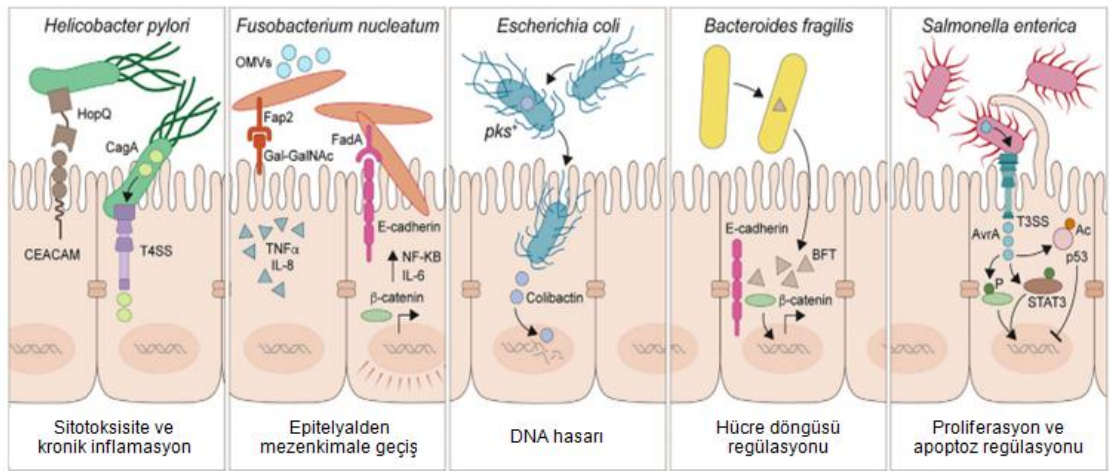
1.4.1. Kanser ve Mikrobiyota

Kanser oluşumunda, prognozunda, teşhis ve tedavisinde mikroorganizmaların rolleri yüzyıllardır tartışılmaktadır. Mikroorganizmaların çok azı doğrudan kansere sebebiyet vermektedir. Çoğunlukla konakçının bağışıklık sistemi üzerinden hareket ederek kanserin büyümesinde suç ortağı olduğu bildirilmiştir. Uluslararası Kanser Kayıtları Birliği (IARC) tarafından, dünya üzerindeki yaklaşık 10^{12} farklı mikrobiyal türden yalnızca 11'i insan kanserojenleri veya "onkomikrobikler" olarak etiketlenmiştir. Bunlardan "Epstein-Barr Virüsü, hepatit B virüsü, hepatit C virüsü, Kaposi virüsü, insan immün yetmezlik virüsü 1, insan papilloma virüsleri, insan T hücreli lenfotropik virüs tip 1" olmak üzere yedi tanesi virüs; "*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*, *Schistosoma haematobium*" olmak üzere üçü plathyelminth (yassı solucan) ve "*Helicobacter pylori*" olmak üzere biri bakteridir. Bu onkomikrobikler tahmini olarak senede 2,2 milyon vakaya neden olmaktadır. Bu da küresel kanser vakalarının yaklaşık

olarak %13'üne tekabül eder. Güçlü deneysel kanıtlar, başka mikroorganizmaların da genotoksin aracılığı ile hücreyi mutajeneze yönlendirdiğini ve kanseri başlattığını ileri sürmektedir (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012); Sepich-Poore vd., 2021).

Genotoksinler, insan gastrointestinal kanaldaki mikroorganizmaların diğer mikroorganizmalarla rekabet edebilmesine olanak sağlayan bakteriyel metabolitlerden biridir. Rakip mikroorganizmayı hedef alan genotoksinler serbest bırakıldığında konakçı hücreleri de etkileyebilir (El Tekle ve Garrett, 2023).

Kanserle ilişkilendirilen bakteriler, mikrobiyolojik ve mikrobiyom araştırmalarındaki son gelişmelere rağmen on yılı aşkın süredir güncellenmemiştir. IARC tarafından pro-tümörojenik mikroorganizma listesinde olan *H. pylori*'ye ek olarak daha pek çok bakterinin artık metagenomik ve *in vivo* çalışmalar neticesinde kanseri modüle edebildiği ve kansere katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Mikrobiyom içerisinde dikkate değer kanserojenler aşağıda özetlenmiş ve Şekil 1.3'de epitelial hücre yolları üzerindeki mikrobiyal etkilerin kanserle ilişkili çeşitli özellikleri verilmiştir.



Şekil 1.3. Epitel hücrelerinde neoplastik süreçler üzerindeki mikrobiyal etkiler (Cullin vd., 2021).

H. pylori mide epitel hücrelerine, dış membran adezin HopQ'nun CEACAM'a bağlanması yoluyla bağlanır; bu sayede virülans faktörü CagA, T4SS aracılığıyla doğrudan epitel hücrelerine enjekte edilir. CagA, Wnt/b-katenin yollarını aktive ederek düzensiz hücresel dönüşüm ve apoptozla sonuçlanır.

F. nucleatum kanseri birçok yolla tetikleyebilir. FadA gibi virülans faktörleri adezin,

hücrel içselleştirmeye ve NF- κ B ve IL-6'nın aracılık ettiği proinflatuar kaskadların indüklenmesine izin verir. Bir başka önemli adezin olan Fap2, Wnt/b-katenin yolu yoluyla hücrel proliferasyonu arttırmak, proinflatuar artışı arttırmak için tümör yüzeyindeki D-galaktoz-b (1-3)-N-asetil-D-galaktozamin (Gal-GalNAc) karbonhidrat parçalarıyla etkileşime girer. sitokin üretimine katkıda bulunur ve kanser hücresi istilasının, metastazın, köklüğün ve tedavi direncinin belirgin bir özelliği olan EMT'ye katkıda bulunur.

Patojenik *E. coli*, salgılanan genotoksin kolibaktin de dâhil olmak üzere klasik olarak patojeniteyle ilişkilendirilen virölans faktörleri ve toksinlerden oluşan bir repertuvara sahiptir. Konakçı hücre tarafından içselleştirildiğinde, tümör öncesi hücrel dönüşümler ve çoklu kanser genomlarında tespit edilen bir mutasyon imzası ile zincirler arası çapraz bağları ve çift iplikli DNA kırılmalarını indükler.

Enterotoksijenik *B. fragilis* (ETBF), bağırsak hücresi sıkı bağlantısını hedef alan ve E-kaderinin bölünmesine yol açan BFT'yi kodlar. Sonuç olarak bu, bağırsak geçirgenliğini artırır ve NF- κ B sinyali yoluyla kronik bağırsak iltihabına ve reaktif oksijen türlerinin artmasıyla doku hasarına neden olarak kolorektal kansere yol açar.

S. enterica Tip 3 salgılama sistemi (T3SS), Wnt/b-katenin aktivasyonu tarafından tetiklenen hücre çoğalmasının aktivasyonu yoluyla tümör oluşumunu destekleyen çok işlevli efektör AvrA gibi virölans faktörlerinin hücre içi enjeksiyonunu yönlendirir. MAPK ve AKT yollarının daha fazla aktivasyonu, kanserde hücrel dönüşümü sürdürmek için kritik öneme sahiptir (Cullin vd., 2021).

Mikrobiyotanın onkogeneze veya kanser prognozu üzerindeki potansiyel etkisine ilişkin araştırmalar için öncelikle bağırsak bariyerine odaklanılmıştır. Çünkü bağırsak bariyerinin en geniş konakçı-mikrobiyal arayüzü ve en büyük mikrobiyal çeşitliliği sunması, tümör ile bağırsak mikrobiyal kompozisyon değişiklikleri arasındaki neden-sonuç ilişkisini ortaya çıkarabilir (Sepich-Poore vd., 2021).

1.4.2. Kolon Kanseri

Kolon kanseri esasında sporadik ortaya çıkan, kalıtsal mutasyona rastlanmayan, genetik bir hastalıktır. Onkojenik gen mutasyonlarının kademeli olarak birikimi, önce kolon adenomlarına ve sonrasında kansere neden olan otonom kolonik epitel hücrelerin (CEC) poliferasyonuna yol açar. CEC büyümesiyle kolon tümörlerinin başlaması, yeni

başlayan tümörün büyümesi ve sonuçta kansere dönüşmesi olaylarına neden olan biyolojik değişiklikleri teşvik edenin ne olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Bununla beraber, mikrobiyomun, kolonik karsinogenezin başlatılmasında ve ilerlemesinde başlıca şüpheli olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Sears ve Garrett, 2014).

Kalın bağırsaktaki bakteri yoğunluğu (mL başına yaklaşık 10^{12} hücre), ince bağırsaktaki bakteri yoğunluğundan (mL başına yaklaşık 10^2) oldukça fazladır. Kalın bağırsakta kanser görülme riski, ince bağırsakla karşılaştırıldığında 12 kat daha yüksektir. Bu veriler kolon kanserini bakterilerin modüle edebileceği hipotezini akla getirmiştir (Al-Harbi ve Al-Judaibi, 2020).

Biyofilm araştırmalarında gastrointestinal sistemdeki biyofilmlerin karsinogenezi tetiklediği yeni bir gelişme olarak karşımıza çıkmaktadır. Çok sayıda çalışma kolon kanseri ile bağırsak epitelinde bulunan bakteriyel biyofilmler arasında bir korelasyon olduğunu bildirmektedir. Biyofilm pozitif normal bağırsak dokularında, artan epitel hücre proliferasyonu, epitelyal kaderinin (E-kaderin) lokalizasyonunun değişmesi gibi pro-onkogenik durumun belirteçlerine rastlanmaktadır (Chew, vd., 2020). E-kaderin tümör baskılayıcı olarak bilinen, hücre-hücre adezyonunun yürütülmesinde önemli role sahip bir transmembran glikoproteindir (Bozgeyik, 2020). Biyofilm, kolonik epitel hücresi E-kaderinin yeniden düzenlenmesiyle, bağırsak geçirgenliğini artırır, bağırsak bariyerinin fonksiyon kaybına neden olur ve sonunda bağırsak disbiyozu artar (Chew, vd., 2020). Son yıllarda yapılan pek çok çalışma, bireysel organizmaların, genetik olarak duyarlı fare hastalık modellerinde tümör oluşumunu tetikleyebildiklerini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar sonucunda, BFT toksini ifade eden enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* (ETBF), pks virülans adası ile *E. coli*, FadA ve Fap2 adezinlerini ifade eden *Fusobacterium nucleatum* gibi proonkogenik genleri barındıran tek türlerin kolon kanseriyle ilişkili olduğu fikri desteklenmiştir (Tomkovich vd., 2019).

Mukosal yüzeylerde bulunan kommensal bakteriler, konakçı fizyolojisi için çok önemli olan bağışıklık sistemi hücreleri ile etkileşime girer. Mukus bariyeri aşıldığında, fırsatçı patojenlerin istilasıyla atağa geçen inflamatuvar yanıtlar, proinflamatuvar veya immün baskılayıcı yolları tetikleyerek tümör oluşumuna sebep olur. Patojenik bir *E. coli* suşu, DNA'nın tümör oluşumuna sebep olduğu bilinen bir kısmına kovalent bağla bağlanarak, mutajenik DNA hasarına yol açan genotoksin kolibaktin üretir (Nadler vd., 2021).

Kolibaktin, poliketid sentaz (pks) pozitif *E. coli* tarafından bağırsakta üretilen genotoksik poliketid-peptittir. pks'ye maruz kalan hayvan modellerinde, DNA sarmalının kırıldığı ve tümör oluştuğu tespit edilmiştir. Kültürlenmiş epitel hücrelerinde, pks pozitif *E. coli* ile enfeksiyonu sonucu, hücre döngüsü etkilenir, gen ifadesi değişir, kromozomal sapmalara neden olur ve mutasyon sıklığı artar (Alhinai, 2019).

1.4.2.1. HCT116 Kolon Kanseri Hücre Hattı

Kanser biyolojisini incelemek için yaygın olarak kullanılan insan kolon kanseri hücre dizisidir. İn vitro çalışmalarda oldukça tümörejenik, istilacı ve hareketli olduğu, büyüme faktöründen bağımsız geliştiği bildirilmektedir (Rajput vd., 2008). Kolon kanseri olan yetişkin bir erkeğin kolonundan izole edilen bu hücre hattı, Ras proto-onkogeninin 13. kodonunda bir mutasyon göstermektedir. (<https://www.atcc.org/products/ccl-247#required-products> (Erişim Tarihi: 12.01.2024)).

1.4.3. Apoptoz

Apoptoz Yunanca “yaprak dökümü” anlamına gelen, ilk defa 1972’de Kerr tarafından özel bir morfoloji gösteren hücre ölümleri için kullanılmış bir kelimedir. Çok hücreli organizmalarda, hasarlı veya yararsız hücreleri düzenli ve inflamasyon olmaksızın ortadan kaldıran, bir dizi sinyal iletim kademesi ile düzenlenen, sıkı bir şekilde organize edilmiş doğal bir süreçtir. Erişkin hücrelerde apoptozis, homeostaziyi sağlamaktadır. Apototik yolda görevli genlerin işlev kaybı ya da kazanımı, hücresel homeostaziyi bozarak çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Yetersiz hücre ölümü kanser ve otoimmün hastalıklara neden olurken, hızlandırılmış apoptozis ise akut ve dejeneratif pek çok hastalığa yol açabilmektedir (O'Brien ve Kirby, 2008; Karataş, 2012; Bozgeyik, 2020).

1.4.3.1. Apoptozda Morfolojik Değişiklikler

Hem çekirdek hem de sitoplazmanın dâhil olduğu apoptotik süreçte hücrelerde görülen morfolojik özellikler, hücre türleri arasında benzerlik göstermektedir. Hücre ölümünün başlamasından parçalanmasına kadar geçen süre, hücre tipine, uyaran çeşidine ve kullanılan apoptotik yola bağlı olarak genellikle birkaç saattir. Apoptozis için sinyal alınmasının ardından hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlar. Hücrenin tutunduğu yüzeyle arasındaki adezyon ortadan kalkar, komşu hücrelerle olan teması da kesilir. Hücre iskeleti dağılır, kromatin yoğunlaşır, nükleus zarı dalgalı bir görünüm alır, zar

porları kaybolur. Membranda tomurcuklanma başlar ve membran bütünlüğü bozulur. Apoptotik hücrenin dış yüzeyinde salgılanan sinyaller sayesinde fagositik hücreler tarafından apoptotik hücre ortadan kaldırılır (O'Brien ve Kirby, 2008; Karataş, 2012; Bozgeyik, 2020).

1.4.3.2. Apoptozda Biyokimyasal Değişiklikler

Biyokimyasal değişiklikler 3 ana başlık altında incelenebilir:

- (i) Kaspazların aktivasyonu
- (ii) DNA ve protein parçalanması
- (iii) Membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınma

Apoptoz başlangıcında, normalde hücre membranının sitozolik tarafında bulunan fosfolipidlerin (PS) hücre dış katmana geçer. Bu translokasyon sayesinde makrofajlar, ölü hücreleri pro-inflamatuar bileşenler salgılanmadan, erkenden tanıyarak fagosite eder. Bunu, DNA'nın karakteristik olarak endonükleazlar ile parçalara ayrılması takip eder. Apoptozisin erken evrelerinde kaspaz proteinleri salınmaya başlar ve aktifleşen kaspazlar, hücresel birçok substratı parçalara ayırır, nükleer çatıyı ve hücre iskeletini parçalar (Bozgeyik, 2020).

1.4.4. Kaspazlar (Hücrel Giyotinler)

Apoptozun merkezi yürütücüleri kaspazlar büyük bir proteaz enzim ailesidir. Aktif bölgelerinde sistein aminoasidi bulunur. Hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için bu isim verilmiştir (C-Asp-ase; C:sistein amino asit simgesi; Asp: aspartik asit; -ase:kesici enzim eki). Bu güne kadar memeliler için 14 kaspaz tanımlanmıştır. Apoptoz sırasında ilk görev alan kaspazlar başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9 ve 10)'dır. Sonraki aşamalarda görev alanlar ise efektör kaspazlar (Kaspaz 3, 6 ve 7) olarak adlandırılır. Kaspazlar inaktif zimojenler olarak sentezlenir ve bu halleriyle prokaspaz olarak adlandırılırlar (O'Brien ve Kirby, 2008; Karataş, 2012).

Kaspaz zincirinde yer alan enzimlerin aktivitesi sıkı bir şekilde kontrolde tutulur. Çünkü bir kez aktive olduktan sonra bir daha geri dönüşü mümkün değildir ve hücreyi mutlak ölüme sürüklerler. Kaspaz aktivasyonunda 3 temel yol vardır:

- (i) Başlatıcı bir kaspaz tarafından proteolitik kesim ile aktivasyon
- (ii) Yakın indükleme

(iii) Holoenzim oluşumu

Başlatıcı bir kaspaz tarafından efektör kaspazın proteolitik olarak kesilmesi sonucu aktivasyon oldukça etkin bir mekanizmadır. İkinci mekanizmada ise birçok prokaspaz 8 molekülü birbirine yakınlaşarak kümeler oluşturur ve çapraz biçimde birbirlerini keserek aktive ederler. Holoenzim oluşumunda sitokrom c ve Apaf-1 (Adaptör proteaz aktivasyon faktörü-1) oligomerizasyonu prokaspaz 9'un bu komplekse katılmasına imkân vererek apoptozu oluşturur. Kaspaz 9'un bu yolla aktivasyonu proteolitik değil, kompleksin biçim değiştirmesi ile sağlanmış olur (Karataş, 2012).

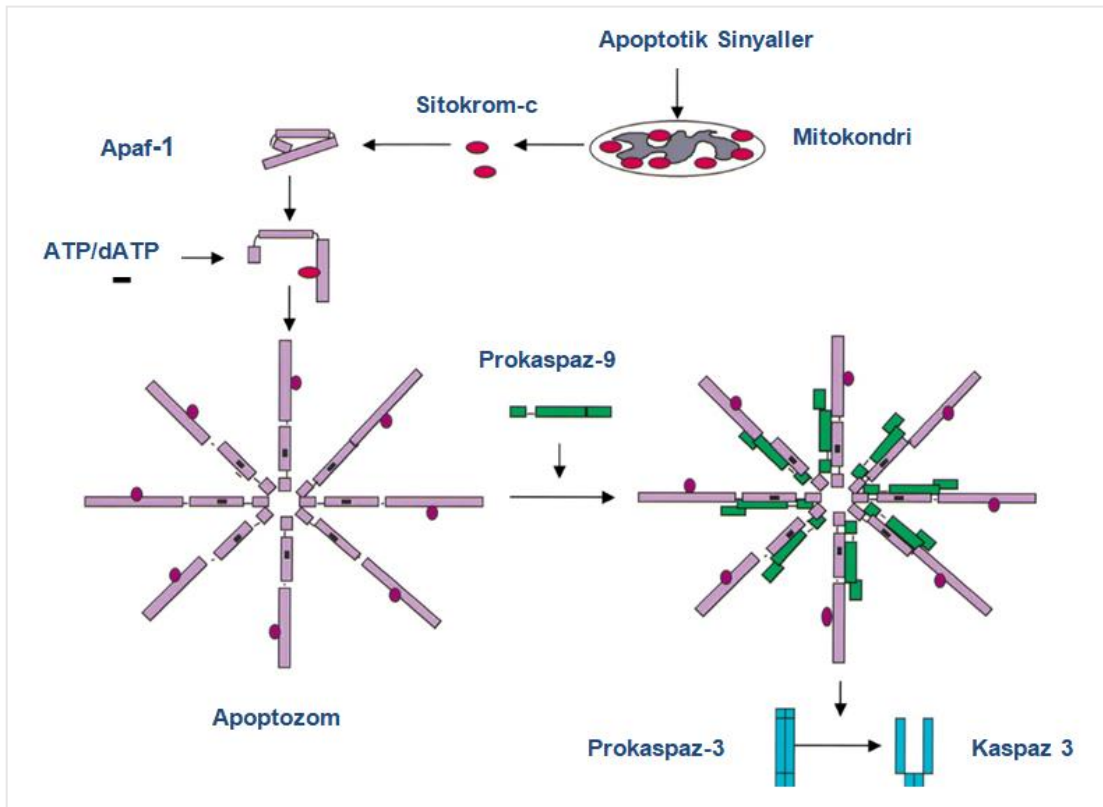
1.4.5. Apoptoz Mekanizmaları

Kaspazlar apoptoz mekanizmasının merkezinde hem başlatıcı hem de efektör olarak görev alırlar. Apoptozun çok bilinen içsel (intrinsek/mitokondriyal) ve dışsal (ekstrinsek/ölüm reseptörü) olmak üzere iki başlatma yolu vardır. Her iki yol da ortak bir yürütme aşamasında birleşir. Az bilinen üçüncü yol ise intrinsek endoplazmik retikulum yoluğandır (Bozgeyik, 2020).

1.4.5.1. Ekstrinsek (Dışsal) Yol

Dışsal ölüm reseptörü yoluğı, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin kendilerine özgü ölüm ligandlarına bağlanarak aktive edilmesi ile başlar. Tümör Nekroz Faktörü (TNF) reseptör süper ailesine bağlı çok sayıda tanımlanmış ölüm reseptörü vardır. En iyi bilinen iki üyesi Fas reseptörü ve Tip 1 TNF reseptörü (TNFR1)'dür. Pro-apoptotik bu reseptörleri aktive eden ligandlar sırasıyla Fas ligandı (FasL) ve TNF- α sinyal iletim yollarıdır. FasL, aktive edilmiş B hücreleri ile T hücreleri dâhil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanır. TNF- α ise ağırlıklı olarak aktive edilmiş monosit, makrofaj ve lenfositler tarafından eksprese edilir. Ölüm reseptörlerinin iç kısımları ölüm alanı (Death Domain (DD)) olarak bilinir. TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini TRADD ve Fas ile ilişkili ölüm domaini ise FADD olarak adlandırılır. Üç ya da daha fazla ölüm reseptörü ve ligand kompleksi bir araya toplandığında bunların DD'leri birbirine yakınlaşır ve adaptör protein için bağlanma bölgesi oluşur. Bu ligand-reseptör-adaptör protein kompleksine ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (Death Inducing Signaling Complex (DISC)) adı verilmektedir. Prokaspaz 8'in aktivasyonunun başlamasına neden olan bu DISC yapısıdır. Enzimin aktif olan hali kaspaz 8 bir apoptoz başlatıcısıdır ve diğer efektör kaspazları 3, 6 ve 7'yi aktive eder (Şekil 1.4) (O'Brien ve Kirby, 2008; Bozgeyik, 2020).

ölüme sürüklerler. Apoptozun başlayıp başlamayacağını belirleyen, mitokondri yüzeyinde karşılaşan pro-apoptotik ve anti-apoptotik aile üyelerinin denge durumudur. Eğer pro-apoptotik proteinler baskın gelirse, mitokondriden bir dizi molekül salınır. Bunlardan en önemlisi de sitokrom-c'dir. Sitozole salınan Sit-c, dinlenme halinde inaktif monomer olan adaptör protein Apaf-1'e bağlanarak, molekülde konformasyonel bir değişime neden olur. Bu değişim ATP/dATP'nin Apaf-1'e bağlanmasını mümkün kılar. Sit-c, Apaf-1 ve ATP/dATP kompleksi apoptozom denilen heptamer bir yapı oluşturur. Bu yapı, komplekse toplamda yedi molekül prokaspaz 9'un katılmasına olanak tanır. Prokaspaz 9 moleküllerinin apoptozoma bağlanması, kaspaz 3 gibi efektör kaspazları aktive eden kaspaz 9 holoenzimini oluşturur (Karataş, 2012; Bozgeyik, 2020). Sonuç olarak içsel apoptoz yolunda sorumlu başlatıcı kaspaz, Apaf-1'e bağlandığında indüklenen dimerizasyonla aktive edilen kaspaz 9'dur (Şekil 1.5) (McIlwain vd., 2013).



Şekil 1.5. Sitokrom c'nin neden olduğu İntresik (Mitokondriyal-İçsel) Yolak (Wang, 2001).

1.4.5.3. Ortak Yol

Apoptozun son yürütme aşamasında kaspaz 3,6 ve 7 gibi efektör kaspazlar görev alır.

Başlatıcı kaspazların enzimatik aktivasyonu, efektör kaspazların proteolitik aktivasyonuna ve bir dizi hayati proteinin bölünmesine yol açarak hücreyi programlı bir şekilde ölüme götürür. Tüm efektör kaspazlar içinde en önemlisi kaspaz 3'tür ve başlatıcı kaspazlardan herhangi biriyle aktive olabilir. İçsel ve dışsal her iki yol da kaspaz 3'te birleşir. Kaspaz 3'le aktive olan deoksiribonükleazlar nükleer apoptoza yol açar. Efektör kaspazlar, protein kinazların, hücre iskeleti proteinlerinin, DNA onarım proteinlerinin ve endonükleazların bölünmesini indükler. Bunun sonucunda, sitoplazmik kabarcıkların ve apoptotik cisimciklerin oluşması, DNA yoğunlaşması ve parçalanması gibi apoptozun morfolojik belirtileri ortaya çıkar (Ghobrial vd., 2005; Jan, 2019).



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. ARI ÜRÜNLERİNİN TEMİNİ VE HAZIRLANMASI

Kullanacağımız arı ürünleri DAGEM (Düzce Üniversitesi Arıcılık Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi)'den Şubat 2022'de temin edildi. Her bir arı ürünü literatüre dayalı olarak uygun ekstraksiyon yöntemleriyle deneylerin hemen öncesinde taze olarak stok solüsyonları hazırlanmıştır.

2.1.1. Arı Sütü Ekstraksiyonu

5 gr arı sütü, 10 mL soğuk fosfat tamponlu salinde (PBS) çözündürüldü (1:2 (v/v)). 48 saat süspanse olması için bırakıldı. Süspansiyon 12.000 rpm'de 45 dk santrifüjlendi. Ardından süpernatant alındı ve çalışmaların öncesine kadar +4 °C'de saklandı (Amly vd., 2021).

2.1.2. Arı Zehri Ekstraksiyonu

Kuru haldeki arı zehri, distile suda çözülür ve çözünmeyen materyalleri çıkarmak için 12.000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlendi. Ortaya çıkan çözelti, farklı konsantrasyonlarda arı zehri çözeltilerinin hazırlanması için stok solüsyon olarak +4 °C'de saklandı (Behroozi vd., 2014; Mostafa vd., 2022).



Şekil 2.1. Arı zehrinin toplandığı cam plaka.



Şekil 2.2. Cam plakadan arı zehrinin kazınması.

2.1.3. Perga Ekstraksiyonu

Benzer yapı ve içerikleri nedeniyle polen ve perga ekstratlarının hazırlanması için Campos ve ark.'nın metodu birkaç modifikasyonla uygulandı.

1:5 oranında (w/v) 5 gr perga 25 mL metanol içerisinde 48 saat maserasyona bırakıldı (Şekil 2.3). 7 saat boyunca 150 rpm'de manyetik karıştırıcıda tutuldu. Çözelti Whatman No.4 kâğıdı ile süzüldü. Hazırlanan metanol ekstreye önce 50 °C'de 30 dk, daha sonra 65 °C'de 5 dk rotary evaporatörde muamele edilerek metanol uzaklaştırıldı (Şekil 2.5). Örnek dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü ve stok çözelti koyu renkli şişede +4 °C'de saklandı (Campos vd., 2021).



Şekil 2.3. Perga maserasyonu.

2.1.4. Polen Ekstraksiyonu

1:3 oranında (w/v) 5 gr polen 15 mL metanol içerisinde 48 saat maserasyona bırakıldı (Şekil 2.4). 6 saat süresince 150 rpm’de manyetik karıştırıcıda tutuldu. Çözelti Whatman No.4 kâğıdı ile filtrelendi. Hazırlanan metanol ekstre önce 50 °C’de 30 dk, daha sonra 65 °C ’de 5 dk rotary evaporatörde muamele edilerek metanol uzaklaştırıldı (Şekil 2.5). Örnek dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü ve stok çözelti koyu renkli şişede +4 °C’de saklandı (Campos vd., 2021).



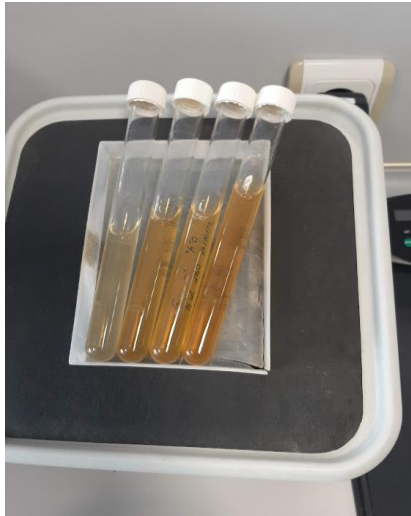
Şekil 2.4. Polen maserasyonu.



Şekil 2.5. Perga ve polenden rotary evaporatorde metanolün uzaklaştırılması.

2.1.5. Bal Ekstraksiyonu

Bal çalışmaları öncesinde distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır (Şekil 2.6) (Al-kafaween vd., 2020).



Şekil 2.6. Bal solüsyonlarının hazırlanması.

2.1.6. Propolis Ekstraksiyonu

Toz halindeki propolis örneklerinden 50 gr ağırlığında alındı ve üzerine 500 mL etanol eklendi. Karışım, ışık almayan bir ortamda, manyetik karıştırıcı üzerinde 72 saat süreyle 150 rpm’de çalkalandı. Karışım filtre kâğıdından süzülerek balmumu uzaklaştırıldı.

Geri kalan süzöntü rotary evaporatörde 50-60 °C’de 5-10 dk bekletilerek etanol uzaklaştırıldı. Kalan reçinemi kısım tartılarak miktar belirlendi ve propolis içeriği %10 olacak şekilde (0,1 g/mL) %70’lik etil alkolde çözülüp stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan %10’luk propolis ekstratı çalışmalar öncesinde 1:2 (v/v) oranında DMSO ile seyreltilerek stok solüsyon hazırlandı (Sevim vd., 2021).



Şekil 2.7. Arı ürünlerinin seyreltilmesi.

2.2. ANTİBİYOFİLM AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

2.2.1. Bakteri İzolatlarının Temini

Bu çalışmada, daha önceki çalışmalar için klinik izolatlardan izole edilmiş, %15’lik gliserol ve Nutrient Broth (NB) karışımı içerisinde -80 °C’de stoklanan 11 farklı *E. coli* izolatı, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden temin edilmiştir. Tez çalışması süresince kullanılan mikroorganizmalar +4 °C’de yatık olarak hazırlanan Nutrient Agar (NA) içerisinde saklandı. Mikroorganizmalar analizlerin öncesinde uygun besiyeri ortamında canlandırıldı, saflık kontrolü yapıldı ve daha sonra testlerde kullanıldı (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Bakteri izolatları.

2.2.2. Bakteri İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi

E. coli izolatları, mikropilaka biyofilm tahlili kullanılarak biyofilm oluşturma açısından incelendi. Bunun için öncelikle her bir izolat aerobik koşullarda Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerine inoküle edildi ve 24 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

%0,5, %1, %3 ve %5 olmak üzere 4 farklı glikoz konsantrasyonlarında hazırlanan MHB ve Brain-Heart Infusion Broth (BHIB) besiyerlerinden 96 oyuklu mikropilakalara 100 µL eklendi. Üzerine taze kültürden 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu 100 µL kadar ilave edildi. Kontrol grubu olarak sadece glikoz ile desteklenen MHB ve BHIB besiyerleri kullanıldı. Mikropilakalar aerobik koşullar altında 37 °C’de 48 saat süreyle inkübe edildi.

ELISA yıkama cihazı (Robonik, India) ile kuyucuklar üç kez 200 µL PBS ile yıkandı. Kurutulan plakalara biyofilmin fiksasyonu için 200 µL %99 metanol ile 5 dk muamele edildi. Kuyucuklar ters çevrilerek içerisindeki reaktif boşaltıldı ve kurutuldu. 15 dk boyunca oda sıcaklığında 200 µL %0,3 kristal viyole boyası ile boyandı. Otomatik ELISA yıkama cihazı ile üç kez distile su ile yıkandı. Son aşamada kuruyan kuyucuklara 200 µL %96 etanol eklenerek 560 nm’de ELISA okuyucuda (Robonik, India) Optik Dansite (OD) ölçüldü (Sharifi vd., 2022).

Tüm suşlar ve negatif kontrol için ortalama OD değeri hesaplandı. Veriler Stepanović yöntemine göre değerlendirildi. Bu yöntemle göre öncelikle Cut-off (OD_C) değeri hesaplanır, sonrasında da mevcut OD değerleri kıyaslama ile biyofilm oluşturma kapasiteleri belirlenir. Cut-off değeri, negatif kontrolün ortalama OD değerinin üzerinde üç standart sapma olarak tanımlandı. Elde edilen sonuçlara göre OD değeri OD_C’den küçük olan suşlar biyofilm negatif olarak kabul edildi. OD değeri OD_C değerinin 2

katından az olanlar zayıf, 2-4 katı arasında olanlar orta, 4 katından fazla olanlar güçlü biyofilm oluşturunucular olarak sınıflandırıldı (Stepanović vd., 2000; Kayode ve Okoh, 2022).

2.2.3. Arı Ürünlerinin Biyofilm İnhibisyon Aktivitesinin Ölçülmesi

Arı ürünlerinin biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli, bir önceki adımda anlatıldığı şekilde yine mikrolaka biyofilm testi kullanılarak değerlendirildi.



Şekil 2.9. Antibiyofilm Çalışmaları.

Öncelikle güçlüye yakın orta seviyede biyofilm oluşturan *E. coli* 5 izolatu steril cam tüplerde 5 mL MHB besiyerinde 37 °C’de 24 saat inkübe edildi.

Düz tabanlı 96 kuyucuklu bir mikrolaka üzerinde, çalışılacak kuyucuklara 100 µL steril %1 glikozla desteklenmiş MHB ortamı eklendi. Daha sonra, besiortamıyla seyreltilmiş arı ürünlerinin stok çözeltilerinin dört farklı konsantrasyonundan (%6,25, %12,50, %25 ve %50) 50 µL eklendi. Son olarak 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış 50 µL taze *E. coli* kültürü eklendi ve 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol 100 µL *E. coli* ve 100 µL besiortamı içermiştir. Negatif kontrolde sadece 200 µL besiortamı kullanıldı. Mikrolaka kuyucuklarının sınırlı olması nedeniyle deney iki tekrarlı olarak yürütüldü.

İnkübasyonun ardından kuyucuklar otomatik ELISA yıkama cihazı kullanılarak 200 µL PBS ile üç kez yıkandı ve 65 °C’de 20 dk kurutuldu. Daha sonra biyofilmler 200 µL %99 metanol ile 5 dk süreyle sabitlendi. Kuyucuklar ters çevrildi, içerikleri boşaltıldı ve

yeniden kurutulan kuyucuklar, 15 dk süreyle 200 µL %0,3 kristal viyole boyası ile işleme tabi tutuldu. Mikroplakalar otomatik ELISA yıkama cihazı kullanılarak distile su ile üç kez yıkandı ve kurutuldu. Son olarak, her bir oyuğa 200 µL %95 etanol ilave edildi ve OD, mikroplaka okuyucu üzerinde 560 nm’de kaydedildi.

Yüzde inhibisyon değerleri Denklem (2.1)’e göre belirlendi.

$$\% Inhibition = \frac{OD_{pozitif kontrol} - OD_{örnek}}{OD_{pozitif kontrol}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.3. ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

2.3.1. Hücre Kültürü

2.3.1.1. Besiyeri Hazırlama

İnaktif edilmiş %10 fetal sığır serumu (FBS), 200 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin, 100 mg/mL streptomisin ile desteklenen RPMI 1640 besiyeri steril cam şişe içerisinde hazırlandı.

2.3.1.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

Bütün deneysel çalışmalar laminar-hava akışlı kabin içerisinde gerekli tüm sterilizasyon şartlarına uygun olarak yapılmıştır. Daha önceden -80 °C’de dondurulmuş olan HCT116 hücre hattı hızlı bir şekilde çözündürülüp, üzerine taze besiyeri eklenerek 7 dk 1700 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp, çöken hücre pelleti üzerine ise 1-2 mL besiyeri eklenmiştir. Hücreler pipetaj yapılarak süspanse edildikten sonra uygun flasklara ekildi. 37 °C’de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılarak 48 saat sonra hücrelerin tutunup tutunmadığı invert mikroskop altında kontrol edilmiştir.

2.3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler %70-80 civarı yoğunluğa ulaştığında yüzen hücreler santrifüj tüplerine aktarıldı. PBS ile flask içerisinde bulunan ölü hücreleri ve ortamda oluşan kirliliği gidermek amacıyla yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi sonrası PBS uzaklaştırılmıştır. Flaskta yapışan hücrelerin üzerlerine tripsin-EDTA solüsyonundan ekleyerek ardından 37 °C’de inkübatörde 5 dk bekletilip hücrelerin kendilerini bırakmaları beklenmiştir. Mikroskopta hücrelerin ayrıldığı gözlemlendiği anda

üzerlerine bir miktar besiyeri eklenip, tripsin etkisiz hale getirilmiştir. Flasktaki kalkan hücrelerin bulunduğu tripsinli besiyeri 15 mL’lik falkon tüpüne aktararak 1700 rpm’ de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet 1 mL kadar besiyeri ile çözündürülerek, hücre sayımı yapılmıştır. 96 kuyulu mikrolatelere her bir kuyucuğa 5000 hücre denk gelecek şekilde hesaplanarak 100 µL besiyeri ile ekim yapılmıştır. Hücreler 24 saat %5 CO₂’li inkübatörde, 37 °C’de inkübasyona konulmuştur.

2.3.1.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

İnkübasyon sürelerinin ardından, arı ürünlerinin hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek için WST-1 yöntemi kullanılmıştır. WST-1 yöntemi, sitotoksisteyi ölçmeye yarayan, tetrazolyum tuzlarının kullanımına dayanan kolorimetrik hızlı bir yöntemdir. Tetrazolyum tuzları yalnızca aktif mitokondri tarafından halkaları kırılarak formazana dönüşebilen organik tuzlardır. Sadece canlı hücrelerde gerçekleşen mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi, canlı hücrelerin sayısına bağlı olarak formazan boyasının miktarını artıracak ve renk değişimi meydana gelecektir.

İnkübasyon sonrası hücreler %70 yoğunluğa ulaştığında besiyerleri çekildi. Arı ürünlerinin stok solüsyonlarından besiyeri ile seyreltilerek 4 farklı konsantrasyonda (%6,25; %12,5; %25; %50) numune kuyucuklara eklendi. 24 saat ve 48 saat olmak üzere hücreler inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürelerin sonunda mikrolakadaki her kuyucuktan besiyerleri dikkatlice uzaklaştırılarak üzerlerine 100 µL taze besiyeri, 10 µL de WST-1 reaktifi eklendi. Hücrelerin yaklaşık 4 saatlik bir inkübasyon sonrasında 540 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucusunda (Epoch Microplate Spectrophotometer, Agilent Technologies, Inc., ABD) absorbansı ölçülmüştür. Hücre canlılığı yüzdesi, Excel programı yardımıyla, numunelerin absorbans ortalamalarının, kontrol grubu absorbans ortalamalarına bölünmesi ve çıkan sonucun 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır.



Şekil 2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları.

2.4. APOPTOTİK YOLAK ANALİZİ

2.4.1. Protein İzolasyonu

HCT116 kolon kanseri hücrelerinden protein izolasyonu için, hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekildi. %70-80 civarında yoğunluğa ulaşan hücrelerin üzerine arı ürünlerinin stok solüsyonlarından %25 ve %50 konsantrasyonda olacak şekilde ilave edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin dolmasının ardından hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı. Soğuk PBS ile yıkanan hücrelere 1 mM PMSF içeren RIPA (A.B.T, Türkiye) tamponundan 500 μ L konuldu. RIPA tamponu, içerisindeki proteaz inhibitörü sayesinde proteaz aktivitesini durdurarak protein yıkımını engeller ve etkili hücre lizisi ve protein çözünürlüğü sağlar. Hücreler 5 dk buz üzerinde inkübasyonun ardından scraper ile kazınarak kaldırıldı ve ependorflara alındı. Hücreler buz içerisinde RIPA tamponunun etki etmesi için 30 dk daha dinlendirildi. Bu esnada 4-5 kez homojenizasyonu sağlanması için vorteksle 5-10 saniye muamele edildi. Daha sonra ependorf içerisindeki hücreler, 13500 rpm'de +4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Protein izolatının olduğu süpernatant tortu olmaksızın yeni steril tüplere alındı. Proteinler tek kullanımlık olacak şekilde alikotlandıktan sonra -80 °C'ye kaldırıldı.

2.4.2. Protein Miktar Tayini

HCT116 hücrelerinden izole edilen proteinlerin miktarları BCA protein ölçüm kiti (ABP Biosciences, LLC) ile belirlendi. BCA protein tahlili, bir numunedeki toplam protein miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntemde, proteinler alkali bir çözeltide Cu^{+2} katyonunu Cu^{+1} katyonuna indirger ve bisinkoninik asit muamelesi ile mor renk oluşur.

Kit içerisinde bulunan bovine serum albumin (BSA) ile saf su kullanılarak 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,025 ve 0 $\mu\text{g/mL}$ konsantasyonlarda standartlar hazırlandı. Her standart ve protein numunesinden 96 kuyucuklu plakanın her birine 25'er μL eklendi. BCA çalışma reaktifini hazırlamak üzere kit içinden çıkan Reaktif A ve B oranı 50:1 (Reaktif A:B) olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan reaktif karışımından her bir kuyucuğa 200'er μL eklendi. 37 °C'lik inkübatörde 30 dk inkübe edildi. Ölçümden önce 10 dk boyunca oda sıcaklığında tutuldu. Mikroplaka okuyucuda 450 nm'de absorbansı okutuldu ve çıkan sonuçların Excel programında standart eğri çizilerek hesaplamaları yapıldı (He, 2011).

2.4.3. Apoptozis Belirteçlerinin İncelenmesi

2.4.3.1. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Apoptozisin bir göstergesi olarak kaspaz-3 enzim aktivitesi HCT116 kolon kanseri hücrelerinde kantitatif olarak Colorimetric Human Caspase 3 ELISA Kit (BT LAB, Şanghay, Çin) yöntemi ile kantatif olarak değerlendirildi. Öncelikle kit içeriğinde açıklandığı şekilde standartlar hazırlandı. Her standarttan kuyucuklara 50 μL konuldu. Üzerlerine 50 μL streptavidin- HRP eklendi. Örnek kuyucuklarına 40 μL örnek, 10 μL kaspaz 3 antikoru ve 50 μL streptavidin-HRP koyuldu. Plaka yavaşça çalkalandı ve üzeri kapatılarak 37 °C'de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi için 250 mL yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 5 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra kurutulan her bir kuyucuğa 50 μL substrat solüsyonu A ve 50 μL substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37 °C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 μL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. 10 dk içerisinde mikropilaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbansı ölçüldü.

2.4.3.2. Kaspaz-8 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Apoptozisin bir göstergesi olarak kaspaz-8 enzim aktivitesi HCT116 kolon kanseri hücrelerinde kantitatif olarak Colorimetric Human Caspase 8 ELISA Kit (BT LAB, Şanghay, Çin) yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirildi. Öncelikle kit içeriğinde açıklandığı şekilde standartlar hazırlandı. Her standarttan kuyucuklara 50 µL konuldu. Üzerlerine 50 µL streptavidin- HRP eklendi. Örnek kuyucuklarına 40 µL örnek, 10 µL kaspaz 8 antikoru ve 50 µL streptavidin-HRP koyuldu. Plaka yavaşça çalkalandı ve üzeri kapatılarak 37 °C’de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi için 250 mL yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 5 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra kurutulan her bir kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A ve 50 µL substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37 °C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. 10 dk içerisinde mikroparka okuyucuda 450 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbansı ölçüldü.

2.4.3.3. Kaspaz-9 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Apoptozisin bir göstergesi olarak kaspaz-9 enzim aktivitesi HCT116 kolon kanseri hücrelerinde kantitatif olarak Colorimetric Human Caspase 9 ELISA Kit (BT LAB, Şanghay, Çin) yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirildi. Öncelikle kit içeriğinde açıklandığı şekilde standartlar hazırlandı. Her standarttan kuyucuklara 50 µL konuldu. Üzerlerine 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Örnek kuyucuklarına 40 µL örnek, 10 µL kaspaz 9 antikoru ve 50 µL streptavidin-HRP koyuldu. Plaka yavaşça çalkalandı ve üzeri kapatılarak 37 °C’de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi için 250 mL yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 5 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra kurutulan her bir kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A ve 50 µL substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37 °C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. 10 dk içerisinde mikroparka okuyucuda 450 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbansı ölçüldü.

2.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Analizler GraphPad Prism (Sürüm 10.0.2(232)) yazılımı kullanılarak hesaplandı. Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuştur.

Antibiyofilm aktivite deneyleri iki tekrarlı olarak yapılmış ve ortalamaları hesaplanmıştır. Ortalamaların yüzde değerleri Denklem (2.1)'e göre verilmiştir. Kontrole kıyasla etki seviyelerinin anlamlılığı, tek yönlü ANOVA ve ardından Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlendi. Çubuk grafikler Excel'de oluşturuldu. (****p <0.0001; ***p <0.001; **p <0.01; *p<0.05; p≥0.05).

Antiproliferatif aktivite sonuçları, üç bağımsız deneyden ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar, tek yönlü ANOVA ve ardından kontrole kıyasla Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak analiz edildi. Çubuk grafikler Excel'de oluşturuldu. (****p <0.0001; ***p <0.001; **p <0.01; * p<0.05).

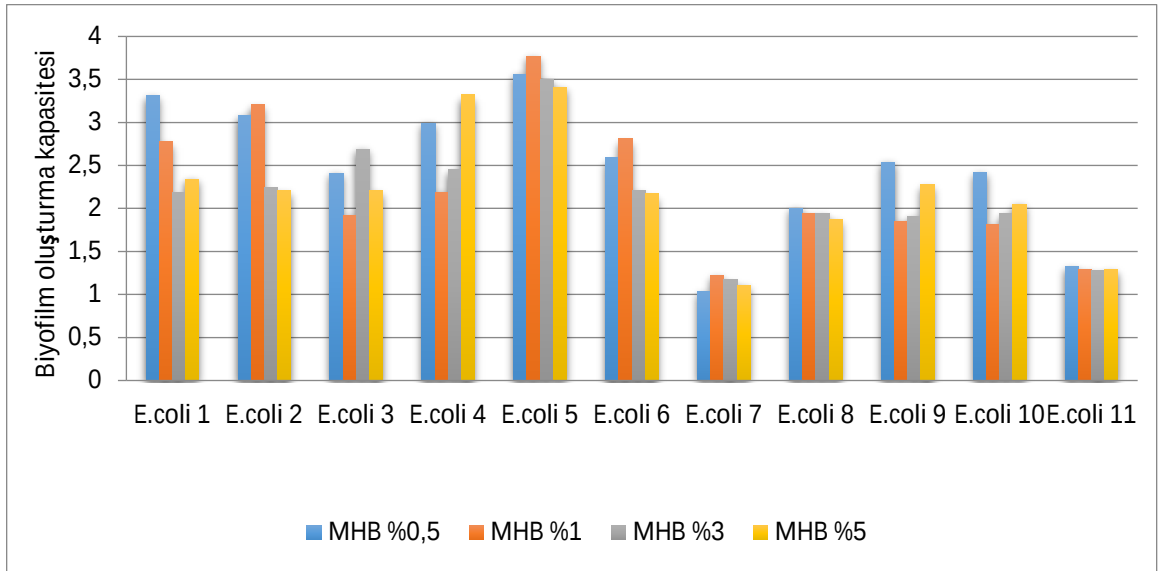
Apoptotik yolak analizi arı ürünlerinin iki farklı konsantrasyonu (%25 / %50) uygulanan HCT116 hücrelerinde üç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalamaları verilmiştir. Sonuçlar, tek yönlü ANOVA ve ardından kontrole kıyasla Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak analiz edildi. Grafikler Graphad Prism programı ile düzenlenmiştir. (****p <0.0001; ***p <0.001; **p <0.01; * p<0.05).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. ANTİBİYOFİLM AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

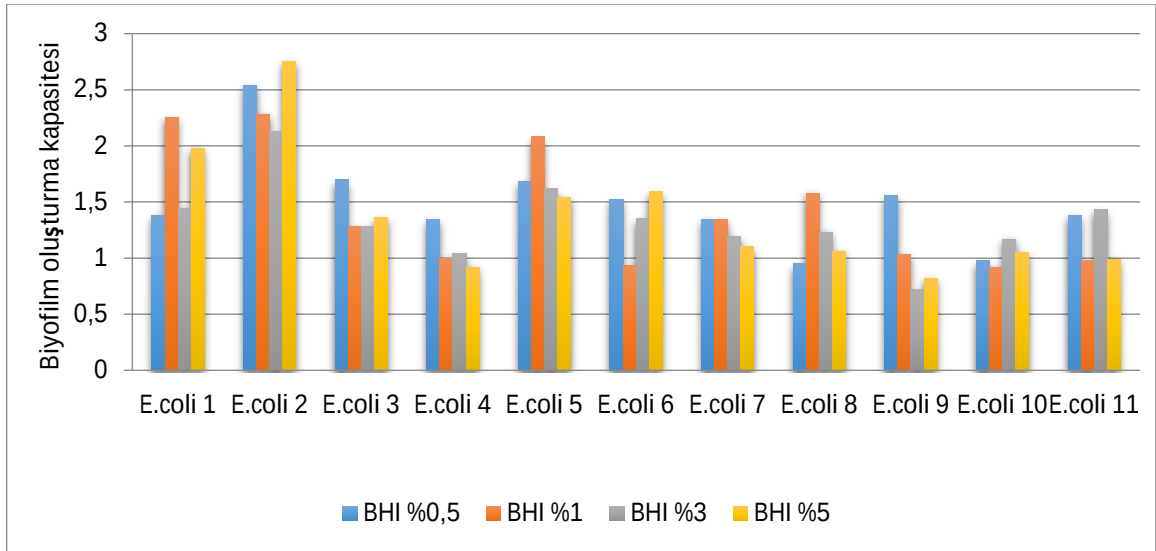
3.1.1. Bakteri Kültürlerinin Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi

11 *E. coli* izolatının dört farklı glikoz konsantrasyonu ile desteklenmiş iki farklı besiyeri (MHB ve BHIB) ortamında uygun optimum koşullara göre biyofilm oluşturma kapasiteleri mikropilaka biyofilm tahlili ile tespit edilmiştir. Farklı glikoz konsantrasyonu ile desteklenen MHB besiyerlerinde her izolatın biyofilm oluşumlarının pozitif olduğu görüldü ($OD / OD_C > 1$) (Şekil 3.1). *E. coli* 1, *E. coli* 2, *E. coli* 4, *E. coli* 5 ve *E. coli* 6 izolatlarının biyofilm OD değerleri OD_C değerinden 2-4 kat daha yüksek çıkmıştır ve bu durum bu izolatların orta seviyede biyofilm oluşturma kapasiteleri olduğunu göstermektedir. %1 glikoz içeren MHB besiyeri içerisinde *E. coli* 5 izolatının güçlüye yakın oranda biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 3.1. *E. coli* izolatlarının farklı glikoz konsantrasyon içerikli MHB besiyerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri. (OD_C değerine oranla OD değerleri hesaplanmıştır. $OD/OD_C < 1$ =Negatif; $1 < OD/OD_C < 2$ =Zayıf; $2 \leq OD/OD_C \leq 4$ =Orta; $4 < OD/OD_C$ =Güçlü).

BHIB besiyerinde biyofilm oluşumlarının birkaç izolatta negatif olduğu gözlenmektedir ($OD / OD_C < 1$) (Şekil 3.2). Bu besiyerinde en yüksek biyofilm oluşumu %5'lik glikoz konsantrasyonunda *E. coli* 2 numaralı izolatta tespit edilmiştir ve biyofilm oluşturma kapasitesi orta düzeydedir. Bunun dışında biyofilm oluşturma kapasiteleri çoğu izolatta zayıf düzeyde seyretmiştir ($1 < OD / OD_C < 2$ = Zayıf).

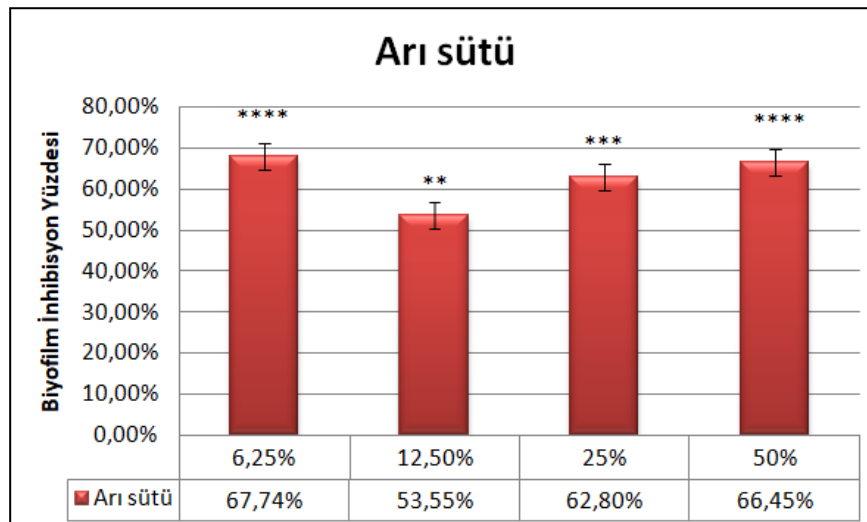


Şekil 3.2 *E. coli* izolatlarının farklı glikoz konsantrasyon içerikli BHIB besiyerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri. (OD_C değerine oranla OD değerleri hesaplanmıştır. OD/OD_C<1=Negatif; 1< OD/OD_C< 2=Zayıf; 2≤OD/OD_C≤4=Orta; 4<OD/OD_C=Güçlü).

3.1.2. Arı Ürünlerinin Biyofilm İnhibisyon Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Arı ürünlerinin biyofilm gelişimi üzerindeki inhibisyon etkisi Şekil 3.1’de görüldüğü üzere, güçlü biyofilm oluşturunca olarak belirlenen *E. coli* 5 numaralı izolat üzerinde araştırılmıştır. Absorbans sonuçlarının Denklem (2.1)’e göre yüzdelik hesaplamaları yapılmıştır.

Arı sütü biyofilm oluşumunu konsantrasyona bağlı olmaksızın %50’nin üzerinde inhibe etmiştir (Şekil 3.3). En düşük konsantrasyonda bile oldukça iyi seviyede inhibisyon etki göstermiştir (%67,74).

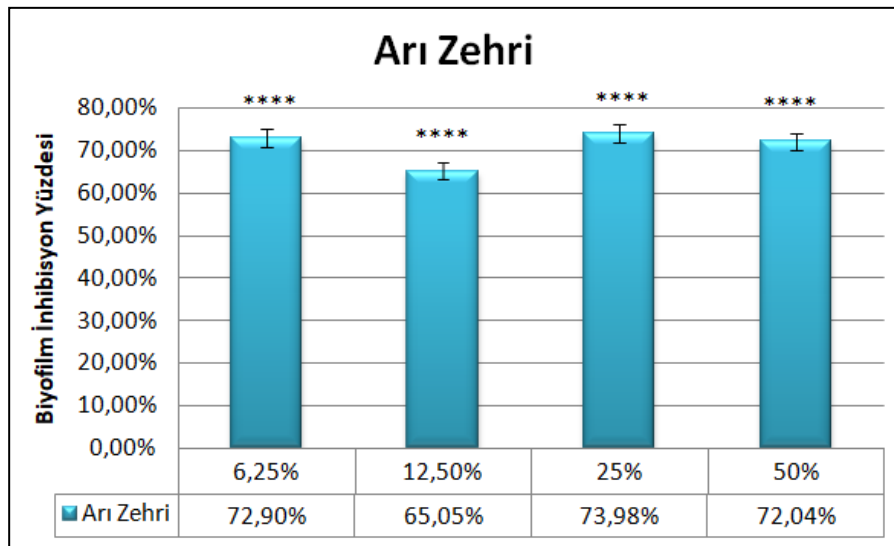


Şekil 3.3. Arı sütünün *E. coli* biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.

Verilerimizde arı sütünün hem düşük, hem de yüksek konsantrasyonda %65 üzerinde *E. coli* biyofilmini inhibe ettiği görülmektedir. Arı sütünün antimikrobiyal aktivitesiyle ilgili pek çok çalışma olmasına rağmen, biyofilm üzerinde çalışmalar yok denecek kadar azdır. Arı sütünün içeriğindeki diğer arı ürünlerinde bulunmayan ve immünomodülatör etki gösteren 10-HDA (10-Hidroksi-2-desenoik asit) bileşeni kalite parametresidir. Pek çok çalışmada farklı bakteri türleri üzerinde antibiyotik etkisi gösterilmiştir ve araştırmacılar bu bileşenin arı sütünün antimikrobiyal kapasitesini belirlediğini söylemektedir (Comara vd., 2017; Aydın ve Tekeoğlu, 2018; Weis vd., 2022). Ayrıca, 10-HDA bileşeninin oral bir patojen olan *Streptococcus mutans* bakterisi üzerinde yapılan bir çalışmada, bakterinin hücre yüzeyine yapışmasını engellediği, bunun yanı sıra doğal ağız mikrobiyotasına zarar vermediği de vurgulanmaktadır (Yousefi vd., 2012).

Arı sütündeki bu bileşen arı ırkı ve iklime göre değişmekle birlikte, genel olarak yaklaşık %1,5- 2 arasında seyrettiği bilinmektedir. Ancak çalışmamızda kullandığımız arı sütüyle aynı merkezden temin edilen arı sütünün içerik analizinin yapıldığı bir çalışmada bu oran %3,52 civarında bulunmuştur (Sönmez vd., 2023). Arı sütünün antibiyofilm kapasitesinin yüksek oranda bulunan 10-HDA bileşenine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Biyofilm çalışmamızda en yüksek inhibitör etkiyi %25 konsantrasyonda %73,98 oranla arı zehri göstermiştir. Arı zehrinin tüm konsantrasyonlarda yüksek inhibisyon yüzdesi ile diğer arı ürünlerine göre daha etkili olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$) (Şekil 3.4).



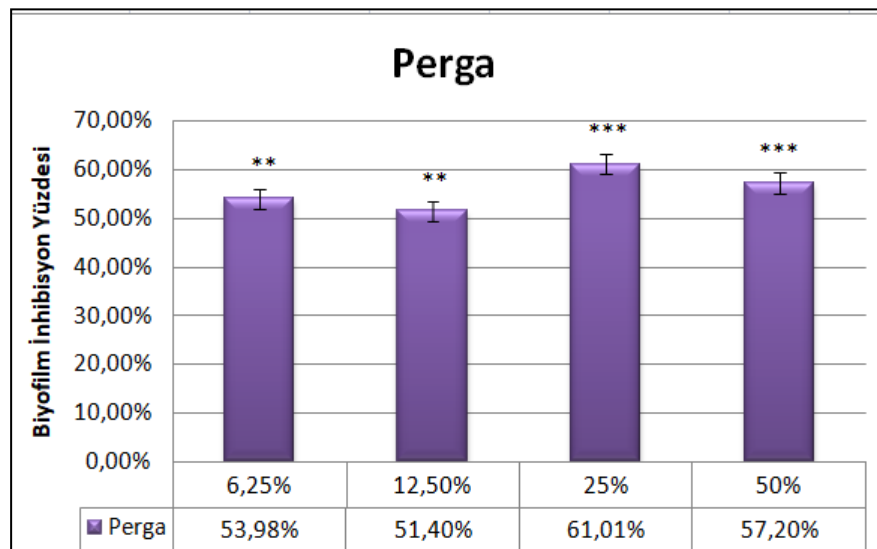
Şekil 3.4. Arı zehrinin *E. coli* biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.

Çalışmamızda, arı zehrinin *E. coli* bakteri biyofilmini %70lerin üzerinde inhibe etmesi, arı zehrinin antibiyofilm ajan olarak etkili olduğunu göstermektedir. Benzer bir bulgu Çelebi ve ark. larının çalışmasında, arı zehrinin *E. coli* K99 bakterisinin biyofilm oluşumunu %50 civarında azalttığı rapor edilmiştir (Çelebi vd., 2023). Farklı bir çalışmada ise arı zehri, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteri biyofilmini neredeyse tamamen bastırmıştır (Mostafa, vd., 2022). Sonuçlarımız literatürle paralellik göstermektedir.

Anadolu arısında yüksek oranda bulunan ve arı zehri bileşenlerinden olan Fosfolipaz A2, düşük mikrobiyal yük ile ilişkilendirilmiş ve arı zehrinin antimikrobiyal karakterine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Tanuğur-Samancı ve Kekeçoğlu, 2021).

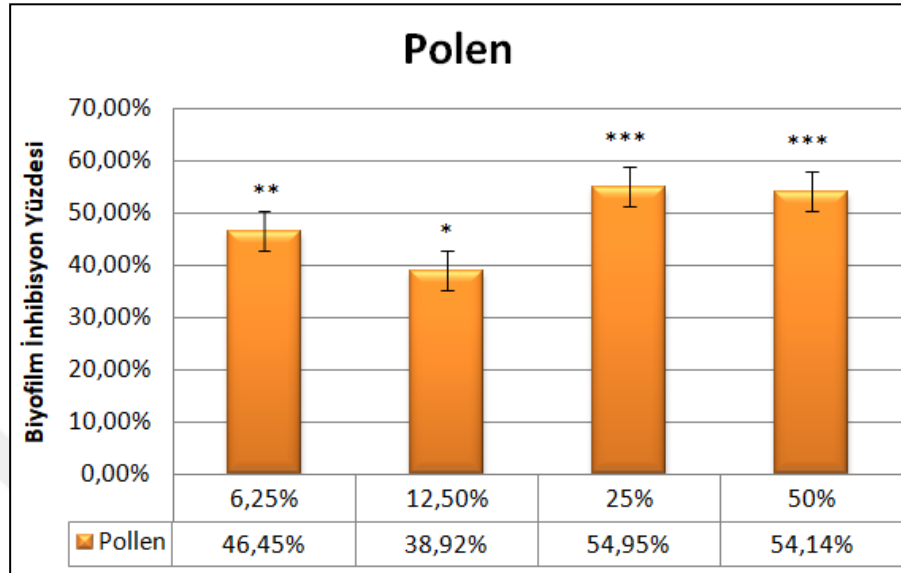
Bunun yanı sıra melittin bileşeninin de tek başına arı zehrinin tamamından daha fazla antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir. Melittin ve fosfolipaz A2 bileşenleri, membran lipitleriyle etkileşime girer, peptid toplanmasına neden olarak gözeneklerin oluşmasına ve nihayetinde hücre membranının parçalanmasına sebebiyet verir. Membran bütünlüğü bakterilerin hayatta kalması için zorunludur (Leandro vd., 2015; Mostafa, vd., 2022).

Biyofilm oluşumu perganın tüm konsantrasyonlarında %50 üzerinde azalmıştır (Şekil 3.5). %25'lik perga konsantrasyonunun biyofilm oluşumunda %61,01'e varan inhibisyon etkisi göze çarpmaktadır (***) $p < 0,001$.



Şekil 3.5. Prganın *E. coli* biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.

Polenin konsantrasyona bağılı olarak antibiyofilm etkisi artış göstermiştir. %25 ve %50'lik konsantrasyonlarda biyofilm inhibisyonu %55'e varmaktadır (Şekil 3.6).

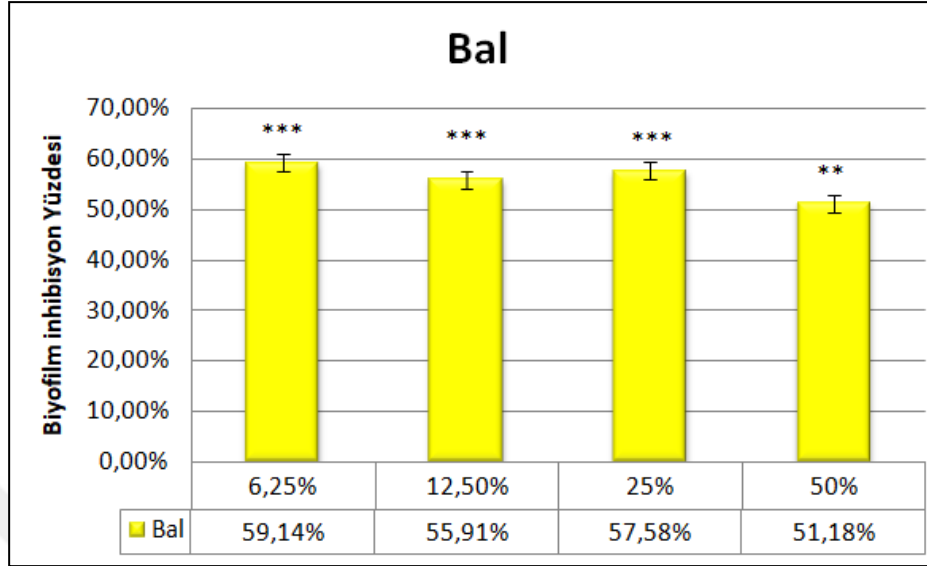


Şekil 3.6. Polenin *E. coli* biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.

Arılar kovanın yağ ve protein ihtiyacını karşılayan arı emeğini (perga) yapmak için çiçeklerden polen toplarlar. Uzun yıllardır kullanılan besleyici fonksiyonel bir besin olan polen, arı fermantasyonu ile pergaya dönüştürülür. Diğer arı ürünleri gibi bu ikisi de bileşenlerinin sinerjistik etkisi ile antimikrobiyal direnç geliştirmeden patojenleri hedefler. Ayrıca polen ve perganın hedeflenen patojenlere karşı antibakteriyel etki gösterirken, konakçı mikrobiyomunu bozmaması önemli bir detaydır (Didaras vd., 2020). Polen ve perga içeriğinde bulunan flavonoid ve fenolik bileşenler gibi pek çok bileşenin antimikrobiyal etkiye yol açtığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra perganın antibiyofilm kapasitesinin polene kıyasla daha yüksek olmasında, perganın probiyotik bakterilerce (örneğin laktik asit bakterileri gibi) daha zengin olmasının rol oynadığı düşünülmektedir. Laktik asit bakterilerinin antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Taheur vd., 2016). Polen ve perga ile yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Antimikrobiyal etkilerini belirlemek adına yapılan çalışmalar bulunmaktadır ancak daha önce antibiyofilm etkisiyle ilgili çalışmalara rastlanmamıştır. Sonuçlarımız her iki ürünün de antibiyofilm kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda bölgemize has arı ekotipinden elde edilen bal, konsantrasyondan

bağımsız olarak her dozda %50 üzerinde antibiyofilm etki göstermiştir. %6,25'lik en düşük konsantrasyonda en yüksek inhibisyon etki (%59,14) gözlenmiştir (Şekil 3.7).

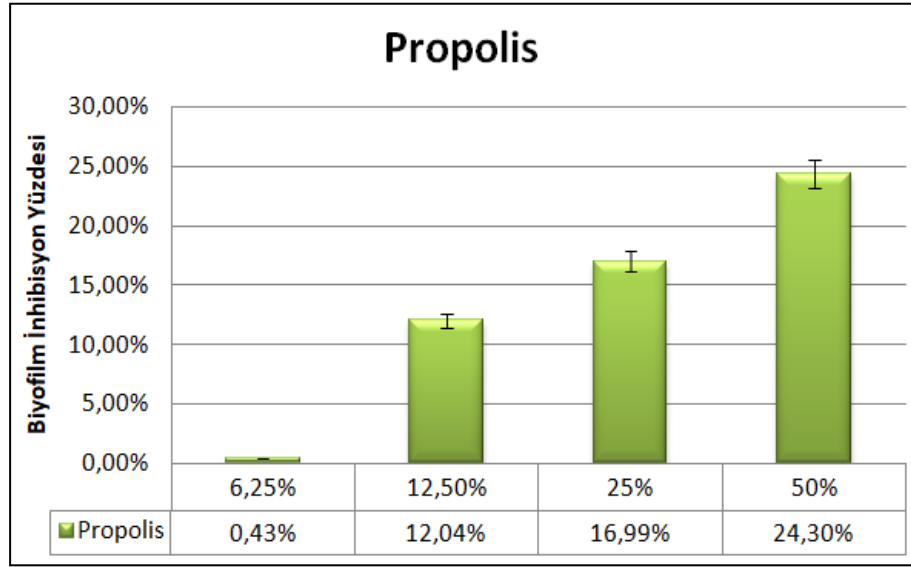


Şekil 3.7. Balın *E. coli* biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.

Balın biyofilm inhibisyon etkisi, daha önce *Pseudomonas auroginosa*, *S. aureus* gibi patojen bakterilerde *in vitro*, *in vivo* ve klinik açılardan detaylı incelenmiştir. Balın yapışmayı önleyici, biyofilm dağıtıcı özellikleri ve içeriğindeki antibiyofilm bileşenler onun antibiyofilm ajan olarak değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır (Deglovic vd., 2022).

Kelulut balı ile yapılan bir çalışmada konsantrasyona bağlı olarak *E. coli* biyofilmi üzerinde %37 oranında inhibisyon etkisi ve virulans gen ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (Al-kafaween vd., 2021). *E. coli* biyofilm oluşumuyla ilgili bir dizi gen üzerinde yapılan bir çalışmada, bal uygulamasının biyofilmi teşvik eden genleri baskıladığı, bunun aksine biyofilmi baskılayan genlerin ise yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (Wasfi vd., 2016). Bulgular balın *E. coli* biyofilmini inhibe edebileceğini desteklemektedir. Ayrıca bal direnç gelişimine izin vermeden, geniş spektrumlu antibakteriyel özelliği ile artık alternatif bir tedavi ajanı olarak kabul görmektedir (Al-kafaween vd., 2021).

Propolis diğer arı ürünleriyle kıyaslandığında oldukça zayıf inhibisyon etki göstermiştir. Biyofilm oluşumunu konsantrasyona bağlı olarak azaltıcı etkisi tespit edilmiştir ancak en yüksek konsantrasyonda dahi anlamlı olmayan bir düşüş söz konusudur (%24,30) ($p>0,05$) (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Propolisin *E. coli* biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisi.

Propolisin *E. coli* biyofilmiyle yapılan çalışmaları oldukça sınırlıdır. 2022’de Tayland propolislerinden 2 farklı örnekle *E. coli* biyofilmine karşı yapılan bir çalışmada propolislerden biri 10 µg/ mL’de %32 oranında inhibisyon gösterirken, diğeri herhangi bir inhibe etki göstermemiştir (Mukaide vd., 2022). Yapılan bu çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Ancak başka bir çalışmada Cezayir propolisinin metanol fraksiyonu için *Staphylococcus aureus* biyofilmi üzerinde %92 seviyelerinde inhibisyon etki bildirilmiştir (Nasirli vd., 2022). Farklı bir çalışmada ise, Brezilya ve Portekiz’den toplanan toplam 10 farklı propolisin, 45 *Staphylococcus* izolatlarının biyofilmleri üzerinde antibiyofilm etkileri belirtilmiştir. Propolislerin her bir izolata karşı etkisi farklı seyretmiştir. *S. aureus* üzerinde bir propolis hiç etki göstermezken bir başkası %88,8 civarında inhibe etmiştir (Laranjo vd., 2018). Bu verilere göre daha önce de söylendiği üzere coğrafi bölge, botanik kaynak ve toplanma zamanı propolisin kimyasal içeriğini etkilemektedir. Yöremiz arısından elde edilen propolis, fenolik bileşenler ve falvanoidler açısından zengindir. Ancak Yığılca’nın farklı lokasyonlarından elde edilen propolis örneklerinde önemli bir biyofilm inhibitörü, bir çeşit flavanoid olan kalkon bileşeni bulunmamaktadır (Kekeçoğlu vd., 2022). Kalkonlar kimyasal yapılarının vermiş olduğu avantaj sayesinde hem antibakteriyel hem de antibiyofilm aktivatörü olarak nitelendirilmektedir (Manner vd., 2013). Yöremiz propolisinde kalkon bileşeninin eksik olması belki de onun biyofilm inhibisyon etkisini düşük kılmaktadır.

Biyofilme ilişkili enfeksiyonlar modern tıbbın en büyük sorunlarından biridir. Karbonhidratça zengin olan arı ürünlerinin, bir nevi karbonhidrat tabakası olan biyofilm

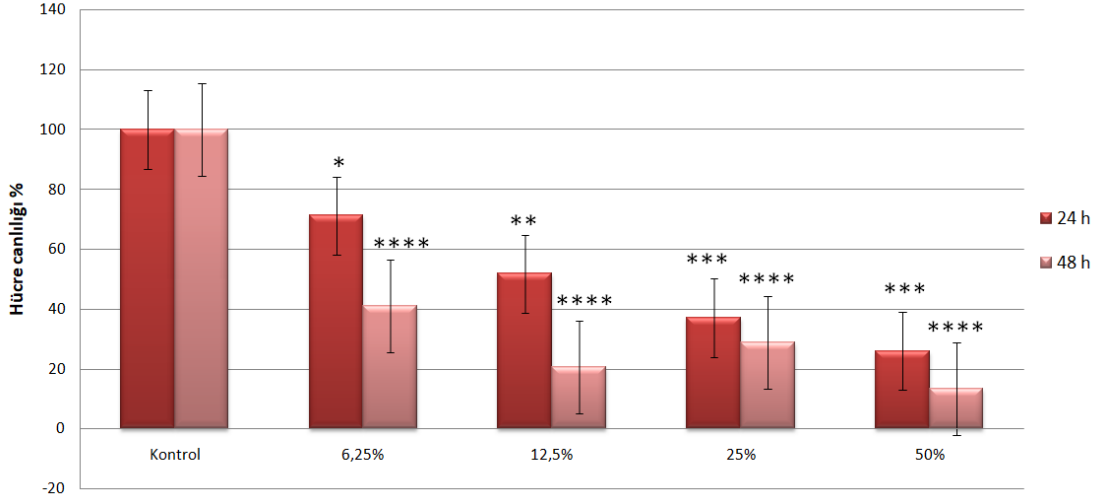
oluşumunu engellemesi, içeriklerinde bulunan yüksek fenolik ve flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Sonuçlarımız bölgemiz arı ürünlerinin biyofilmle ilişkili enfeksiyonlar için umut veren terapötik ajanlar olabileceğini ortaya koymaktadır.

3.2. ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını ve bağışıklıktan kaçmalarını yönlendirebilen bir dizi edinilmiş genetik mutasyondan kaynaklanmaktadır. İnsan vücudunda kolonize olan mikroorganizmaların da içinde olduğu pek çok çevresel faktör, neoplastik hücrelerin metabolizmasını, büyüme düzenini ve fonksiyonunu değiştirebilir ve tümör mikro ortamını şekillendirebilir. Bağırsak mikrobiyomunun disbiyozu, artık bilim camiası tarafından kanserin ayırt edici özelliği olarak kabul edilmektedir (El Tekle ve Garrett, 2023).

Trilyonlarca farklı mikroorganizma, insan kolonunda kolonik epitelyumun yakınında bulunur ve yalnızca koruyucu bir mukus tabakasıyla ayrılır (Tomkovich vd., 2019). Disbiyotik mikrobiyota oluşturduğu biyofilm yapısı sayesinde kolon epitelini geçirgenliğini etkileyerek bariyer fonksiyonunu bozar. Mikrobiyotanın disbiyozisi sonucu oluşan dengesizlik, kolon iltihabı olan IBH hastalarında anahtar rol oynar ve ilerde kolorektal kanser (CRC) riskini iki ila on katı artırır (Bultman, 2017; Mirzaei vd., 2020).

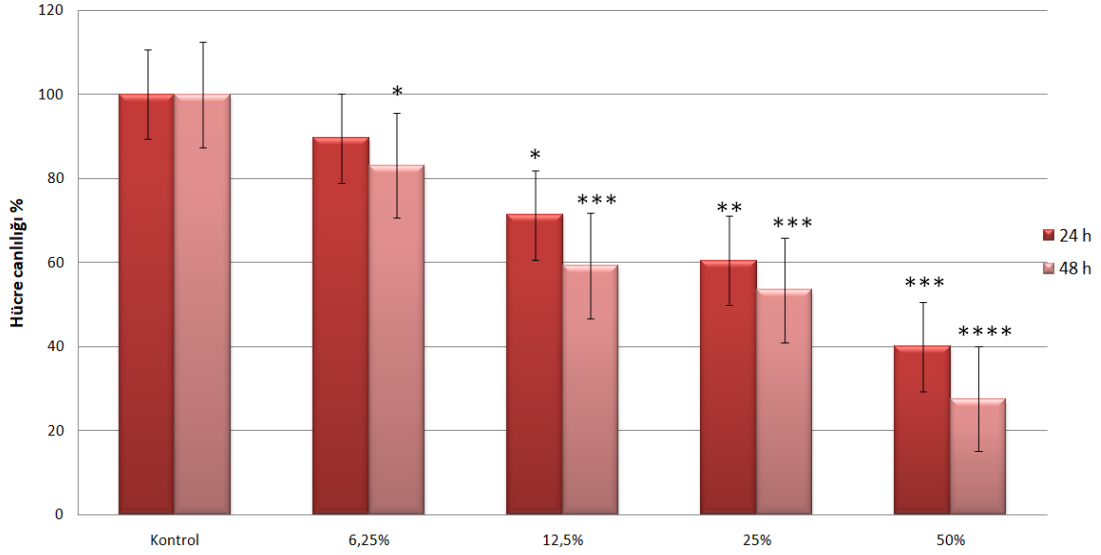
Arı ürünlerinin, HCT116 kolon kanseri hücre hattında proliferasyon etkisini belirlemek için WST-1 deneyi uygulanmıştır. Bunun için arı ürünlerinin 4 farklı konsantrasyonu (%6,25; %12,5; %25; %50) ile 24 ve 48 saat süreyle hücre hattına muamele edilmiştir. Her bir arı ürünü için artan konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür. En yüksek proliferasyon inhibisyonu 48 saatlik arı sütü ve bal uygulamalarında gözlemlendi.



Şekil 3.9. Arı sütünün 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.

Çalışmamızda arı sütü, hücre proliferasyonunu 48 saatte %50 konsantrasyonda kontrole kıyasla %13,46'ya kadar azaltmıştır (Şekil 3.9). HT-29 kolon kanseri hücre hattıyla yapılan bir çalışmada, arı sütünün normal hücrelere zarar vermediği ancak kanser hücrelerinin proliferasyonunu konsantrasyona bağlı olarak önleyebildiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonuçları arı sütünün prooksidan rol üstlenerek, hayatta kalması düşük oksidatif strese bağlı olan kanser hücrelerinde oksidatif stresi artırarak antikanser aktivite gösterdiğini düşündürmüştür (Ayna vd., 2021).

Ayrıca arı sütünün antikanser aktivitesinden sorumlu ana bileşenin de yine arı sütüne has 10-HDA bileşeni olduğu bildirilmiştir (Nainu vd., 2021). Kronik inflamasyon, tümör gelişimine zemin hazırlar. 10-HDA bileşeni ile yapılmış bir çalışmada kolon kanseri hücrelerinde *in vitro* anti-inflamatuar aktivitesi gösterilmiştir. Kronik inflamasyon ve karsinogeneze kemopreventif bir ajan olarak fayda sağlayabileceği belirtilmiştir (Yang vd., 2018). Çalışmamızda kullandığımız aynı merkezden temin edilmiş arı sütünün daha önce 10-HDA içeriğinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Sönmez vd., 2023). Bu durum çalışmamızdaki güçlü antibiyofilm ve antiproliferatif etki düzeylerinin yüksek 10-HDA içeriğine bağlı olabileceğini desteklemektedir.

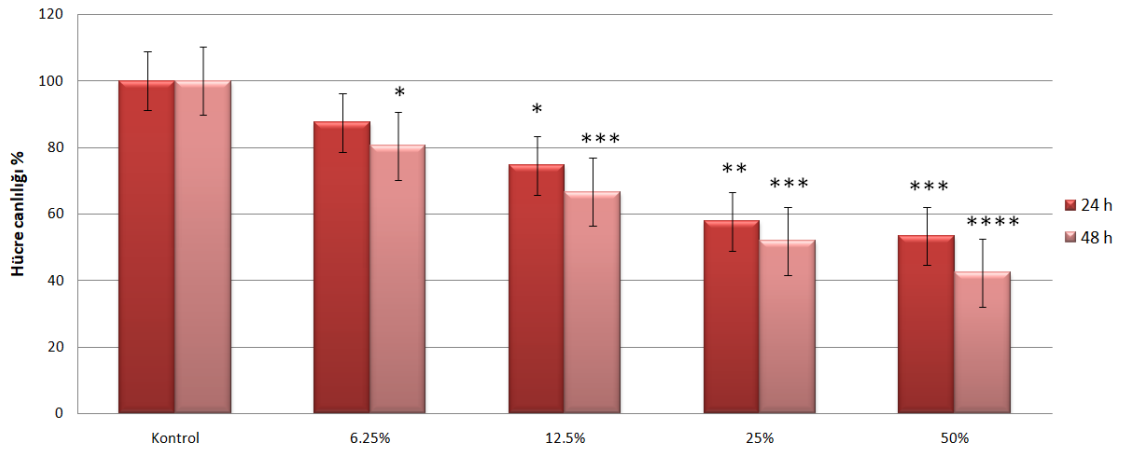


Şekil 3.10. Arı zehrinin 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.

Şekil 3.10’da görüldüğü üzere sonuçlarımız arı zehrinin konsantrasyona bağlı olarak dikkate değer sitotoksik etki oluşturduğuna (%72,50) işaret etmektedir. Benzer pek çok çalışmada, arı zehrinin normal hücre hattında toksik etki göstermediği ancak HT-29, HCT116, Caco-2 ve SW480 gibi kolon kanser hücre hatlarında antiproliferatif etki gösterdiği doğrulanmıştır (Yaacoub vd., 2021; Shadeed vd., 2022; Saghi vd., 2022).

Apis mellifera zehriyle yapılan bir çalışmada hem total zehir, hem de zehirden izole edilen melittin ve fosfolipaz A2 bileşenlerinin ayrı ayrı HCT116 hücre hattındaki sitotoksik etkisine bakılmıştır. Bileşenlerin tek tek gösterdiği etkiye nazaran total arı zehrinin çok daha fazla sitotoksik etki göstermesi, zehrin içindeki özellikle antikanser olarak belirtilen bu iki maddenin sinerjistik etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Yaacoub vd., 2021). Anadolu arı zehrinin de melittin ve fosfolipaz A2 bileşenleri açısından zengin ve kaliteli olduğu bildirilmiştir (Kekeçoğlu vd., 2019).

Perga ve polenle HCT116 hücre kültürü üzerinde yaptığımız hücre canlılık testinde iki ürünün 24 saatlik sonuçları birbirine yakın seyretmiştir. 48 saatlik sonuçlara göre perga yüksek konsantrasyonda hücre canlılığını %42 seviyelerine indirirken (Şekil 3.11), polenin uygulandığı her konsantrasyonda hücre canlılığı %55 altında kalmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. Perganın 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.

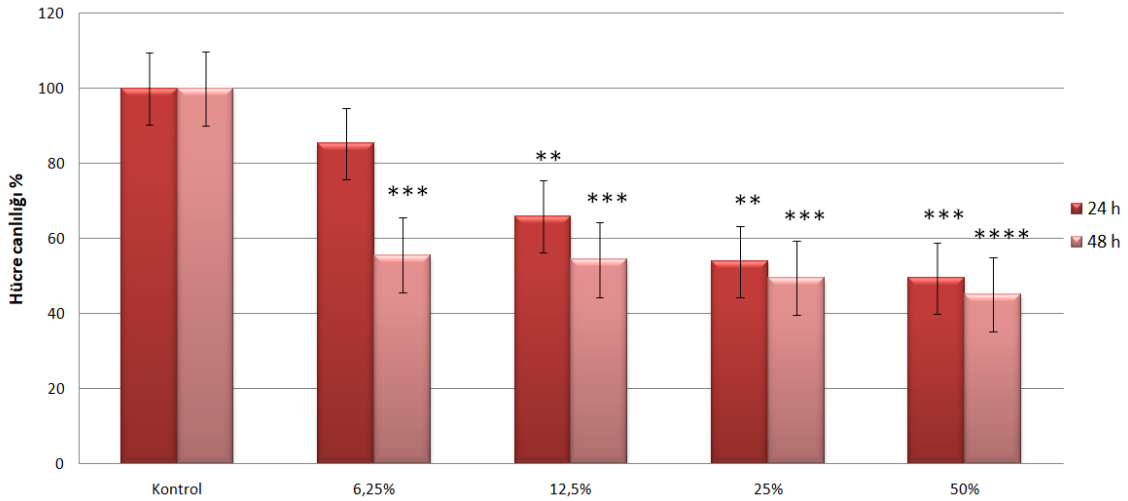
Pergayla yapılan bir çalışmada, 3 farklı tümör hücresi ve 1 normal hücre üzerinde sitotoksik etkisine bakılmış ve Caco-2 insan kolorektal adenokarsinom hücre hattında konsantrasyona bağlı olarak canlılığını %19'lara kadar düşürdüğü tespit edilmiştir. Diğer 2 tümör hücrelerinin canlılığını da inhibe etmiş, ancak normal akciğer hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi oldukça düşük kalmıştır (Elsayed vd., 2021).

Bir çalışmada beş perga örneğinin, HeLa, HepG2, MCF-7, NCI-H460 gibi farklı insan tümör hücre dizilerine ve ayrıca tümör olmayan karaciğer hücrelerine (domuz karaciğer hücreleri, PLP2) karşı etkisine bakıldı. Test edilen tüm numuneler arasında, 3. Numune HepG2'nin büyümesini inhibe eden tek pergaydı ve tüm tümör hücrelerinde etkili çıktı. Bunun dışında, 1 ve 2. numuneler MCF-7'ye karşı, 4 ve 5. numuneler, NCI-H460'a karşı aktifti. HeLa'ya karşı ise 1., 4. ve 5. numuneler birlikte etki oluşturdu. Çalışmada perga örneklerinin tümör hücrelerine karşı orta düzeyde sitotoksik etki gösterdiği ancak normal hücreler için toksisite göstermediği ifade edilmiştir (Sobral vd., 2017).

Farklı bir çalışmada ise perganın, meme kanserinde kullanılan ilaçlarla etkileşiminde, ilaçların kanser hücresinin çoğalmasını durdurmada etkisini azaltırken, apoptotik etkiyi de baskılamaktadır. Ancak tek başına kullanıldığında perganın meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkisinin az olmasına rağmen, önemli seviyede kanser hücrelerinin göçünü yavaşlattığı gözlenmiştir (Caner vd., 2021).

Çalışmalar karşılaştırıldığında, perga içeriği bakımından kovandan kovana bile değişiklik gösterebilen bir yapıdadır. Spesifik değişikliklere rağmen perganın belli bir içerik bileşimi vardır. Bu nedenle perganın farklı kanser hücre hatlarında farklı

seviyelerde etki göstermesi, içerik bileşiminden ziyade, onun hücresel yapıya ve metabolizmaya karşı seçici sitotoksik etki gösterdiğini düşündürmüştür. Ayrıca kanser hücrelerinin hareketini yavaşlatma etkisi, kanseri farklı bir yaklaşımla durdurabileceği fikrini doğurmaktadır. Ancak bu fikrin desteklenmesi için daha ileri ve moleküler düzeyde çalışmalar yapılması gereklidir.



Şekil 3.12. Polenin 4 farklı dozuyula 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.

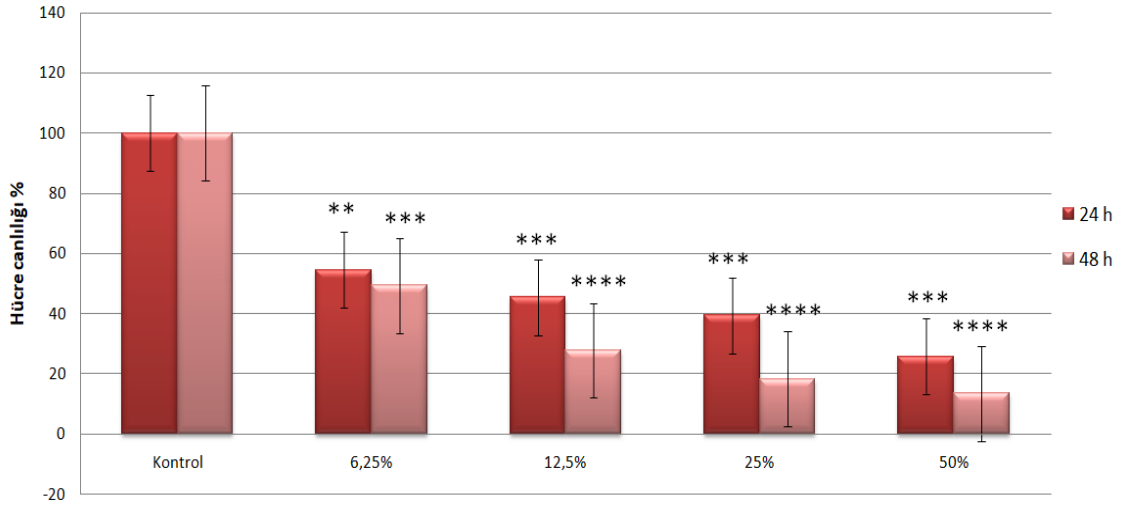
Polenle yapılan çalışmalara bakılacak olursa, HT-29 ve HCT116 hücre hattı üzerinde, arı poleni polisakkaritinin, hücrelerin proliferasyonunu *in vitro* doza bağlı şekilde inhibe etmiştir (Wang vd., 2013).

Fare kolorektal kanser hücre kültürü (C26) üzerinde metanolik polen özleriyle yapılmış farklı bir çalışmada ise antiproliferatif etki yüksek düzeyde bulunmuştur. Ayrıca uzun süre (24-48 h) polen ekstraktına maruz kalan C26 hücrelerinde apoptoz işareti sayılacak morfolojik değişimler göze çarpmıştır (Mărgăoan vd., 2016).

Arı polenin antikanser etkisi, çoklu hücre hatlarında hücre çoğalmasının engellenmesi apoptozun uyarılması ve tümör büyümesinin azaltılması gibi altta yatan mekanizmalar ile açıklanmaktadır (Algethami vd., 2022).

Bunun yanında polenin kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkisini de azalttığı bildirilmektedir. İçerdiği polifenolik bileşiklere bağlı olarak, birçok hastalığa neden olan serbest radikallere karşı oksidatif hasara yol açmadan temizleyici etkisi ile yüksek antioksidan kapasitesi sayesinde kanser ilaçlarının neden olduğu böbrek ve karaciğer

hasarını azaltabildiği belirtilmiştir (Tuoheti vd., 2020; Şengül ve Vatansev, 2021).

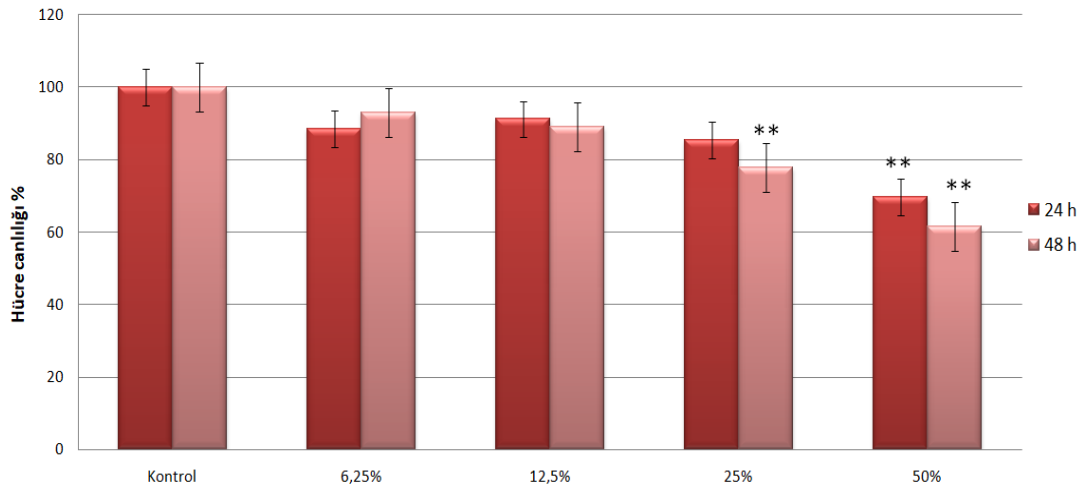


Şekil 3.13. Balın 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.

Bal örneğimiz HCT116 hücrelerinde büyümeyi 48 saatte %86,51 oranında engellemiştir (Şekil 3.13). Literatür bal için, birçok mekanizmayla tümör büyümesini ve metastazı engellediğini söylemektedir. Bunlardan bazıları hücre döngüsünün modülasyonu, mitokondriyal dış zar geçirgenliğinin uyarılması, oksidatif stresin düzenlenmesi, inflamasyonun iyileşmesi ve anjiyogenezin sınırlandırılmasıdır (Wasfi vd., 2016). Hint balıyla yapılan bir araştırmada, balın hücre çoğalmasını kısıtladığı, hem iç hem dış iki apoptotik yolağı aktive ettiği ve özellikle kolon kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu gösterilmiştir (Das vd., 2022).

Farklı bir çalışmada ise HT-29 ve HCT-15 kolon kanser hücre hatlarında çeşitli bal numunelerinin ciddi düzeyde antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Jaganathan ve Mandal, 2009). Manuka balı ile yapılmış bir çalışmada HCT116 hücreleri üzerinde kaspaz 3,8 ve 9 ekspresyon artışıyla apoptozu indükleyerek ve hücre döngüsünü S fazında durdurarak antiproliferatif etki göstermiştir. Ancak kötü huylu olmayan hücrelerde önemli toksisite göstermemiştir (Afrin vd., 2018).

Literatürle uyumlu olan çalışmamız bölgemiz balının antikanser etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.14. Propolisin 4 farklı dozuyla 24 saat ve 48 saatlik iki farklı zaman aralığında muamele edilen HCT116 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi.

Propolisin kapsamlı şekilde incelenen bir başka yönü de antiproliferatif etkileridir. Çalışmamızda propolisin konsantrasyon arttıkça HCT116 hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği belirtilebilir. Ancak düşük dozlarda anlamlı bir azalmaya sebep olmamış, en yüksek dozda ve sürede dahi, hücre canlılığı %60 üzerinde seyretmiştir (Şekil 3.14).

Sonucumuz literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında, bazılarıyla uyumluyken, bir kısmıyla farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin bir çalışmada propolis ve propolisten elde edilen farklı fraksiyonların sitotoksik etkisi, HT-29 ve HCT116 kolon kanser hücrelerinde MTT ile araştırıldı. Propolis total ekstraktının uygulandığı Vero ve kanser hücre hatlarındaki fark anlamlı değildi. Buna karşın özellikle 2 fraksiyon Vero hücrelerinde düşük, kanser hücrelerinde yüksek sitotoksikite gösterdi. Sonuçlar kimyasal içeriğin farklı seviyelerde sitotoksikite göstereceğini vurgulamaktadır (dos Santos vd., 2019). Yakın zamanda yapılan farklı bir çalışmada standardizasyonu yapılmış 3 farklı propolis (kırmızı, yeşil ve kahverengi propolis) HT-29 hücrelerinde 48 saat boyunca hücre canlılığına etkisi test edilmiştir. Hücre canlılığı, yeşil propolis uygulamasında artarken, kahverengi propolis uygulamasında önemli ölçüde azalmıştır (Falcão vd., 2023).

Propolis uygulamalarında genel kanı, içeriğin fenolik bileşenlerce zengin olmasına bağlı olarak umut verici biyolojik ve farmakolojik özelliği olmasıdır. Propolis içeriği arı ırkı, mevsimsel şartlar ve bölgesel bitki örtüsü gibi pek çok etkene bağlı olarak değişir. Bu durum, propolis kemotiplerinin kimyasal bileşenleri ve buna bağlı olarak biyolojik

aktivitelerinin değişkenliğini ve standardizasyonun zorluğunu göstermektedir (Machado vd., 2016; Kekeğoğlu vd. 2021; Falcão vd., 2023).

Bu durumla ilişkili olarak propolisin önemli antikanser bileşenlerinden olan kalkonların yöremiz propolisinde olmadığı daha önce de belirtilmiştir (Eroğlu vd., 2021).

Çeşitli antikanser ilaçlarının sentezi ve geliştirilmesinde yaygın şekilde kullanılan kalkonlar, hücre döngüsünün durdurulması, apoptotik yolun başlatılması, tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu, anjiyogenezin bloke edilmesi, tümör işaretlerini düzenleyen sinyal yollarına etki etme gibi çeşitli yollarla kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterir (Darandale vd., 2023).

Benzer şekilde, tümör hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve istilasını engelleme, apoptoza aracılık etme kabiliyeti olan biyokanın ve kumarik asit bileşenlerinin (Zhao vd., 2018; Hu vd., 2020) de yöremiz propolisinde olmadığı tespit edilmiştir (Eroğlu vd.,2021).

Sonuç olarak, propolis örneğimizin antikanser etkisinin düşük kalmasının altında yatan neden, içeriğindeki bu bileşenlerin eksikliğinden kaynaklı olabilir.

Birçok alıřma arı ürünlerinin seçici sitotoksisite özellięini vurgulamaktadır (Jovanović vd., 2018; Ayna vd., 2021; Machado vd., 2021; Weis vd., 2022).

Yani arı ürünleri kötü huylu, hücre döngüsünü durdurmayan kanser hücreleriyle savaşırken, sağlıklı, normal hücrelerde, apoptozu durdurma, proliferasyonu teşvik etme ve enerjik metabolizmayı artırma yoluyla onları desteklerler. Bu özellikleri sayesinde genel sağlığı koruyucu, bağışıklığı güçlendirici, hastalıklara karşı direnci artırıcı ve iyileşme süreçlerini destekleyici olarak öne çıkan doğal ürünlerdir (Erejuwa vd., 2014; Nainu vd.,2021).

3.3. APOPTOTİK YOLAK ANALİZİ

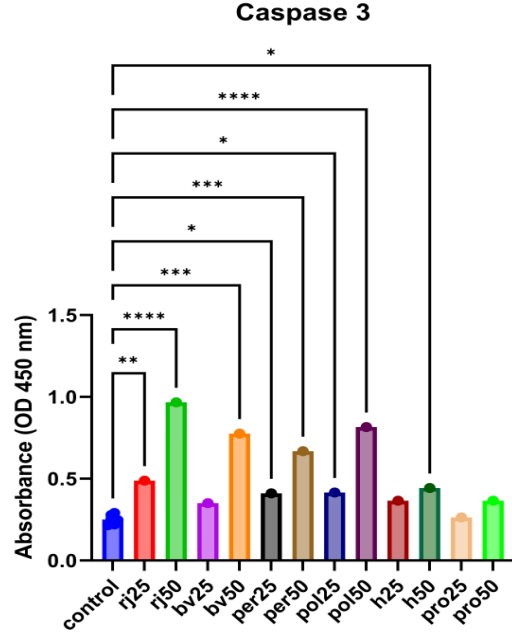
Literatürde apoptozisi göstermek amacıyla yaygın olarak kullanılan, “aktif kaspaz 3” tayini, özgülüğü yüksek bir yöntemdir. Apoptozisin olmadığı durumlarda, hücre içinde inaktif formda “prokaspaz 3” halinde bulunan bu enzim, apoptotik uyarıya bağlı olarak aktifleşir. Buna bağlı olarak kaspaz 3 ekspresyonunun tespit edildiği hücrelerde apoptozisin gerçekleştiği kabul edilmiştir.

Kaspaz 8 enzimi ölüm reseptörleri aracılı dışsal apoptotik yolakta görev alan bir başlatıcı kaspazdır. Büyüme faktörlerindeki eksiklikler veya ölüm reseptörlerine

bağlanabilecek ligandların varlığı gibi bir dış uyaran, apoptozu başlatmak üzere kaspaz 8'i aktive eden DISC' in oluşumunu başlatır. Sitozolde inaktif formunda bulunan prokaspaz 8'in DISC tarafından verimli ve hızlı aktivasyonu ile eksprese olan kaspaz 8, mitokondriyal yoldan bağımsız olarak kaspaz 3'ü doğrudan aktive edebilir. Dolayısıyla aktif kaspaz 3 enziminin yanında, aktif kaspaz 8 ekspresyonunun gözlemlendiği durumlarda, ölüm reseptörleri aracılı dışsal apoptozis yolağın başlatıldığı kabul edilebilir. Ancak DISC konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda, kaspaz 8, apoptozu başlatmak için kaspaz 9 yoluyla mitokondriye bağımlı bir şekilde çalışabilir.

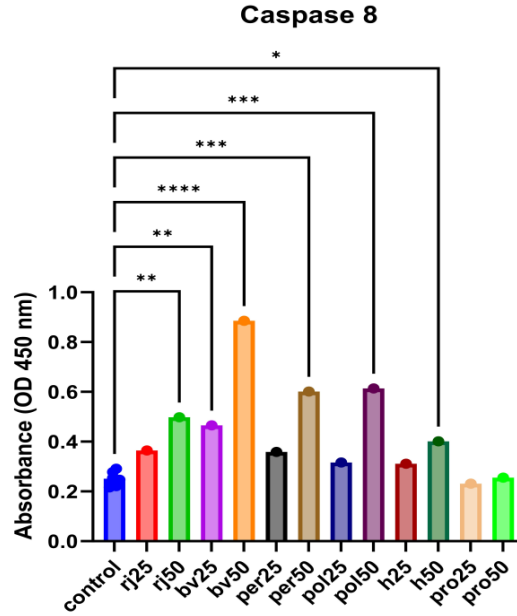
Viral enfeksiyon, iyonize radyasyon, serbest radikallerden dolayı oluşan oksidatif hasar, hücre içinde Ca^{+2} iyonu konsantrasyonunun artışı, pH'nın azalması ve DNA hasarı sonucunda hasar gören hücreler, mitokondri aracılı içsel apoptotik yolak ile ölüme sürüklenir. Kaspaz 9 enzimi, inaktif formdaki kaspaz 3 enzimin aktifleşmesine neden olan, içsel apoptotik yolakta görevli bir başlatıcı enzimdir. Bu nedenle, çalışmamızda aktif kaspaz 3 enziminin yanında, aktif kaspaz 9 enziminin yukarı regülasyonunun gözlemlendiği durumlarda mitokondri aracılı içsel apoptozis yolağın başlatıldığı kabul edilmiştir (Aral vd., 2019).

Buna bağlı olarak, HCT116 hücre hattında arı ürünlerinin etkisi, apoptozun içsel ve dışsal yolaklarında kilit rol oynayan üç kaspaz (kaspaz 3, 8 ve 9) üzerinde araştırıldı. Arı ürünlerinin kontrole kıyasla etki düzeyleri ELISA sonuçlarının verildiği çubuk grafikler üzerinde görülmektedir (Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17).



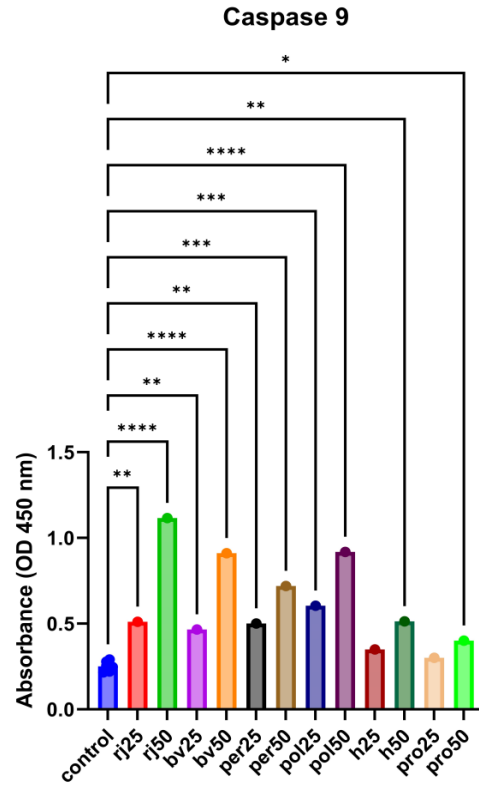
Şekil 3.15. Arı ürünlerinin iki farklı konsantrasyonu (%25 / %50) uygulanan HCT116 hücrelerinde Kaspaz 3 ekspresyonu sonuçları. n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ****p<0,0001. (rj= arı sütü; bv= arı zehri; per=perga; pol=polen; h=bal; pro=propolis).

Grafik Graphad Prism programı ile düzenlenmiştir.



Şekil 3.16. Arı ürünlerinin iki farklı konsantrasyonu (%25 / %50) uygulanan HCT116 hücrelerinde Kaspaz 8 ekspresyonu sonuçları. n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ****p<0,0001. (rj= arı sütü; bv= arı zehri; per=perga; pol=polen; h=bal; pro=propolis).

Grafik Graphad Prism programı ile düzenlenmiştir.



Şekil 3.17. Arı ürünlerinin iki farklı konsantrasyonu (%25 / %50) uygulanan HCT116 hücrelerinde Kaspaz 9 ekspresyonu sonuçları. n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ****p<0,0001. (rj= arı sütü; bv= arı zehri; per=perga; pol=polen; h=bal; pro=propolis).

Grafik Graphad Prism programı ile düzenlenmiştir.

Arı sütünün apoptotik yollarda kaspaz 3 aktivasyonunun yanında, hem intrinsik hem de ekstrinsik protein artışları tespit edilmiştir. Ancak ekstrinsik yolak belirteci kaspaz 8, kaspaz 9'a oranla daha az eksprese olmuştur. Yapılan bir çalışmada apoptotik yollara bakılmış, kaspaz 3 aktivasyonunun yanında intrinsik ve ekstrinsik yolak belirteçlerinin de yukarı regülasyonu tespit edilmiştir (Ayna vd., 2021).

Çalışmamızda arı zehrinin %50 konsantrasyonu kaspaz 3'ü kontrole göre 3,5 kat artırırken (p<0,001), kaspaz 8 ve 9 proteinlerini ise 4 kat artırdı (p<0,0001). Bu sonuca göre arı zehrinin hem içsel, hem dışsal yolları indüklediği düşünülmektedir.

Araştırmacılar arı zehrinin kaspaz 3, 8 ve 9 ekspresyonunu arttırmasıyla 2 yönlü apoptoz indüksiyonu sonucu HCT116 ve SW480 kolon kanseri hücrelerini inhibe ettiğini bildirmiştir (Zheng vd., 2015). Bu sonuç çalışmamızdaki bulgularla paraleldir. Ana bileşenlerden biri olan melittin maddesinin apoptotik ve nekrotik hücre artışı, mitokondriyal bozunma, hücre döngüsünün durdurulması, metastazın baskılanması gibi

yollarla kanser hücrelerini istila etme yeteneği, onu kanser tedavisi için umut verici bir seçenek olarak düşündürür (Pandey vd., 2023).

Sonuçlarımıza göre, apoptoz hem polende hem de pergada iki yönlü olarak teşvik edilmiştir. Kaspaz 9 aktivasyonu polenle muamelede daha fazla olurken, kaspaz 8 ekspresyonunu aynı oranda artırmışlardır.

Perganın kanser hücre hatları üzerinde apoptotik yolak analizi ile ilgili çok fazla çalışma yoktur. Obezite ve kısırlık ile ilgili yapılmış birkaç çalışmada perganın apoptotik hücre sayısını azalttığı tespit edilmiştir. Perganın oksidatif stres ve inflamasyonu azaltma yeteneği sayesinde kısırlığa neden olabilecek apoptotik sürecin azalmış olabileceği kanısına varılmıştır (Doğanyigit vd., 2020; Suleiman vd., 2020; Suleiman vd., 2022).

Farklı bir çalışmada ise perganın, kanser ilaçlarının apoptotik etkisini baskıladığı bildirilmiştir (Caner vd., 2021). Bu durum perganın kanser ilaçlarıyla kullanımında dikkatli olunması gerektiği fikrini doğurmaktadır.

Çalışmamızda varılan sonuç perganın HCT116 kolon kanseri hücre hattında apoptotik etkiye sahip olduğudur. Ancak yapılan farklı çalışmalarda anti-apoptotik bir etki göstermektedir. Çalışılan hücre hatlarının farklı olması ve perga numunelerinin ayrı yörelerden toplanmış olması sonuçların kıyaslanmasında net bir görüşün ortaya konmasını zorlaştırmaktadır.

Bal örneğimiz HCT116 kolon kanseri hücre hattında proliferasyonu 48 saatte %86,51 oranında engellemiştir. Bu sonuç diğer arı ürünlerinin antiproliferasyon etkilerine kıyasla yüksek seviyededir. Ancak apoptotik süreçlerde balın, kaspaz ekspresyonları anlamlı olmasına karşın, diğer arı ürünlerine kıyasla çok fazla artmamıştır. Bu durum balın, proliferasyonu apoptotik olarak değil de farklı şekilde yönetebileceğini düşündürmektedir.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların büyük çoğunluğu apoptotik ilaçlardır. Arı ürünlerinin apoptotik indükleyici özellikleri onları kanser ajanları olarak değerlendirmenin önemini ortaya koyar.

Apoptoz düzenleyici proteinlerin, özellikle kaspaz 3, 8 ve 9'un ekspresyonuna ilişkin araştırma, arı ürünlerinin antiproliferatif etkilerinin altında yatan mekanizmalar hakkında değerli bilgiler sağladı.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Uzun yıllardır enfeksiyon ve kanser gibi pek çok hastalık için geleneksel ve tamamlayıcı tıpta kullanılan arı ürünlerinin artan teknoloji ile moleküler düzeyde araştırılmasının yolu açılmıştır. İlimiz için önemli endemik bir popülasyon olan Yığılca bal arısı ekotipinden elde edilen altı farklı arı ürününün apiterapötik aktivitelerine ilişkin araştırmalar sınırlıdır. Bu çalışma, altı arı ürününün antibiyofilm ve antikanser potansiyelini araştırarak, değerli karşılaştırmalı deneysel veriler sunarak bu boşluğu giderdi.

Arı zehiri, önemli biyofilm inhibisyonu ve sitotoksik etkiler sergileyerek göze çarpan bir performans sergileyen bir madde olarak ortaya çıktı. *E. coli* biyofilm oluşumunu %70'in üzerinde engelleme konusundaki dikkat çekici yeteneği, etkili bir antibiyofilm ajanı olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Arı zehirinin fosfolipaz A2 gibi bileşenlere atfedilen geniş spektrumlu antimikrobiyal özelliklerini vurgulayan benzer bulgular daha önce de rapor edilmişti.

Aktif antimikrobiyal ajan 10-HDA açısından zengin olan arı sütü, biyofilm oluşumunu ve HCT116 hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttı. Özellikle, hem içsel hem de dışsal apoptoz belirteçlerini yukarı doğru düzenledi; bu, kanser hücrelerinde apoptotik yolları indüklemeye potansiyelini ortaya koydu. 10-HDA'nın belgelenmiş anti-inflamatuar aktivitesi, özellikle kronik inflamasyonla ilişkili karsinogenezde terapötik çekiciliğini daha da arttırır.

Propolis, biyofilm inhibisyonunda daha az etkili olmasına rağmen, kayda değer antiproliferatif etkiler gösterdi ve kaspaz 9 ekspresyonunun arttığını gösterdi; bu da onun apoptozu indüklemeye potansiyelinin göstergesidir. Bu sonuç, propolisin kaspaz 9'u aktive etme ve kanser hücrelerinde apoptozu tetikleme yeteneğini vurgulayan mevcut literatürle uyumludur.

Geniş spektrumlu antibakteriyel özellikleriyle bilinen bal, önemli biyofilm inhibisyonu sergiledi ve HCT116 hücre büyümesini baskıladı. Her ne kadar apoptotik etkileri diğer arı ürünleri kadar belirgin olmasa da, balın hücre döngüsünün modülasyonu ve oksidatif stres dâhil olmak üzere çok yönlü mekanizmaları, kanser yönetiminde terapötik çok

yönlülüğünün altını çiziyor.

Polen ve perga, antibiyofilm kapasiteleri ve kanser hücrelerinde apoptozun çift yönlü teşviki ile kanser tedavisi için umut verici yollar sunmaktadır. Kötü huylu hücrelere karşı seçici sitotoksiteleri, terapötik potansiyellerini daha da vurgulayarak, onları bağışıklığı güçlendirmek, hastalıklara direnmek ve genel sağlığı geliştirmek için değerli doğal ilaçlar haline getirir.

Genel olarak çalışma, arı ürünlerinin bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede, kanser hücresi çoğalmasını engellemede ve kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemede terapötik potansiyelini destekleyen kapsamlı kanıtlar sağlıyor. Arı ürünlerinin kemoterapötik tedavilerle karşılaştırıldığında nispeten toksik olmaması tedavi amaçlı kullanımda spesifik avantaj oluşturuyor.

Arı ürünlerinin terapötik potansiyelinin, bunların hastalık yönetimi ve tedavisindeki uygulamalarının güvenilirliği için, stabilitesinin ve standardizasyonunun yapılması ve kullanımdan önce sitotoksik etkilerinin belirlenmesi son derece önemlidir. Çalışmamız ileri düzey çalışmalar için bir temel teşkil etmekle beraber, potansiyel antikanser ajanların ve biyofilm inhibitörlerin keşfi için motive edici bir yol açmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- Afrin, S., Giampieri, F., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T.Y., Cianciosi, D., Reboledo-Rodríguez, P., ... & Battino, M. (2018). The inhibitory effect of Manuka honey on human colon cancer HCT-116 and LoVo cell growth. Part 1: the suppression of cell proliferation, promotion of apoptosis and arrest of the cell cycle. *Food & Function*, 9(4), 2145–2157.
- Aguirre-Sánchez, J. R., Valdez-Torres, J. B., Del Campo, N. C., Martínez-Urtaza, J., Del Campo, N. C., Lee, B. G., ... & Chaidez-Quiroz, C. (2022). Phylogenetic group and virulence profile classification in *Escherichia coli* from distinct isolation sources in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 106, 105380.
- Al Naggar, Y., Giesy, J. P., Abdel-Daim, M. M., Ansari, M. J., Al-Kahtani, S. N., & 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(3), 1519–1527.
- Algethami, J. S., El-Wahed, A. A. A., Elashal, M. H., Ahmed, H. R., Elshafiey, E. H., Omar, E. M., ... & El-Seedi, H. R. (2022). Bee pollen: Clinical trials and patent applications. *Nutrients*, 14(14), 2858.
- Al-Harbi, S. A., & Al-Judaibi, A. A. (2020). Relationship between *Escherichia coli* and colon cancer. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 188–193.
- Alhinai, E. A., Walton, G. E., & Commene, D. M. (2019). The role of the gut microbiota in colorectal cancer causation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5295.
- Al-Kafaween, M. A., Hilmi, A. B. M., Jaffar, N., Al-Jamal, H. A., Zahri, M. K., & Jibril, F. I. (2020). Antibacterial and Antibiofilm activities of Malaysian Trigona honey against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 13(1), 69–76.
- Al-kafaween, M., Hilmi, A. B., Al-Jamal, H., Jaffar, N., Al-Sayyed, H., & Zahri, M. (2021). Effects of selected Malaysian Kelulut Honey on biofilm formation and the gene expression profile of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and

- Escherichia coli*. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 9–25.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254.
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & De Laurenzi, V. (2015). Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death & Disease*, 6(1), e1609.
- Amly, D. A., Hajardhini, P., Jonarta, A. L., Yulianto, H. D. K., & Susilowati, H. (2021). Enhancement of pyocyanin production by subinhibitory concentration of royal jelly in *Pseudomonas aeruginosa*. *F1000Research*, 10, 14.
- Aral, K., Aral, C. A., & Kapila, Y. (2019). The role of caspase-8, caspase-9, and apoptosis inducing factor in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 90(3), 288–294.
- Aydemir, D. H. (2018). Bakteriyal biyofilmlerin biyolojik önemi ve etkili kontrol stratejileri. *Turkish Journal of Life Sciences*, 3(1), 218–230.
- Aydın, Y., & Tekeoğlu, İ. (2018). Tamamlayıcı Tıp Ve Güncel Apiterapi Uygulamaları. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 2(2), 64–73.
- Ayna, A., Tunç, A., Özbolat, S. N., Bengü, A. Ş., Aykutoğlu, G., Canlı, D., ... & Darendelioğlu, E. (2021). Anticancer, and antioxidant activities of royal jelly on HT-29 colon cancer cells and melissopalynological analysis. *Turkish Journal of Botany*, 45(8), 809–819.
- Ballén, V., Cepas, V., Ratia, C., Gabasa, Y., & Soto, S. M. (2022). Clinical *Escherichia coli*: from biofilm formation to new antibiofilm strategies. *Microorganisms*, 10(6), 1103.
- Baptista, B. G., Lima, L. S., Ribeiro, M., Britto, I. K., Alvarenga, L., Kemp, J. A., ... & Mafra, D. (2023). Royal jelly: a predictive, preventive and personalised strategy for novel treatment options in non-communicable diseases. *EPMA Journal*, 14(3), 381–404.
- Behroozi, J., Divsalar, A., & Saboury, A. A. (2014). Honey bee venom decreases the complications of diabetes by preventing hemoglobin glycation. *Journal of*

- Molecular Liquids*, 199, 371–375.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., ... & Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clinical Cancer Research*, 20(4), 859–867.
- Bozgeyik, E. (2020). *Kanserin Moleküler Biyolojisi ve İmmünolojisi* (1. Basım) Akademisyen Kitap Evi, 29–290.
- Bultman, S. J. (2017). Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(1), 1500902.
- Campos, M. G., Anjos, O., Chica, M., Campoy, P., Nozkova, J., Almaraz-Abarca, N., ... & Carreck, N. L. (2021). Standard methods for pollen research. *Journal of Apicultural Research*, 60(4), 1–109.
- Caner, A., Onal, M. G., & Silici, S. (2021). The effect of bee bread (Perga) with chemotherapy on MDA-MB-231 cells. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2299–2306.
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical Oncology*, 17(7), 395–417.
- Celebi, D., Celebi, O., Baser, S., & Taghizadehghalehjoughi, A. (2023). Evaluation of antimicrobial and antibiofilm efficacy of bee venom and exosome against *Escherichia coli* K99 strain. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 29(3), 239–246.
- Chew, S. S., Tan, L. T. H., Law, J. W. F., Pusparajah, P., Goh, B. H., Ab Mutalib, N. S., & Lee, L. H. (2020). Targeting gut microbial biofilms—a key to hinder colon carcinogenesis?. *Cancers*, 12(8), 2272.
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., & Burlando, B. (2017). Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 412.
- Cullin, N., Antunes, C. A., Straussman, R., Stein-Thoeringer, C. K., & Elinav, E. (2021). Microbiome and cancer. *Cancer Cell*, 39(10), 1317–1341.
- Çelik, S., Gerçek, Y. C., Özkök, A., & Ecem Bayram, N. (2022). Organic acids and their derivatives: minor components of bee pollen, bee bread, royal jelly and bee

- venom. *European Food Research and Technology*, 248(12), 3037–3057.
- Darandale, S., Kadam, K., More, V., Hase, D., Hase, V., & Gurav, S. (2023). Chalcones: An insight into their anticancer potential and action mechanism. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4573587>
- Das, N., Ray, N., Patil, A. R., Saini, S. S., Waghmode, B., Ghosh, C., ... & Roy, P. (2022). Inhibitory effect of selected Indian honey on colon cancer cell growth by inducing apoptosis and targeting the β -catenin/Wnt pathway. *Food & Function*, 13(15), 8283–8303.
- de Vos, W. M. (2015). Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *NPJ biofilms and microbiomes*, 1(1), 1–3.
- Deglovic, J., Majtanova, N., & Majtan, J. (2022). Antibacterial and antibiofilm effect of honey in the prevention of dental caries: A Recent Perspective. *Foods*, 11(17), 2670.
- Didaras, N. A., Karatasou, K., Dimitriou, T. G., Amoutzias, G. D., & Mossialos, D. (2020). Antimicrobial activity of bee-collected pollen and beebread: State of the art and future perspectives. *Antibiotics*, 9(11), 811.
- Doğanyığıt, Z., Yakan, B., Soylu, M., Kaymak, E., & Silici, S. (2020). The effects of feeding obese rats with bee bread on leptin and ghrelin expression. *Turkish Journal of Zoology*, 44(2), 114–125.
- dos Santos, D. A., Munari, F. M., da Silva Frozza, C. O., Moura, S., Barcellos, T., Henriques, J. A. P., & Roesch-Ely, M. (2019). Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1), 120–130.
- El Tekle, G., & Garrett, W. S. (2023). Bacteria in cancer initiation, promotion and progression. *Nature Reviews Cancer*, 23(9), 600–618.
- Elsayed, N., El-Din, H. S., Altemimi, A. B., Ahmed, H. Y., Pratap-Singh, A., & Abdelmaksoud, T. G. (2021). *In vitro* antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Egyptian citrus beebread. *Molecules*, 26(9), 2433.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Wahab, M. S. A. (2014). Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of

- cancer. *Molecules*, 19(2), 2497–2522.
- Eroğlu, N., Kambur, M., & Kekeçoğlu, M. (2021). The investigation propolis foraging preference of different honey bee. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 31(1), 133–141.
- Falcão, S. I., Duarte, D., Diallo, M., Santos, J., Ribeiro, E., Vale, N., & Vilas-Boas, M. (2023). Improvement of the in vitro cytotoxic effect on HT-29 colon cancer cells by combining 5-fluorouacil and fluphenazine with green, red or brown propolis. *Molecules*, 28(8), 3393.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(3), 178–194.
- Guchhait, K. C., Manna, T., Barai, M., Karmakar, M., Nandi, S. K., Jana, D., ... & Ghosh, C. (2022). Antibiofilm and anticancer activities of unripe and ripe *Azadirachta indica* (neem) seed extracts. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 42.
- He, F. (2011). BCA (bicinchoninic acid) protein assay. *Bio-protocol*, 1(5), e44.†
- Hickson, J., Diane Yamada, S., Berger, J., Alverdy, J., O’Keefe, J., Bassler, B., & Rinker-Schaeffer, C. (2009). Societal interactions in ovarian cancer metastasis: a quorum-sensing hypothesis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 26, 67–76.
- Hu, X., Yang, Z., Liu, W., Pan, Z., Zhang, X., Li, M., ... & Li, D. (2020). The anti-tumor effects of p-coumaric acid on melanoma A375 and B16 cells. *Frontiers in Oncology*, 10, 558414.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. 100, 1–441 (2012), Lyon, France.
- Jaganathan, S. K., & Mandal, M. J. J. A. (2009). Honey constituents and their apoptotic effect in colon cancer cells. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science*, 1(2), 29–36.

- Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 205–218.
- Johnson, C. H., Dejea, C. M., Edler, D., Hoang, L. T., Santidrian, A. F., Felding, B. H., ... & Siuzdak, G. (2015). Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. *Cell Metabolism*, 21(6), 891–897.
- Jovanović, M. M., Čupurdija, M. Đ., Nikodijević, D. D., Milutinović, M. G., Cvetković, D. M., Rakobradović, J. D., & Marković, S. D. (2018). Effects of royal jelly on energy status and expression of apoptosis and biotransformation genes in normal fibroblast and colon cancer cells. *Kragujevac Journal of Science*, 40, 175–192.
- Jovanović, M., Virijević, K., Arsenijević, D., Pecić, K., & Šeklić, D. (2023). Royal jelly suppresses invasive potential of colorectal cancer cells by attenuating Vimentin and Snail. *Engineering Proceedings*, 56(1), 186.
- Kambur, M., & Kekeçoğlu, M. (2018). Türkiye bal arısı (*Apis mellifera* L.) alt türlerinde genetik çeşitlilik kaybı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 33(1), 73–84.
- Kandemir, I., Kence, M., Sheppard, W. S., & Kence, A. (2006). Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 45(1), 33–38.
- Karataş, M. (2012). *Moleküler Biyoloji*. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, 2. Basım, 449–469.
- Karlıdağ, S., & Keskin, M. (2020). Arı ürünlerine genel bir bakış. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(1), 58–63.
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681.
- Kayode, A. J., & Okoh, A. I. (2022). Assessment of multidrug-resistant *Listeria monocytogenes* in milk and milk product and One Health perspective. *PLoS One*, 17(7), e0270993.
- Kekecoglu, M., Sonmez, E., Yalcin, N. E., Acar, M. K., & Caprazli, T. (2022). Analysis of detailed chemical and bioactive components of Yığılca honeybee propolis and determination of antioxidant potential. *Biology Bulletin*, 49(5), 381–391.

- Kekeçoğlu, M. (2010). Honey bee biodiversity in Western Black Sea and evidence for a new honey bee ecotype in Yığılca provinces of Düzce city. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3(1), 73–78.
- Kekeçoğlu, M., Çaprazlı, T., Samancı, T., Tanuğur Samancı, A. E., & Yorulmaz Önder, E. (2019). Determination and comparison of apitherapeutic value of Turkish and Chinese bee venom through chemical content analysis. *Proceedings Book of 5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition, Healthy Life & Sport*. October. (ss. 02–06).
- Kekeçoğlu, M., Keskin, M., Birinci, C., Birinci, E., & Kolaylı, S. (2021). Effects of honey bee race and season on propolis composition. *Journal of Agricultural Sciences*, 27(3), 292–297.
- Kekeçoğlu, M. (2018). Morphometric divergence of anatolian honeybees through loss of original traits: A dangerous outcome of Turkish apiculture. *Sociobiology*, 65(2), 232–243.
- Khalifa, S. A., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N. E., Farag, M. A., Saeed, A., ... & El-Seedi, H. R. (2020). Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 300–316.
- Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażej, S., Chlebowska-Śmigiel, A., & Wolska, I. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170–180.
- Kosari, F., Taheri, M., Moradi, A., Hakimi Alni, R., & Alikhani, M. Y. (2020). Evaluation of cinnamon extract effects on clbB gene expression and biofilm formation in *Escherichia coli* strains isolated from colon cancer patients. *BMC Cancer*, 20, 1–8.
- Kurek-Górecka, A., Komosinska-Vassev, K., Rzepecka-Stojko, A., & Olczyk, P. (2020). Bee venom in wound healing. *Molecules*, 26(1), 148.
- Laranjo, M., Andrade, N., & Queiroga, C. “Antibiofilm activity of propolis extracts”. Understanding Microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research. Eds. Torres-Hergueta, E, Méndez-Vilas, A. (Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 2018), 1–8.
- Leandro, L. F., Mendes, C. A., Casemiro, L. A., Vinholis, A. H., Cunha, W. R.,

- Almeida, R. D., & Martins, C. H. (2015). Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87, 147–155.
- Li, P., Yin, R., Cheng, J., & Lin, J. (2023). Bacterial biofilm formation on biomaterials and approaches to its treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11680.
- Lv, L., Wei, Z., Li, W., Chen, J., Tian, Y., Gao, W., ... & Ngo, H. H. (2023). Regulation of extracellular polymers based on quorum sensing in wastewater biological treatment from mechanisms to applications: A critical review. *Water Research*, 121057.
- Machado, C. S., Mokochinski, J. B., Lira, T. O. D., de Oliveira, F. D. C. E., Cardoso, M. V., Ferreira, R. G., ... & Torres, Y. R. (2016). Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Manimaran, J., & Mohd Azman, D. K. (2023). The effects of andrographolide on apoptosis in PC-3 cell line via the involvement of caspases 3, 8 and 9. *Pharmacognosy Journal*, 15(4), 612–621.
- Manner, S., Skogman, M., Goeres, D., Vuorela, P., & Fallarero, A. (2013). Systematic exploration of natural and synthetic flavonoids for the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19434–19451.
- Mărgăoan, R., Zăhan, M., Mărghitaș, L. A., Dezmirean, D. S., Erler, S., & Bobiș, O. (2016). Antiproliferative activity and apoptotic effects of *Filipendula ulmaria* pollen against C26 mice colon tumour cells. *Journal of Apicultural Science*, 60(1), 135–144.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656.
- Mirzaei, R., Mirzaei, H., Alikhani, M. Y., Sholeh, M., Arabestani, M. R., Saidijam, M., ... & Yousefimashouf, R. (2020). Bacterial biofilm in colorectal cancer: What is the real mechanism of action?. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104052.
- Mirzarazi, M., Bashiri, S., Hashemi, A., Vahidi, M., Kazemi, B., & Bandehpour, M.

- (2022). The OmpA of commensal *Escherichia coli* of CRC patients affects apoptosis of the HCT116 colon cancer cell line. *BMC Microbiology*, 22(1), 1–12.
- Mostafa, H., Masry, S., Abou-Zeid, M., Abd El Wahab, A., El Demellawy, M., & Abdou, D. (2022). Antimicrobial and anti-biofilm activities of bee venom against some dental pathogens. *Egyptian Journal of Pure and Applied Science*, 60(3), 1–16.
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., ... & Huang, T. (2020). Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11, 928.
- Mukaide, K., Shimamura, Y., Masuda, S., Vongsak, B., & Kumazawa, S. (2022). Antibacterial and antibiofilm activities of Thailand propolis against *Escherichia coli*. *Natural Product Communications*, 17(4), 1934578X221095354.
- Nadler, N., Kvich, L., Bjarnsholt, T., Jensen, J. B., Gögenur, I., & Azawi, N. (2021). The discovery of bacterial biofilm in patients with muscle invasive bladder cancer. *Apmis*, 129(5), 265–270.
- Nagai, T., Nagashima, T., Suzuki, N., & Inoue, R. (2005). Antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition by enzymatic hydrolysates from bee bread. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(1-2), 133–138.
- Nainu, F., Masyita, A., Bahar, M. A., Raihan, M., Prova, S. R., Mitra, S., ... & Simal-Gandara, J. (2021). Pharmaceutical prospects of bee products: Special focus on anticancer, antibacterial, antiviral, and antiparasitic properties. *Antibiotics*, 10(7), 822.
- Nasirli, F., Daikh, A., Arslan, S., Segueni, N., Mutlu, D., & Dogan, N. M. (2022). Chemical composition, antibiofilm and anticancer effect of different propolis extracts collected from Mila (Algeria), 10 May 2022, Preprint (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1631039/v1>]
- O'Brien, M. A., & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572–585.
- Omerovic, M., Müştak, H. K., & Kaya, İ. B. (2017). *Escherichia coli* patotiplerinin virülens faktörleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1), 1–6.

- Özdemir, G., Ersöz, E., & Dilek, N. (2021). Apitherapy and health. *Black Sea Journal of Health Science*, 4(2), 168–174.
- Öztürk, F. Y., Darcan, C., & Kariptaş, E. (2023). The determination, monitoring, molecular mechanisms and formation of biofilm in *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 259–277.
- Pandey, P., Khan, F., Khan, M. A., Kumar, R., & Upadhyay, T. K. (2023). An updated review summarizing the anticancer efficacy of melittin from bee venom in several models of human cancers. *Nutrients*, 15(14), 3111.
- Premratanachai, P., & Chanchao, C. (2014). Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), 337–344.
- Rajput, A., San Martin, I. D., Rose, R., Beko, A., LeVea, C., Sharratt, E., ... & Wang, J. (2008). Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. *Journal of Surgical Research*, 147(2), 276–281.
- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O. A., Baltacı, D., Oktay, M., & Çolakoğlu, S. (2012). Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması). *Duzce Medical Journal*, 14(2), 87–101.
- Saghi, H., Mirzavi, F., Afshari, A. R., Jalili-Nik, M., Mashkani, B., & Soukhtanloo, M. (2022). Bee venom induces anti-tumor effects in HT-29 colon cancer cells through regulation of cell proliferation and apoptosis. *Biologia*, 77(12), 3595–3602.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608–620.
- Sawicki, T., Surma, M., & Sadowska-Rociek, A. (2023). Characteristics of contaminants in the polish-origin bee products and cancer risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 175, 113693.
- Sears, C. L., & Garrett, W. S. (2014). Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host & Microbe*, 15(3), 317–328.
- Sepich-Poore, G. D., Zitvogel, L., Straussman, R., Hasty, J., Wargo, J. A., & Knight, R. (2021). The microbiome and human cancer. *Science*, 371(6536), eabc4552.
- Sevim, E., Bozdeveci, A., Çetin, M. P., Kekeçoğlu, M., Akpınar, R., Keskin, M., ... &

- Karaoğlu, Ş. A. (2021). Antibacterial effects of anatolian propolis on *Paenibacillus larvae*. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 21(2), 177–186.
- Shadeed, S. H., El-Desouky, M. A., Kotb, N. S., & Elhakim, H. K. (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), 178.
- Sharifi, A., Mohammadzadeh, A., Mahmoodi, P., & Salehi, T. Z. (2022). Optimum cultural conditions to achieve the best biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, 25 April 2022, Preprint (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1521057/v1>]
- Silici, S. (2019). Honeybee products and apitherapy. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(9), 1249–1262.
- Sobral, F., Calhella, R. C., Barros, L., Dueñas, M., Tomás, A., Santos-Buelga, C., ... & Ferreira, I. C. (2017). Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in northeast Portugal. *Molecules*, 22(2), 248.
- Sonmez, E., Kekecoglu, M., Sahin, H., Bozdeveci, A., & Alpay Karaoglu, S. (2023). An evaluation of the chemical composition and biological properties of Anatolian Royal Jelly, drone brood and queen bee larvae. *European Food Research and Technology*, 249(5), 1391–1401.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179.
- Suleiman, J. B., Mohamed, M., Abu Bakar, A. B., Zakaria, Z., Othman, Z. A., & Nna, V. U. (2022). Therapeutic effects of bee bread on obesity-induced testicular-derived oxidative stress, inflammation, and apoptosis in high-fat diet obese rat model. *Antioxidants*, 11(2), 255.
- Suleiman, J. B., Nna, V. U., Zakaria, Z., Othman, Z. A., Eleazu, C. O., Bakar, A. B. A., ... & Mohamed, M. (2020). Protective effects of bee bread on testicular oxidative stress, NF-κB-mediated inflammation, apoptosis and lactate transport decline in obese male rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110781.
- Szabat, P., Poleszak, J., Szabat, M., Boreński, G., Wójcik, M., & Milanowska, J. (2019). Apitherapy—the medical use of bee products. *Journal of Education, Health and*

- Sport*, 9(8), 384–396.
- Şengül, F., & Vatansev, H. (2021). Overview of apitherapy products: anti-cancer effects of bee venom used in apitherapy. *International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research*, 2(1), 36–48.
- Taheur, F. B., Kouidhi, B., Fdhila, K., Elabed, H., Slama, R. B., Mahdouani, K., ... & Chaieb, K. (2016). Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 97, 213–220.
- Tanuğur-Samancı, A. E., & Kekeçoğlu, M. (2021). An evaluation of the chemical content and microbiological contamination of Anatolian bee venom. *PLoS One*, 16(7), e0255161.
- Tomkovich, S., Dejea, C. M., Winglee, K., Drewes, J. L., Chung, L., Housseau, F., ... & Sears, C. L. (2019). Human colon mucosal biofilms from healthy or colon cancer hosts are carcinogenic. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(4), 1699–1712.
- Tuoheti, T., Rasheed, H. A., Meng, L., & sheng Dong, M. (2020). High hydrostatic pressure enhances the anti-proliferative properties of lotus bee pollen on the human prostate cancer PC-3 cells via increased metabolites. *Journal of Ethnopharmacology*, 261, 113057.
- Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2017). Royal jelly: Health benefits and uses in medicine. *Bee Products-Chemical and Biological Properties*, 199–218ğ.
- WalyEldeen, A. A., Sabet, S., El-Shorbagy, H. M., Abdelhamid, I. A., & Ibrahim, S. A. (2023). Chalcones: Promising therapeutic agents targeting key players and signaling pathways regulating the hallmarks of cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 369, 110297.
- Wang, B., Diao, Q., Zhang, Z., Liu, Y., Gao, Q., Zhou, Y., & Li, S. (2013). Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. *Molecular Medicine Reports*, 7(5), 1555–1558.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 15(22), 2922–2933.
- Wasfi, R., Elkhatib, W. F., & Khairalla, A. S. (2016). Effects of selected Egyptian honeys on the cellular ultrastructure and the gene expression profile of *Escherichia*

- coli. PloS One*, 11(3), e0150984.
- Weis, W. A., Ripari, N., Conte, F. L., da Silva Honorio, M., Sartori, A. A., Matucci, R. H., & Sforcin, J. M. (2022). An overview about apitherapy and its clinical applications. *Phytomedicine Plus*, 2(2), 100239.
- Yaacoub, C., Rifi, M., El-Obeid, D., Mawlawi, H., Sabatier, J. M., Coutard, B., & Fajloun, Z. (2021). The cytotoxic effect of *Apis mellifera* venom with a synergistic potential of its two main components—Melittin and PLA2—On colon cancer HCT116 cell lines. *Molecules*, 26(8), 2264.
- Yang, Y. C., Chou, W. M., Widowati, D. A., Lin, I. P., & Peng, C. C. (2018). 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 1-7.
- Yousefi, B., Ghaderi, S., Rezapoor-Lactooiyi, A., Amiri, N., Verdi, J., & Shoaee-Hassani, A. (2012). Hydroxy decenoic acid down regulates gtfB and gtfC expression and prevents *Streptococcus mutans* adherence to the cell surfaces. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(1), 1–7.
- Zhao, Y., Wang, L., Zhai, X., Cui, T., Wang, G., & Pang, Q. (2018). The effect of biochanin A on cell growth, apoptosis, and migration in osteosarcoma cells. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(6), 335–341.
- Zheng, J., Lee, H. L., Ham, Y. W., Song, H. S., Song, M. J., & Hong, J. T. (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(42), 44437.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşegül Akkoyunlu

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Biyoloji	Düzce Üniversitesi	2024
Y. Lisans	Biyoloji	Düzce Üniversitesi	2019
Y. Lisans(Tezsiz)	Biyoloji Öğretmenliği	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2011
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2007
Lise		Düzce Anadolu İmam Hatip Lisesi	2002

TEZDEN ÇIKAN YAYIN

- 1- Akkoyunlu, A., & Dülger, G. (2024). Exploring the antibiofilm effects on *Escherichia coli* biofilm associated with colon cancer and anticancer activities on HCT116 cell line of bee products. *Biofouling*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/08927014.2024.2338106>

DİĞER YAYINLAR

- 2- Akkoyunlu, A., & Dulger, G. (2019). Chemical composition of *Lamium purpureum* L. and determination of anticancer activity of its essential oil on melanoma. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(3), 1755-1763.
- 3- Akkoyunlu, A., & Dulger, G. (2022). Chemical Composition and *In vitro*

Antimicrobial, Antioxidant, and Antiproliferative Studies of the *Lamium galeobdolon* L.(L.) Essential Oil. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(6), 1240-1246.

- 4- The Antibiofilm, Anti-Quorum Sensing and Antioxidant Activities of *Calendula officinalis* L., *Hypericum perforatum* L. and *Trachystemon orientalis* (L.) G. Don Essential Oils. *Indian Journal of Experimental Biology*, (Accepted, Article Id: IJEB#478).

KONGRE

- 1- 11th International Zeugma Conference on Scientific Research, Antibiofilm and Antiquorum-Sensing Properties of *Artemisia absinthium* L. Mart 18-20, 2024/ Gaziantep, Türkiye.

PROJE DENEYİMİ

- 1- *Lamium purpureum* var. *purpureum* ve *Lamium galeobdolon* (L.)L. türlerinin esansiyel yağlarının antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen aktivitelerinin belirlenmesi, BAP-2019.04.01.900, Düzce Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü, Araştırmacı.
- 2- Düzce-Yığılca Bal Arılarından Elde Edilen Ürünlerin Apiterapötik Etkilerinin İncelenmesi, BAP-2021.04.01.1260, Düzce Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü, Araştırmacı.