



**T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAL, PROPOLİS VE ARI SÜTÜNÜN
ENCEPHALITOZON INTESINALIS ÜZERİNE
ETKİSİNİN *IN VITRO* ARAŞTIRILMASI**

DERYA GÜL GÜLPINAR

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

SİVAS-2024

T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAL, PROPOLİS VE ARI SÜTÜNÜN
ENCEPHALITOZON INTESTINALIS ÜZERİNE
ETKİSİNİN *IN VITRO* ARAŞTIRILMASI

DERYA GÜL GÜLPINAR

DOKTORA TEZİ

TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ZÜBEYDA AKIN POLAT
2. TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ülfet ÇETİNKAYA

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince danışmanlığımı üstlenen, konu seçiminden araştırmanın yürütülmesine kadar bütün aşamalarda yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan grur duyduğum ve bu günlere gelmemde büyük katkı sahibi sayın hocam Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT'a,

Tez çalışmalarım sürecinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, ayrıca çalışma için konak hücre hattı ve parazit suşunu temin eden ikinci danışman hocam sayın Doç. Dr. Ülfet ÇETİNKAYA'ya,

Tez çalışmalarım süresince yol gösterici katkıları, bilgi ve tecrübeleri ile daima yanımda olup bana her zaman kapılarını açan tez izleme komitesi üyeleri saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Ahmet Duran ATAŞ ve Prof. Dr. Cem ÇELİK'e,

Güler yüzü ve yardımlarıyla destek olan Elif AKYOL ve Resul Ekrem AKBULUT'a,

Çalışmada kullandığım arı ürünlerinin teminini sağlayan Eğriçayır Organik Arı Ürünleri Limited Şirketi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışmalarım süresince sabır göstererek beni destekleyen, her zaman moral ve güç veren sevgili eşime, anneliğin yaşattığı tüm zorluklara rağmen şükür sebebim kızıma ve bugünlere gelmemde çok emeği olan, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim başta canım anneme ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sivas
12.06.2024

Derya Gül GÜLPINAR

ÖZET

BAL, PROPOLIS VE ARI SÜTÜNÜN *ENCEPHALITOZOON INTESTINALIS* VE *VITTAFORMA CORNEAE* ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN VITRO* ARAŞTIRILMASI

Microsporidia türleri, çok çeşitli konakları enfekte eden ve dünya çapında sağlık ve ekonomik kayıplara neden olan, mantarlarla ilişkili ökaryotik hücre içi parazitlerdir. Konak hücreleri enfekte etmek için hareketsiz bir spor ve ultra yüksek hızlarda fırlatılan polar tüp adı verilen sıra dışı bir invazyon organeline sahiptir. Birçok Microsporidia türü, insan ve veteriner hekimliğinde etkileri olan ciddi hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis* ve *Enterocytozoon bieneusi* başlıca insan patojenleridir. Microsporidia enfeksiyonunun klinik belirtileri, asemptomatik enfeksiyondan ishal, miyozit, keratit ve bronşiti içeren semptomatik enfeksiyonlara kadar değişmektedir.

Bal, polen, arı sütü, bal mumu, propolis, arı zehiri gibi bileşenleri içeren arı ürünleri, doğal ve biyolojik aktif bileşenleri sayesinde özellikle antibakteriyel, antienflamatuar ve bağışıklık modüle edici özellikleri nedeniyle birçok hastalık türünü tedavi etmek için tarih boyunca geleneksel tedavi uygulamalarında kullanılmıştır. Son yıllarda, alternatif bir antiparaziter tedavi olarak umut verici doğal biyoaktif madde kaynağı olan arı ürünlerinin, farmakolojik ve kimyasal özelliklerinin araştırılmasına yoğun bir ilgi olmuştur.

Bu çalışmada, son yıllarda insan sağlığı açısından önemi artan Microsporidia türlerinden *E. intestinalis*'e karşı çiçek balı (ÇB), çam balı (ÇMB), kestane balı (KSB), propolis (PROP) ve arı sütünün (AS) etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan arı ürünlerinin kimyasal bileşenleri farklı yöntemlerle ile analiz edilmiştir. Bal ürünlerinin farklı konsantrasyonlarının, HEK-293 hücreleri üzerindeki sitotoksik potansiyeli XTT yöntemi ile değerlendirildikten sonra sitotoksik olmayan en yüksek üç konsantrasyonun *E. intestinalis* üzerine *in vitro* etkisi gerçek zamanlı PCR (qRt-PCR) ve thoma lamı sayım yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, *in vitro* modelde ÇB, PROP ve AS'nin *E. intestinalis*'e karşı güçlü antimicrosporidial etki gösterdiği tespit edilmiştir. Buna karşın, KSB ve ÇMB proliferatif etki göstermiştir. Bu durum, araştırmada kullanılan arı ürünlerinin

kimyasal içerikleri ile ilişkilendirilmiştir. Araştırma sürecinde, referans yöntem qRt-PCR olmakla birlikte thoma lamı ile sayım yönteminin birbirine göre avantaj ve dezavantajları olduğu gözlemlenmiş olup, bazı arı ürünleri ve konsantrasyonlarda farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Arı ürünlerinin *E. intestinalis* üzerine etkisinin değerlendirildiği bu ilk araştırma sonuçlarına göre, kullanılan arı ürünlerinden özellikle ÇB, PROP ve AS'nin potansiyel tıbbi ve farmasötik özellikleri nedeniyle antimicrosporidial ilaçların geliştirilmesinde alternatif bir seçenek olarak değerlendirilmesi gerektiği kanısındayız. Kesin etki mekanizmalarını aydınlatmak ve arı ürünlerinin prelinik ve klinik ortamlardaki microsporidial aktivitelerini değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Microsporidiosis; *Encephalitozoon intestinalis*; bal; propolis; arı sütü

ABSTRACT

IN VITRO STUDY OF THE EFFECT OF HONEY, PROPOLIS AND ROYAL JELLY ON *ENCEPHALITAZOON INTESTINALIS*

Microsporidia species are eukaryotic intracellular parasites associated with fungi that infect a wide variety of hosts and cause health and economic losses worldwide. They possess an immobilised spore and an unusual invasion organelle, the polar tube, which is launched at ultra-high speeds to infect host cells. Many microsporidian species play an important role in the development of serious diseases with implications for human and veterinary medicine. *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* are the most important human pathogens. Clinical signs of microsporidian infection range from asymptomatic to symptomatic, including diarrhoea, myositis, keratitis and bronchitis.

Bee products, including components such as honey, pollen, royal jelly, beeswax, propolis, bee venom, have been used in traditional therapeutic practices throughout history for the treatment of many types of diseases, in particular for their antibacterial, anti-inflammatory and immunomodulating properties, thanks to their natural and biologically active components. In recent years, there has been a great interest in studying the pharmacological and chemical properties of bee products, which are a promising source of natural bioactive substances as an alternative antiparasitic treatment.

In this study, the *in vitro* effects of floral honey (FH), pine honey (PH), chestnut honey (CHH), propolis (PROP) and royal jelly (RJ) were investigated against *E. intestinalis*, one of the microsporidian species that have become increasingly important for human health in recent years. The chemical components of the bee products used in the study were analysed by different methods. After evaluating the cytotoxic potential of different concentrations of honey products on HEK-293 cells using the XTT method, the *in vitro* effect of the three highest non-cytotoxic concentrations on *E. intestinalis* was evaluated using real-time PCR (qRt-PCR) and the Thoma slide counting method.

In conclusion, FH, PROP and RJ showed strong antimicrosporidial activity against *E. intestinalis* in the *in vitro* model. On the other hand, PH and CHH showed a proliferative effect. This was related to the chemical content of the bee products

used in the study. During the research process, it was observed that the reference methods qRt-PCR and Thoma slide counting had advantages and disadvantages compared to each other, and different results were obtained for some bee products and concentrations.

According to the results of this first study evaluating the effect of bee products on *E. intestinalis*, we conclude that the bee products used, especially FH, PROP and RJ should be considered as an alternative option in the development of antimicrosporidial drugs due to their potential medicinal and pharmaceutical properties. Further research is needed to elucidate the exact mechanisms of action and to evaluate the microsporidial activity of bee products in preclinical and clinical settings.

Key words: Microsporidiosis; *Encephalitozoon intestinalis*; honey; propolis; royal jelly

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR/SİMGELER.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Sınıflandırma ve Filogeni	2
2.2. Spor Morfolojisi.....	3
2.2.1. Spor Duvarı	4
2.2.2. Polar Tüp.....	6
2.2.3. Sporoplazma.....	6
2.3. Yaşam Döngüsü.....	7
2.4. Epidemiyoloji.....	10
2.5. Bulaş Yolları	13
2.5.1. Zoonotik Bulaş	13
2.5.2. Su Yolu ile Bulaş	14
2.5.3. Gıda Yolu ile Bulaş	15
2.5.4. Vertikal ve Horizontal Bulaş.....	15
2.6. İmmünoloji.....	15
2.7. Klinik Belirtiler.....	16
2.7.1. Encephalitozoonidae	17
2.8. Tanı	17
2.8.1. Işık Mikroskopisi	18
2.8.2. Elektron Mikroskopisi.....	21
2.8.3. Moleküler Teknikler.....	22

2.9.	Tedavi	23
2.10.	Korunma	24
2.11.	Arı Ürünleri.....	24
2.11.1.	Arı Ürünleri Çeşitlerinin Tanım ve Bileşenleri.....	25
	Bal	25
	Propolis	26
	Arı Sütü	26
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1.	Arı Ürünlerinin Elde Edilmesi.....	28
3.2.	Arı Ürünlerinin Analizi.....	28
3.2.1.	LC-HRMS Analizleri.....	28
3.2.2.	Kromatografi ve Yüksek Çözünürlüklü MS Koşulları	28
3.3.	Arı Ürünlerinin Sitotoksik Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	29
3.3.1.	Arı Ürünlerinin Konsantrasyonlarının Hazırlanması	29
3.3.2.	Hücre Serisi ve Kültürü.....	30
3.3.3.	Sitotoksikite Testi	31
3.4.	Arı Ürünlerinin <i>E. intestinalis</i> Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	33
3.4.1.	Sporların Eldesi.....	33
3.4.1.	Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	34
	qRt-PCR Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	34
	Konak Hücrelerin Enfekte Edilmesi ve Arı Ürünleri ile Muamele Edilmesi ..	34
	DNA İzolasyonu.....	34
	qRt-PCR Yönteminin Uygulanması.....	35
	Thoma Lamı ile Sayım Yöntemiyle Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	37
	Hücrelerin Enfekte Edilmesi ve Arı Ürünleri ile Muamele Edilmesi	37
	Thoma Lamı ile Sayım Yöntemi.....	37
	Arı Ürünlerinin Etkisini Mikroskopik Olarak Görselleştirme ve Boyama	39
3.5.	İstatistiksel Değerlendirme	39

4. BULGULAR	40
4.1. Arı Ürünlerinin Analizinin Değerlendirilmesi	40
4.1.1. ÇB, ÇMB ve KSB Ballarının Fenolik Bileşenleri	40
4.1.2. PROP'un Fenolik Bileşenleri	42
4.1.3. AS'nin Kimyasal Bileşimi	42
4.2. Arı Ürünlerinin Sitotoksik Potansiyeli	43
4.2.1. Bal Örneklerinin Sitotoksik Potansiyeli	43
4.2.2. PROP ve AS Örneklerinin Sitotoksik Potansiyelleri	45
4.3. Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	46
4.3.1. Bal Örneklerinin Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	49
qRt-PCR Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	49
Thoma Lamı Sayım Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	52
4.3.2. PROP Örneğinin Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	55
qRt-PCR Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	55
Thoma Lamı Sayım Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	57
4.3.3. AS Örneğinin Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	58
qRt-PCR Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	58
Thoma Lamı Sayım Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi	60
5. TARTIŞMA	62
6. KAYNAKLAR	84

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. ÇB, ÇMB ve KSB'nin Fenolik Bileşen İçerikleri.....	41
Tablo 2. PROP'un Fenolik Bileşen İçeriği.....	42
Tablo 3. AS'nin Kimyasal Bileşimi	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Microsporidia spor yapısı	4
Şekil 2. Microsporidia spor duvarının transmiyon elektron mikroskopu (TEM) görüntüsü.....	5
Şekil 3. Caco-2 hücre yüzeylerine bağlı <i>E. intestinalis</i> sporlarının transmiyon elektron mikroskobu görüntüsü	8
Şekil 4. Bir konak hücresinin Microsporidia ile invazyonunun modeli	10
Şekil 5. Dışkıda, idrarda ve diğer klinik örneklerde Microsporidia sporları.	20
Şekil 6. Microsporidiosisli hastalardan alınan biyopsi örneklerinin TEM görüntüsü	22
Şekil 7. Elüsyonda takip eden gradiyent koşulları.....	29
Şekil 8. Arı ürünlerinin sitotoksik potansiyelinin belirlenmesinde kullanılan XTT yönteminin aşamaları	32
Şekil 9. HEK-293 hücre hattında üretilmiş serbest <i>E. intestinalis</i> sporlarının (oklar) inverted mikroskoptaki filtresiz (A) ve mavi filtreli (B) görünümüleri (×40).....	33
Şekil 10. <i>E. intestinalis</i> 16S SSu rRNA gen bölgesinden hazırlanan plazmid DNA'sından hazırlanmış seri dilüsyonların qRt-PCR analiz sonuçları.....	36
Şekil 11. Thoma lamı ile sayım yönteminin aşamaları.....	38
Şekil 12. ÇB, ÇMB ve KSB'nin %20, %10, %5, %2.5, %1.25, %0.6, %0.3, %0.15, %0.075, %0.035 w/v konsantrasyonların XTT yöntemi ile HEK-293 hücreleri üzerine <i>in vitro</i> sitotoksitesi	44
Şekil 13. PROP (250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 µg/mL) (A) ve AS'nin (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.5, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09 mg/mL) (B) <i>in vitro</i> sitotoksitesi	45
Şekil 14. Arı ürünleri olmadan <i>E. intestinalis</i> yoğunluğunun (A) ve sadece HEK-293 hücrelerinin (B) on günlük inkübasyon dönemi sonrasında trikrom ile boyanmış görünümüleri.....	46
Şekil 15. ÇB, PROP ve AS'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarıyla muamele edilen <i>E. intestinalis</i> yükünün qRt-PCR sonuçları.....	47
Şekil 16. ÇMB ve KSB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarıyla muamele edilen <i>E. intestinalis</i> yükünün qRt-PCR sonuçları.....	48

Şekil 17. ÇB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyondan sonra <i>E. intestinalis</i> sporları üzerindeki <i>in vitro</i> etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi	49
Şekil 18. ÇMB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından <i>E. intestinalis</i> sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi	50
Şekil 19. KSB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından <i>E. intestinalis</i> sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi	51
Şekil 20. ÇB, ÇMB ve KSB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının <i>E. intestinalis</i> sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi ile elde edilen verilerin kontrole göre yüzde canlılık oranları, ortalama değer±Ss ve p değerleri	52
Şekil 21. ÇB (A), ÇMB (B) ve KSB'nin (C) araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından <i>E. intestinalis</i> sporları üzerindeki etkilerinin thoma sayım yöntemi ile değerlendirmesi	54
Şekil 22. ÇB, ÇMB ve KSB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının <i>E. intestinalis</i> sporları üzerindeki etkilerinin thoma lamı sayım yöntemi ile elde edilen verilerin kontrole göre yüzde canlılık oranları, ortalama değer±Ss verileri ve p değerleri.....	55
Şekil 23. PROP'un araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından <i>E. intestinalis</i> sporları üzerindeki <i>in vitro</i> etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi.	56
Şekil 24. PROP'un araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının <i>E. intestinalis</i> sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR ile elde edilen verilerin kontrole göre yüzde canlılık oranları, ortalama değer±Ss ve p değerleri	57
Şekil 25. PROP'un 62.5, 125, 250 µg/mL konsantrasyonlarında on günlük inkübasyondan sonra <i>E. intestinalis</i> sporları üzerine <i>in vitro</i> etkilerinin thoma lamı ile sayım yöntemi ile değerlendirmesi	58
Şekil 26. AS'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından <i>E. intestinalis</i> sporları üzerindeki <i>in vitro</i> etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi	59

Şekil 27. AS'nin, araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR ile elde edilen verilerin kontrole göre yüzde canlılık oranları, ortalama değer±Ss ve p değerleri. 60

Şekil 28. AS'nin 25, 12.5, 6.25 mg/mL konsantrasyonlarında on günlük inkübasyondan sonra *E. intestinalis* sporları üzerine *in vitro* etkilerinin thoma lamı ile sayım yöntemi ile değerlendirmesi 61



KISALTMALAR/SİMGELER

AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Yetmezlik Sendromu
AS	Arı sütü
°C	Santigrat derece
cART	Kombine antiretroviral tedavi
CO₂	Karbondioksit
ÇB	Çiçek balı
ÇMB	Çam balı
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EC₅₀	Max. etkisinin yarısını yapan ilaç konsantrasyonu
FBS	Fetal bovine serum
g	Gram
HEK-293	İnsan böbrek epitel hücresi
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HPLC-DAD	Diyot dizisi tespiti ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC₅₀	Yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu
IFN-γ	Gama interferon
Ig G	İmmünglobulin G
Ig M	İmmünglobulin M
IL	İnterlökin
kDa	Kilodalton
KSB	Kestane balı
LC-HRMS	Sıvı Kromatografisi-Yüksek Çözünürlük Kütle Spektrometrisi
mg	Miligram
mL	Mililitre
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

ppb	Milyarda bir
PROP	Propolis
PTP	Polar tüp proteini
qRt-PCR	Gerçek zamanlı PCR
RNA	Ribo nükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
ROS	Reaktif oksijen türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
sn	Saniye
spp.	Türler
Ss	standart sapma
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
w/v %	Hacimde kütlece %
XTT	2,3-bis(2-mthoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5- [(phenylamino)- carbonyl]-2H- tetrazolium hydroxide
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Microsporidiosis insanlarda çok çeşitli klinik sendromlarla ilişkili olarak ortaya çıkan fırsatçı bir enfeksiyondur (Anane & Attouchi, 2010). Microsporidia türleri, tek hücreli ve zorunlu hücre içi spor oluşturan ökaryotik parazitlerdir (Nageli, 1857). Ultrastrüktürel özelliklerine, gelişim döngülerine, konak-parazit ilişkilerine ve moleküler analizlerine göre sınıflandırılan yaklaşık 220 cins ve 1700 Microsporidia türü vardır. Filogenetik analizler, Microsporidianın mantarlarla ilişkili olduğunu, mantarların bazal dalı veya kardeş grubu olarak Cryptomycota ile gruplandırıldığını göstermektedir (Han et al., 2021).

İnsanları enfekte eden Microsporidia türlerinin hayvanlarda ve su kaynaklarında da tanımlanmış olması Microsporidianın zoonotik, gıda kaynaklı ve su kaynaklı bulaşması konusunda halk sağlığı endişelerini artırmaktadır (Deplazes et al., 2000). İnsanlarda enfeksiyon hem immün yetkin hem de immün yetmez konaklarda örneğin organ nakli olan hastalarda, ileri insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu olan hastalarda ve anti-tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi bağışıklık düzenleyici tedavisi alan hastalarda görülür. Nakledilen organlarda gizli enfeksiyona bağlı enfeksiyon kümeleri de gösterilmiştir. Gastrointestinal enfeksiyon en sık görülen bulgudur; bununla birlikte Microsporidia hemen hemen her organ sistemini enfekte edebilir; keratit, miyozit, kolesistit, sinüzit ve ensefalite neden olmuştur (Han et al., 2021). İnsanlarda microsporidiosisin tedavisi için en etkili ilaçlar şu anda *Encephalitozoon* türlerine karşı etkili ancak *Enterocytozoon bieneusi*'ye karşı etkili olmayan albendazol ve daha geniş anti-microsporidia aktivitesine sahip ancak memelilerde toksik olan fumagillini içermektedir (Didier et al., 2004).

Arı ürünleri kanser ve mikrobiyal bağlantılı hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalık türünü tedavi etmek için uzun süredir geleneksel tedavi uygulamalarında kullanılmaktadır. Arı ürünlerinde bulunan bazı kimyasal bileşiklerin antikanser, antibakteriyel, antiviral ve antiparaziter özellikler gösterdiği kanıtlanmıştır (Nainu et al., 2021). Son on yılda alternatif bir antiparaziter tedavi olarak umut verici doğal biyoaktif madde kaynağı olan arı ürünlerinin farmakolojik ve kimyasal özelliklerinin araştırılmasına yoğun bir ilgi olmuştur (Cauich-Kumul & Campos, 2019). Çalışmada amacımız daha önce araştırılmamış olan çiçek balı (ÇB),

çam balı (ÇMB), kestane balı (KSB), propolis (PROP) ve arı sütünün (AS) önemli ve hızlı gelişen fırsatçı bir hastalık olan *Encephalitozoon intestinalis* üzerine *in vitro* etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sınıflandırma ve Filogeni

"Microsporidia" terimi Protozoa alt aleminde yer alan Microspora filumuna ait organizmalar için yaygın olarak kullanılan taksonomik olmayan bir isimdir (Franzen & Müller, 1999). İlk Microsporidian 1857 yılında Nageli tarafından *Nosema bombycis* olarak adlandırılmış ve maya ve bakterileri içeren Schizomycetes ile gruplandırılmıştır (Nageli, 1857). Balbiani 1882 yılında Microsporidia takımını tanımlamıştır ve 1976'da Sprague Microsporidiayı zoolojik alem olan Protozoa içindeki Microspora filumuna ayırmıştır. Sprague 1998 yılında filumun adını Microsporidia olarak değiştirmiştir ve Cavalier-Smith ise Microsporidiayı Fungi alemine aktarmıştır (Didier et al., 2000).

Tek hücreli zorunlu hücre içi parazitlerden Microsporidialar daha önce "ilkel" erken dallanan protozoalar olduğu düşünülmektedir ancak yapılan çalışmalar ile bazal dal veya kardeş grup olarak mantarlara ait olduğu anlaşılmıştır (Ryan et al., 2019). Filogenetik çalışmalar, Microsporidianın mantar aleminin bazal bir dalı olarak Cryptomycota ile birlikte sınıflandırılması gerektiğini göstermektedir. Cryptomycota, çevresel mikrobiyom çalışmaları ile tanımlanmıştır ve biyolojik düzeyde yeterince tanımlanmasa da Microsporidia ile yakından ilişkilidir (Jones et al., 2011).

Microsporidia klasik olarak polar tüplerinin sarmal sayısını, sporlarının boyutunu, şeklini ve morfolojisini, gelişimsel yaşam döngüsünün özelliklerini ve konak-parazit ilişkilerini içeren ultrastrüktürel özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır (Matos et al., 2012). Microsporida şubesi yaklaşık olarak 220 cinse dağılmış en az 1.700 tür içermektedir ve bunlardan insanlarda hastalığa neden olan cinsler *Nosema*, *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Brachiola Anncaliia*, *Tubulinosema*, *Endoreticulatus* ve *Microsporidium* (Han et al., 2021).

İnsandan izole edilen *E. intestinalis*'in taksonomisi aşağıdaki şekildedir (Franzen & Müller, 1999; Gransden, 1999):

Alem: Mantarlar

Şube: Microsporidia
Sınıf: Haplophasea
Takım: Glugeida
Aile: Encephalitozoonidae
Cins: *Encephalitozoon*
Tür: *E. intestinalis*

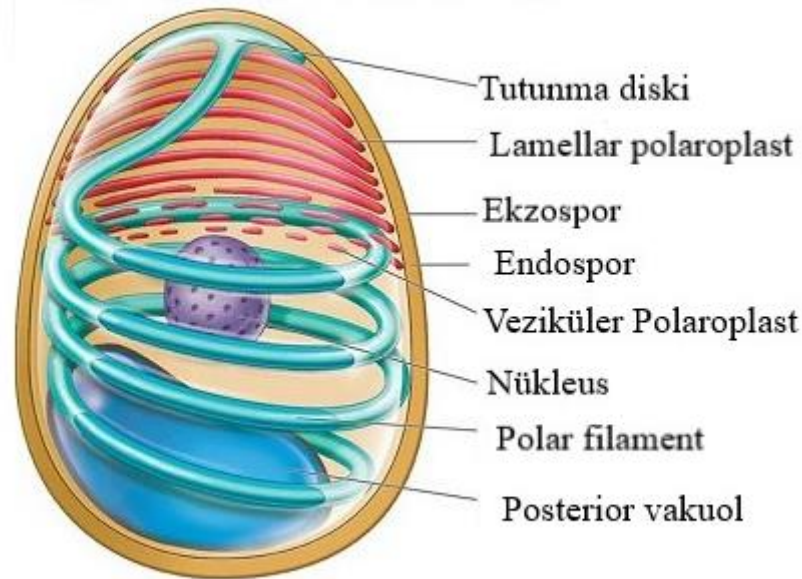
2.2. Spor Morfolojisi

Microsporidiaların enfektif aşaması spordur ve memelileri enfekte eden türlerin sporları küçük ve oval şekilli olup yaklaşık $1.0-3.0 \times 1.5-4.0$ µm boyutlarındadır (Vávra & Ronny Larsson, 2014). Sporum genel yapısı ilk olarak 1894 yılında Thelohan tarafından gözlemlenmiştir (Thelohan, 1894). Spor duvarı, sporun ön ucunda daha incedir ve elektron geçirgen bir endospor, elektron yoğun bir ekzospor ve plazma zarından oluşur. Sporoplazma, ribozomlar, posterior vakuol ve tek bir çekirdek içerir. Sporum ön ucundaki sabitleme diski, polar tüpün bağlanma yeridir. Polar tüpün çimlenmeden önce spor içinde olduğu zaman genellikle polar filament olarak adlandırıldığına dikkat edilmelidir. Sabitleme diskine bağlanan polar tüpün ön veya düz bölgesi “manubroid” olarak adlandırılır ve tüpün posterior bölgesi sporoplazmayı sarar. Bobinlerin sayısı ve düzenlenmesi (yani, tek sıra veya çok sıra), microsporidian taksonomik sınıflandırmada kullanılır. Lamellar polaroplast ve veziküler polaroplast, polar tüpün manubroid bölgesini çevreler (Şekil 1) (Han et al., 2022).

Microsporidia sporları dış ortama nispeten dirençlidir ve glikoproteinden oluşan dış elektron yoğun bir ekzospor, kitinden oluşan elektron-saydam bir endospor ve bir iç plazma zarı ile çevrelenmiştir. Microsporidialardaki çekirdek ya *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora* ve *Trachipleistophora* türlerinde görüldüğü gibi monokaryon (tek çekirdek) ya da *Brachiola*, *Nosema* ve *Vittaforma* türlerinde görüldüğü gibi diplokaryon (tek bir birim olarak işlev gören iki bitişik çekirdek) olarak bulunmaktadır. Olgun Microsporidia sporları belirgin bir posterior vakuol içerir ve anterior bölgede, polaroplast adı verilen bir ankraj diski ve atipik golgi aparatı içerir. Polar filament Microsporidianın benzersiz bir yapısıdır ve

memeli Microsporidia sporunun orta-arka bölgesinde sabitleme diskinden çıkan ve kıvrılan içi boş bir tüptür (Keohane & Weiss, 1999)

Microsporidia spor duvarı, polar tüp ve bulaşıcı sporoplazmayı içeren benzersiz, oldukça uzmanlaşmış bir invazyon süreci ile konak hücreleri enfekte eder. Enfektif sporoplazmanın duyarlı bir konak hücreye aktarılmasıyla sonuçlanan bu çimlenme olayı, sporu aktive etmek için gerekli çevresel değişiklikleri içeren bir dizi karmaşık olayı gerektirir (Leitch & Ceballos, 2008). Ozmotik basınç ya da pH'daki bir değişiklik, posterior vakuol ve polaroplast su alımı nedeniyle şişer ve spor içeriğini dışarı çıkan polar filament boyunca iterek çimlenmeyi tetiklemek için basınç uygular (Keohane & Weiss, 1999).

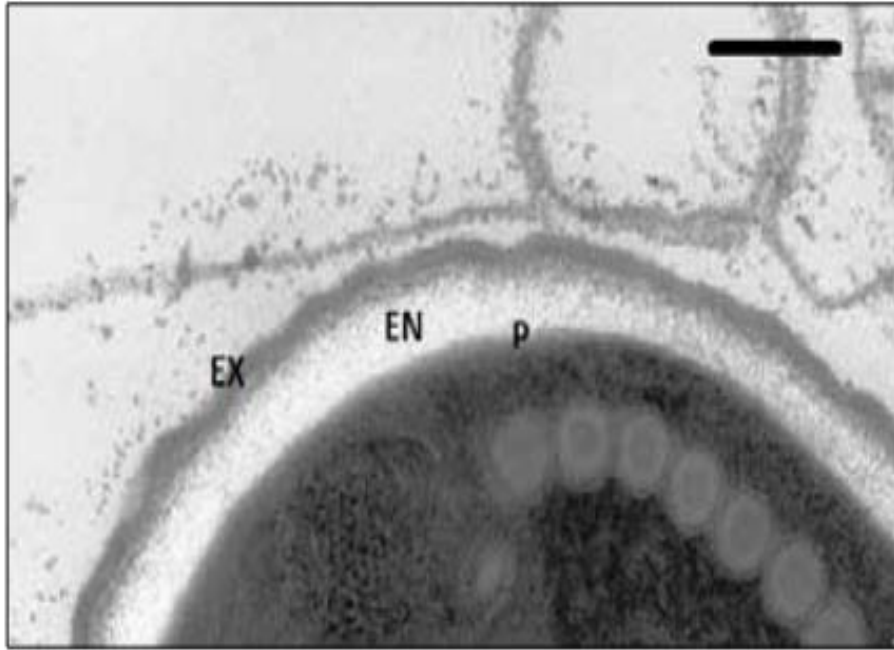


Şekil 1. Microsporidia spor yapısı

2.2.1. Spor Duvarı

Spor duvarı üç katman içermektedir: elektron yoğun ve proteinli bir ekzospor, elektron saydam bir endospor ve altta yatan bir plazma zarı (Şekil 2) (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008). Bu spor duvarı sporun morfolojisini koruduğu gibi sporu konağa invaze olana kadar zorlu çevre koşullarına karşı korumaklarda görevlidir (SHADDUCK & POLLEY, 1978). Spor duvarında kitinin yanı sıra çok sayıda spor

duvarı proteini içerdiği gösterilmiştir (Vávra & Ronny Larsson, 2014). Ek olarak spor duvarı sporu çevreden korumanın yanı sıra çevre ve konak hücre ile etkileşime girer ve polar tüp çimlenmesini aktive etme sürecine dahil olur (Yang et al., 2018). Ekzospora lokalize olan spor duvarı proteinleri doğrudan konak hücrelere ve çevreye maruz kalır. Bu spor duvarı proteinleri büyük olasılıkla konak hücreye bağlanma, sinyalizasyon veya enzimatik etkileşim süreçlerinde yer almaktadır (Southern et al., 2007). Örneğin, bazı spor duvarı proteinlerinin müsin ve proteoglikanlara bağlandığı gösterilmiştir (Southern et al., 2007), bu da sporların gastrointestinal sistemdeki müsin tabakasına bağlanmasını sağlayabilir ve çimlenme sırasında polar tüp tarafından bağırsak epitel hücrelerinin istilasını kolaylaştırabilir (Weiss & Becnel, 2014). Endosporal spor duvarı proteinleri ise büyük olasılıkla endospor oluşumu, polar tüp etkileşimi ve spor çimlenmesi süreçlerinde de yer almaktadır. Spor duvarının bileşimi üzerine yapılan çeşitli çalışmalara göre hem ekzospor da hem de endospor da birden fazla spor duvarı proteini mevcuttur (Han et al., 2020). Kitin endosporun ana bileşenidir ve kitinin endospor boyunca köprüler oluşturan fibrillerin ana bileşeni olduğu ve spor hücresi yapısını ve işlevini sürdürmek için gerekli olan ekzosporların fibriler sisteminin bir parçası olduğu bildirilmiştir (Han & Weiss, 2018).



Şekil 2. Microsporidia spor duvarının transmiyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü. Bar 250 nm (YAMAN et al., 2015).

2.2.2. Polar Tüp

Tüm Microsporidia sporlarının içinde kıvrılan ve sporun ön ucundaki mantar şeklindeki sabitleme diskinde bağlanan polar filamentten oluşan benzersiz, son derece uzmanlaşmış bir invazyon aparatına sahiptir (Vávra & Ronny Larsson, 2014). Uygun çevresel uyarım üzerine polar tüp hızla spordan çıkar, çekirdek ve sporoplazmanın konak hücreye geçişi için bir kanal görevi görür ve tüm süreç 2 saniyeden az sürmektedir (Frixione et al., 1992). Polar tüpün bileşimi üzerine günümüze kadar yürütülen çalışmalarda beş farklı polar tüp proteini tanımlanmıştır (Weiss & Becnel, 2014). Polar tüpün varlığının ışık mikroskopuyla ilk kez rapor edilmesinin üzerinden 125 yıldan fazla (Thelohan, 1894) ve sporun içindeki polar filamenti görüntülemek için elektron mikroskopunun ilk kez kullanılmasının üzerinden 50 yıldan fazla bir süre geçmesine rağmen (Huger, 1960) bu yapı, protein bileşimi, polar tüp ekstrüzyon mekanizması ve tüp içinde sporoplazma taşınması hala gizemini korumaktadır (Han et al., 2020).

2.2.3. Sporoplazma

Konak hücrelerin Microsporidia tarafından enfeksiyonu sırasında enfeksiyöz sporoplazma sporlardan polar tüp aracılığıyla taşınır ve bu da enfeksiyonun bulaşmasına neden olur (Vávra & Ronny Larsson, 2014). Bu işlem sırasında sporoplazma polar tüpden akar, polar tüpün distal ucunda bir damlacık olarak görünür ve birkaç dakika boyunca polar tüpe bağlı kalır (Han et al., 2017). Sporoplazmanın invazyon sırasında invazyon sinapsının korunan ortamı içindeki konak hücre ile etkileşime girmesi muhtemeldir. Bir sporoplazmanın konak hücreye girişinden sonra merontları (proliferatif formlar), sporontları, sporoblastları içeren bir üreme döngüsü başlatır ve olgun sporlarla sonlanır (B. Han & L. Weiss, 2017). Sporoplazma, spor çimlenmesi ve konak hücre invazyonu boyunca polar tüp ile sıkı bir şekilde ilişkilidir (Cali & Takvorian, 2014). Sporoplazma ozmotik strese karşı çok hassastır ve invazyon sinapsının oluşumu muhtemelen polar tüpten çıktığında hayatta kalması için kritik öneme sahiptir (Han et al., 2017).

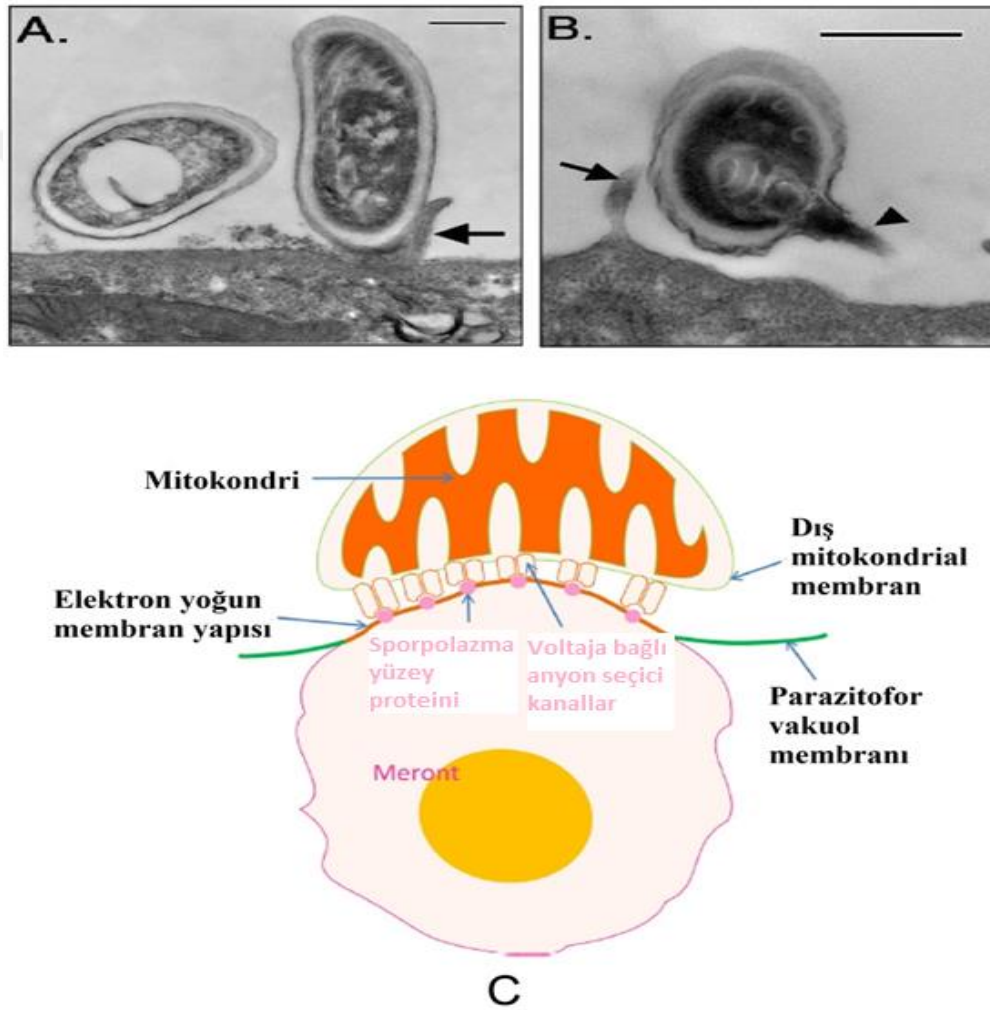
Microsporidial sporoplazmanın saflaştırılması çok zor olmuştur ve şu ana kadar sporoplazma plazma membranında yalnızca birkaç protein karakterize edilmiştir (He et al., 2019). Microsporidia yaklaşık 3000 protein kodlayan gen içeren

oldukça azaltılmış bir genoma sahiptir, fonksiyonel mitokondriden yoksundur ve glikoliz dışında ATP üretimi için gerekli genlerin neredeyse tamamından yoksundur, bu nedenle parazit yüzeyinde ifade edilen bu nükleotit taşıma proteinlerin kritik olduğu düşünülmektedir (Dean et al., 2016). Başlangıçta Microsporidianın mitokondriye sahip olmadığına inanılırken, mitokondriyal genomunu ve ATP üretimi kapasitesini kaybetmiş, mitozom adı verilen oldukça indirgenmiş bir mitokondriye sahip oldukları keşfedilmiştir. Mitozomlar, Microsporidia, Diplomonads, Amoebozoa ve Apicomplexa gibi çeşitli parazit türlerinde bulunan çift membranla sınırlı organellerdir (Goldberg et al., 2008). Mitokondri ile karşılaştırıldığında mitozomlar morfolojik olarak daha küçüktür, kristalardan ve kendi DNA'sından yoksundur (Tachezy, 2019). Microsporidian mitozomlar enerji üretimi için glikolizi kullanabilmelerine rağmen oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretme kapasitelerini kaybetmişlerdir, ancak bu yol sporlarda aktif olmasına rağmen, hücre içi büyüme ve konak sitozolün içindeki replikasyon aşamasında aktif olmadığı görülmektedir. Microsporidia enerji üretimi için glikolizi kullanabilir, ancak bu yol sporlarda aktif olmasına rağmen hücre içi büyüme ve konak sitozolu içindeki replikasyon aşamasında aktif görünmemektedir (Weiss & Becnel, 2014). Bu nedenle Microsporidia enerji için konak hücrelerine bağımlıdır ve mitokondri Microsporidia çevresinde birikir. Mitokondri ve Microsporidia ilişkisinin moleküler mekanizması hala bilinmemektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada sporoplazmanın yüzeyinde eksprese edilen bir protein olan *Encephalitozoon hellem* sporoplazma yüzey proteini 1'in Microsporidianın konak hücre mitokondri ile etkileşiminde rol oynadığı ortaya çıkarmıştır (Han et al., 2019).

2.3. Yaşam Döngüsü

Konak hücrelerin Microsporidia ile enfeksiyonu, polar tüpün hızlı bir şekilde ekstrüzyonunu ve sporoplazmanın konak hücreye transferini içermektedir. Genel olarak, Microsporidian sporların konak hücrelere veya konak hücrelerin yakınına yapışması enfeksiyon sürecinin ilk basamağıdır (Han et al., 2017). Spor duvarı, proteinleri muhtemelen Microsporidia ve konak hücrelerin etkileşimi sırasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Southern et al., 2007). Heparin bağlama motifine ve konak hücre yüzeyi sülfatlanmış glikozaminoglikanlara bağlanarak konak hücrelerle

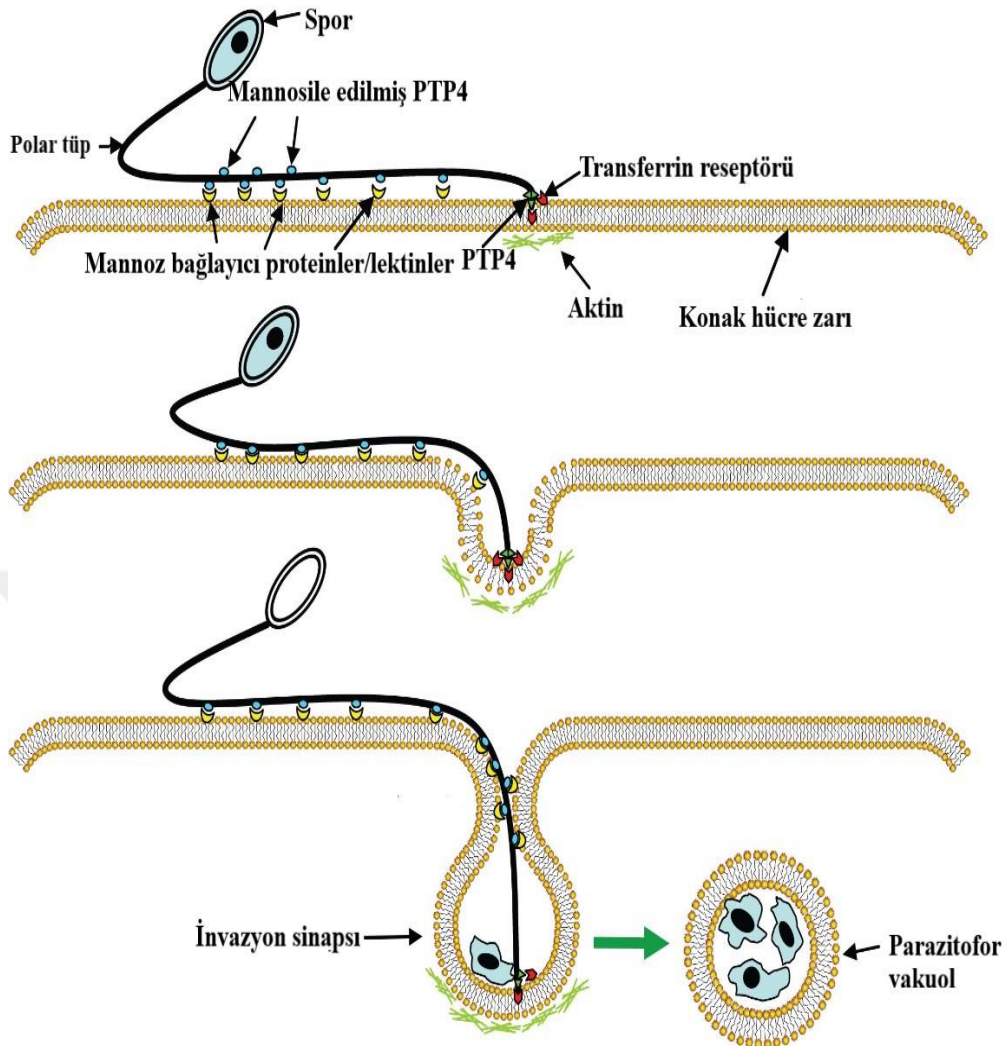
etkileşime girebilen çeşitli spor duvarı proteineri *N. bombycis*, *Encephalitozoon spp.* ve *Antonosporea locustae*'de tanımlanmıştır (Hayman et al., 2005). Sporların konak hücrelere yapışması sırasında heparin bağlama motifinin glikozaminoglikanlarla etkileşiminin yanı sıra, konak hücre integrinin *E. intestinalis*'in konak hücrelere yapışması ve enfeksiyonda da rol oynadığını bildirilmiştir (Leonard & Hayman, 2017). Bu spor yapışmasının çimlenme ve sonrasında konak hücrelerin istilasında önemli olduğu bildirilmiştir (Şekil 3) (Han et al., 2020).



Şekil 3. Caco-2 hücre yüzeylerine bağlı *E. intestinalis* sporlarının transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü. Eklenen sporların hücre yüzeyi veya mikrovilluslarla (ok) doğrudan temas halinde olduğu ve sağlam ekstrüde edilmemiş polar filamentlere veya ekstrüde edilmiş polar tüplere (ok ucu) sahip olduğu görülmektedir (A.,B.) (Bar 500 nm). Mitokondrinin, mitokondri zarı üzerindeki voltaja bağlı anyon seçici kanalların merontların yüzeyindeki spor duvarı proteinleri ile etkileşimi yoluyla parazitofor vakuol ile bağlanmasının modeli (C) (Han et al., 2019; Hayman et al., 2005).

Microsporidia enfeksiyonu sırasında polar t p ve sporoplazmanın konak hücre ile etkileşimini tam olarak anlaşılamamıştır. Polar tüpün çimlenmesinden sonra polar t p proteini konak hücre yüzeyindeki mannoz bağlama reseptörleri ile etkileşime girerek polar tüpü konak hücreye bağlar (Xu et al., 2004). Polar t p proteini 1 (PTP1), konak yüzeyindeki mannoz bağlayıcı proteinler ile etkileşime girerek polar tüpü konak yüzeyine yapıştırarak polar tüpü konak hücre zarına iter ve bir invazyon sinapsı oluşturmasına olanak sağlar (Han et al., 2017). PTP1'in (ve muhtemelen PTP4' n) invazyon sinapsındaki konak hücre zarı ile etkileşimleri ekstrüde edilmiş microsporidian sporoplazma için korumalı bir mikro ortam oluşturarak dış ortamı invazyon sinapsından ayrı tutar (Han et al., 2019). Bu korumalı ortamda sporoplazma polar tüpten çıkar, polar tüpün konak hücre zarına nüfuz ederek sporoplazmayı konak sitozolüne mi taşıdığı yoksa sporoplazmanın bu invazyon sinapsı içinde doğrudan konak hücreye nüfuz ettiği bilinmemektedir. PT'nin ucundaki polar t p proteini 4 (PTP4) epitopları, transferrin reseptörü 1 veya konak hücre yüzeyindeki diğer konak hücre etkileşimli proteinler ile etkileşime girerek kltrin aracılı endositoz gibi sinyal olaylarını tetikler ve konak hücre aktinini parazitofor vakuol oluşumu ile son istila olayına dahil eder (şekil 4) (Han et al., 2020).

Sporoplazma konak hücre sitoplazmasına girdikten ya da taşındıktan sonra, merogoni yoluyla yoğun çoğalmanın görüldüğü yaşam döngüsünün proliferatif evresi başlar. Bu gelişim aşamasının konak hücre içindeki konumu cinse göre değişmektedir. *Encephalitozoon* türlerinde konak tarafından üretilen tek bir zarla kaplı parazitofor vakuol içinde gerçekleşmektedir (Cali et al., 2014). Replikasyondan sonra birçok Microsporidia enfekte olmuş hücrenin lizizi ve/veya apoptozu ile konak hücreden çıkar, ancak hücre kültüründe ve bazı hayvan modellerinde bu patojenlerin hücreden hücreye yayıldığını düşündüren bitişik enfeksiyon odakları görülebilmektedir (Weiss & Becnel, 2014).



Şekil 4. Bir konak hücresinin Microsporidia ile invazyonunun modeli (Han et al., 2017).

2.4. Epidemiyoloji

Microsporidia insanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli hayvanları enfekte eder ve sporlar çevreye yayılarak insanların maruz kalma olasılığını artırır. Microsporidia sporları, genellikle yüzey sularında bulunur ve insan patojeni Microsporidia: su kaynaklarında (Izquierdo et al., 2011), hastane atıklarında (Jiang et al., 2020), üçüncül kanalizasyon atıklarında ve yeraltı sularında (Dowd et al., 2003) bulunmuştur. Antarktika hariç tüm kıtalardan Microsporidiaya bağlı insan enfeksiyonları tanımlanmış ve Afrika, Asya, Avrupa, Avustralya, Kuzey Amerika, Orta Amerika ve Güney Amerika'dan alınan dışkı örneklerinin hepsinin Microsporidia içerdiği rapor edilmiştir (Weiss & Becnel, 2014).

Edinilmiş Başısklık Yetmezlik Sendromu (AIDS) pandemisinden önce insanlarda Microsporidia nadiren tanımlanmıştır (Kotler & Orenstein, 1999). Microsporidia ile enfekte bir insanın ilk doğrulanmış kaydı 1959'da Japonya'da konvülsiyonlu bir erkek çocukta *Encephalitozoon* sp. tespit edilmiştir (Matsubayashi et al., 1959). Bundan önce 1927'de yeni doğan bir bebekte *Encephalitozoon chagasi*'ye atfedilen bir vaka raporu sunulmuştur ancak bu organizmanın doğru bir şekilde tanımlanıp tanımlanmadığı net değildir (Torres, 1927). Bir başka erken, microsporidiosis vakası 1937'de ölümcül ensefalomiyelit ve koryoretinit ile başvuran 4 haftalık bir çocukta bildirilmiştir (Wolf, 1937).

AIDS pandemisinden önce insan popülasyonlarında microsporidiosis için yaygınlık verileri esas olarak *Encephalitozoon cuniculi*'ye karşı antikorların saptanmasına dayanan serolojiye dayanmaktaydı. Bildirilen dünya çapındaki seroprevalans oranları %0 ile %42 arasında değişmektedir (Canning & Lom, 1986). Singh ve ark. İngiltere'de sağlıklı yetişkinlerin %8.7'sinde (n=69), Filariasisli Malezyalıların %18.5'inde (n=70), tüberkülozlu Nijeryalıların %42'sinde (n=89) ve sıtmal Ganalıların %36'sında (n=92) pozitif titreler bulmuştur (Singh et al., 1982). Başka bir çalışmada seyahat etmeyenlerin hiçbirinde (n=48) seropozitif bulunmazken, tropiklerden dönen gezginlerin (n=115) %12'si (n=115) seropozitif olarak bulunmuştur (Organization, 1983). Farklı bir çalışmada HIV pozitif erkeklerin (n=30) %33'ü seropozitif olarak saptanmakla birlikte bireylerin %100'ü tropik bölgelere seyahat etmiştir (Bergquist et al., 1984). *E. intestinalis*'e karşı antikorlar hamile Fransız kadınların %5'inde ve Hollandalı kan bağışçılarının %8'inde görülmüştür (Gool et al., 1997). HIV pozitif Çek hastalarında yapılan bir çalışmada, %5.3'ü *E. cuniculi*'ye ve %1.3'ü *E. hellem*'e karşı seropozitif olarak bildirilmiştir (Pospisilova et al., 1997). Slovakya'da yapılan bir çalışmada mezbahe çalışanlarının %5.1'i Encephalitozoonidae'ye karşı seropozitif olarak tespit edilmiştir (Cislakova et al., 1997). Bu çeşitli serolojik çalışmalar bir grup olarak ele alındığında Microsporidiaya maruz kalmanın yaygın olduğunu ve bu maruziyetin sıklıkla asemptomatik bir enfeksiyonla sonuçlandığını düşündürmektedir (Han et al., 2021).

AIDS pandemisinin yayılmasıyla insanlarda artan Microsporidia enfeksiyon vakaları bildirilmiştir. Bunların çoğu, *E. bienersi* veya *E. intestinalis*'e bağılı olarak gözlemlenmiştir. 1998'den önce HIV ile enfekte hastalarda yürütölen çalışmalarda

bildirilen prevalans oranları ve kombine antiretroviral tedavinin (cART) yaygın kullanımı çalışılan popülasyonun semptomlarına ve hastanın semptomlarına bağlı olarak %2 ile %70 arasında değişen bir gastrointestinal microsporidiosis prevalansı ve kullanılan tanı teknikleri göstermiştir (Weiss & Becnel, 2014). Bu erken çalışmalar birleştirildiğinde hastalarda Microsporidial enfeksiyonun genel prevalansının %15 olduğu ve kronik diyare ve ilerlemiş AIDS durumunda *E. bienewisi* enfeksiyonu prevalansının %30 olduğu tahmin edilmiştir. HIV ile enfekte bireylerde Microsporidia, Cryptosporidium ve Isospora enfeksiyonlarını inceleyen 131 çalışmanın 2018 yılındaki daha yakın tarihli bir meta-analizi rastgele etkiler modelini kullanarak insan gastrointestinal microsporidiosis için birleştirilmiş prevalansı %11.8 (güven aralığı %10.1 ila %13.4) bulunmuştur. Yüksek gelirli ülkelerde daha düşük bir enfeksiyon prevalansı bulunurken, özellikle Sahra altı Afrika'da düşük gelirli ülkelere daha yüksek prevalans bulunmuştur (Wang et al., 2018). On yıllık bir çalışmada, Microsporidia prevalansı HIV pozitif hastalardan alınan örneklerde (%13.9) HIV negatif hastalardan alınan örneklere göre (%8.5) (143) ve Microsporidia pozitif olan çocukların yüzdesi (%18.8) yetişkinlerinkinden (%10.2) önemli ölçüde yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Lobo et al., 2012). 2019'da Meksika'da yapılan bir araştırmada ishalleri HIV hastalarının %67'sinde microsporidiosis olduğu bulunmuştur. Arjantin'de 2019'da yapılan bir araştırmada kronik ishalleri olan HIV hastalarının %12.6'sında endoskopi ve dışkı muayenesi ile microsporidiosis olduğu bulunmuştur (Velásquez et al., 2019). 2018 yılında Malavi'de HIV pozitif çocuklarda yapılan bir çalışmada microsporidiosis'in temel prevalansının cART'a başlamadan önce %37 olduğu ve bu prevalansın cART başladıktan sonra düştüğü tespit edilmiştir (Huibers et al., 2018). cART'ın microsporidiosis'in tedavisini hızlandırabileceği birçok çalışmadan açıkça görülse de literatür özellikle CD4 sayısı düşük kalırsa cART'a rağmen microsporidiosis'in hala bir problem olabileceğine dair birçok rapor içermektedir (Han et al., 2021). Fransa'da 2012 yılında yapılan bir çalışmada ishalleri, CD4 sayısı düşük olan ve cART kullanan HIV hastalarının %8'inde Microsporidia bulunmuştur (Pavie et al., 2012). 2017'de Çin'de yapılan bir çalışmada HIV pozitif hastalarında Microsporidia prevalansının %11.7 olduğu tespit edilmiştir ve bu hastaların yarısının cART kullandığı bildirilmiştir (Liu et al., 2017). 2016 yılında Kamerun'da yapılan bir

araştırmada ise cART alan HIV hastalarında Microsporidia prevalansının %24.5 olduğu tespit edilmiştir (Nsagha et al., 2015).

Tropik ülkelere seyahat edenler (%3.3-%10), ishali olan ve olmayan çocuklar (%1.7-%17.4) ve yaşlılar (%17.2) dahil olmak üzere HIV'siz hastalarda microsporidiosis bildirilmiştir (Han et al., 2021). Malezya'da okula giden çocuklar üzerinde yapılan bir araştırma %27'lik bir oran tespit edilmiştir. (Lobo et al., 2012). Ayrıca sporların bulaşmasıyla birlikte gizli enfeksiyonun immün yetkin bireylerde yaygın olduğu gözlenmiştir (Sak et al., 2011). İmmün yetkin konaklarda rapor edilen microsporidiosis vakalarının çoğu kendi kendini sınırlayan diyare olarak ortaya çıkarken, Asya'dan keratokonjonktivit olarak ortaya çıkan *V. cornea* ile oküler enfeksiyonlara ilişkin birçok rapor vardır (Das et al., 2012; Sharma et al., 2011). Sağlıklı bireylerde Microsporidia görülme sıklığı çevrede Microsporidiaya yüksek oranda maruz kalındığını göstermektedir (Mumcuoglu et al., 2016).

2.5. Bulaş Yolları

Zorunlu bir hücre içi parazit olan Microsporidia tüm büyük hayvan grupları ve insanlar dahil olmak üzere çok çeşitli konakları enfekte edebilmekle birlikte insanlara enfeksiyonunun bulaşma şekli ve kaynağı tam olarak aydınlatılamamıştır (Mathis et al., 2005). İnsanlarda microsporidiosis büyük olasılıkla zoonotik bir enfeksiyondur. İnsanları enfekte eden Microsporidia türleri vahşi hayvanlarda, evcil hayvanlarda ve gıda üreten çiftlik hayvanlarında bulunmuştur (Didier, 2005). Enfeksiyonun bulaşma yolları arasında kontamine yiyecek ve su, fekal-oral kontaminasyon, kontamine aerosollerin solunması, açık yaralara inokülasyon, göze inokülasyon ve cinsel yolla bulaşma yer almaktadır. *E. hellem* hastaların solunum mukozasında, prostatta ve ürogenital yollarında gösterilmiş olup, insanlarda solunum ve cinsel yolla bulaşmanın mümkün olduğunu göstermektedir (Anane & Attouchi, 2010).

2.5.1. Zoonotik Bulaş

İnsanları enfekte edebilen birçok Microsporidia türü geniş bir hayvan yelpazesini enfekte edebilmektedir ve bu da zoonotik bulaşmanın muhtemel olduğunu desteklemektedir. *E. cuniculi* ile enfekte köpek yavrularına maruz kaldıktan sonra enfekte olan bir çocukta ve enfekte kobaylara maruz kaldıktan sonra

E. bieneusi ile enfekte olan 2 yaşındaki bir çocukta doğrudan zoonotik bulaşma kanıtı bildirilmiştir (Cama et al., 2007; Innes & Stewart, 1991). İnsanları enfekte eden türler özellikle *E. bieneusi* ve *Encephalitozoon* spp., köpekler, domuzlar, eşekler, kediler, keçiler, tavşanlar ve sığırlar dahil olmak üzere çok çeşitli memeli konaklardan oldukları belirlenmiştir (Anane & Attouchi, 2010).

Kent güvercinleri üzerinde yapılan çalışmalar, *E. intestinalis* ve *E. hellem* için park güvercinleri ve insanlar arasında Microsporidia bulaşmasına herhangi bir engel olmadığını ortaya koymuştur. Bu durum, Microsporidia'nın kuşlar ve insanlar arasında potansiyel zoonotik geçişini düşündürmektedir. Şehir parklarını ziyaret etmek çocuklarda ve yaşlılarda microsporidiosis için yüksek risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Haro et al., 2005). Encephalitozoonidae familyası çok sayıda memeli ve kuş türünde görülmektedir ve bazı raporlarda insan enfeksiyonunun başlangıcı kümes hayvanları, muhabbet kuşları ve çiftlik hayvanlarına maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir. *Nosema* ve *Vittaforma* cinslerinin neden olduğu enfeksiyonların böcek patojenlerinin çevresel sporlarının korneaya bulaşmasından dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir (Mathis et al., 2005). Tüm Microsporidia türleri için zoonotik bulaş kanıtlanmamış olsa da enfekte vahşilerle, evcil ve ev hayvanlarıyla yakın temas olduğunda ayrıca Microsporidia ile kontamine olmuş su, yiyecek veya aerosollere maruz kalma ile enfeksiyon riskinin olduğu görülmektedir (Anane & Attouchi, 2010).

2.5.2. Su Yolu ile Bulaş

Su yoluyla bulaş, bağırsak hastalıkları için önemli bir risk faktörü olduğundan dolayı dünya çapında önemli morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır (Cissé, 2019). Microsporidian sporlarının çeşitli özellikleri su yoluyla bulaşmanın microsporidiosis için önemli olma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Microsporidian sporlarının suda uzun süre hayatta kaldıkları rapor edilmiştir ve sporların küçük boyutlu olması filtreleme işlemlerini daha az verimli hale getirmektedir ve dozun nispeten düşük olduğu gösterilmiştir (Franzen & Müller, 1999). Microsporidia sporları enfekte hayvanların dışkılarından, idrarından ve hayvan cesetlerinden etrafa salınır ve su kaynaklarına dağılarak içme ve dinlenme sularını kirletebilir (Moss & Snyder, 2017). *E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *V. corneae* ve *Pleistophora* sp. gibi insan enfeksiyonlarında görülen Microsporidianın varlığı

üçüncül kanalizasyon atıklarında, yüzey sularında ve yeraltı sularında rapor edilmiştir (Izquierdo et al., 2011). *E. hellem* ve *E. intestinalis*'in her ikisinin de su kuşları dışkısı ile kontamine olmuş yüzey sularında bulunduğu gösterilmiştir (Slodkiewicz-Kowalska et al., 2006).

2.5.3. Gıda Yolu ile Bulaş

Microsporidia gıda temininin küreselleşmesi, gıdanın daha hızlı taşınması, gıda tüketim düzenlerindeki değişiklikler ve artan tüketici seyahati nedeniyle gıda kaynaklı bulaşma için endişe duyulan patojenler arasındadır (Orlandi et al., 2002). Microsporidiosis bulaşması kabuklular (örn. istiridye, ıstakoz, karides) ve balık tüketimini içeren küresel gıda zinciri endüstrisi nedeniyle meydana gelebilmektedir (Cissé, 2019). Çiğ veya az pişmiş et veya yıkanmamış sebze ve meyveler yemek microsporidiosis ile ilişkilendirilmiştir. Çiğ sebze tüketen kişilerde Microsporidia enfeksiyonunda pişmiş sebze tüketenlere göre 2 kat artış görülmüştür (Shahrul Anuar et al., 2013). Tarım pazarlarında yapılan bir çalışmada kişniş, maydanoz, marul, böğürtlen ve çilekte Microsporidia tespit edilmiştir (Calvo et al., 2004). 2018'de yapılan bir araştırma kontamine su kaynaklarıyla sulanan çiftliklerden alınan sebze örneklerinde *E. bienersi* ve *Encephalitozoon* spp.'nin varlığı saptanmıştır (Javanmard et al., 2018). Az pişmiş et yemek, HIV ile enfekte bireylerde Microsporidia enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Didier et al., 2004).

2.5.4. Vertikal ve Horizontal Bulaş

Microsporidianın vertikal aktarımı böcekler, nematodlar, balıklar, kabuklular, tavşanlar ve etoburlarda gözlemlenmiştir (Khac et al., 2018). İnsanlarda horizontal aktarım gözlenmemiştir (Didier et al., 1998). Horizontal aktarım genellikle yüksek parazit yükü ve eşlik eden patojenite ile karakterize edilir. Daha önce belirtildiği gibi Microsporidianın horizontal aktarımının olası yolları kontamine yiyecek veya suyun yutulmasını, fekal-oral geçişi ve kontamine aerosollerin solunmasını içermektedir (Dunn et al., 2001). Sporların kontamine yiyecek ve su yoluyla ağızdan bulaşması muhtemelen horizontal aktarımın ana yoludur (Mathis et al., 2005).

2.6. İmmünoloji

Microsporidiosis'e karşı direncin fonksiyonel T lenfositlerine bağlı olduğu hipotezi, CD4+ T hücresi seviyeleri azalan AIDS hastalarında hastalığın daha şiddetli

olmasına ve CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinden yoksun farelerde ölümcül deneysel Microsporidia enfeksiyonlarının gelişmesine dayanmaktadır (Khan & Didier, 2004). Murin modellerinde deneysel microsporidiosis üzerine yapılan son çalışmalar ve *ex-vivo* insan çalışmaları, *Encephalitozoon* spp. direncinde nitrik oksidin rolünün yanı sıra interferon (IFN- γ) TNF- α ve interleukin (IL)-12 gibi proinflamatuvar (Th1) sitokinlerin önemini göstermiştir (Franzen et al., 2005). CD8 α ⁺ intraepitelyal lenfositlerin, *E. cuniculi*'nin farelere oral yoldan verilmesinden sonra hızla arttığı gözlenmiştir. Bu hücrelerin IFN- γ üretimi ve sitotoksik aktivite yoluyla proinflamatuvar yanıtlara katıldığı ve ayrıca IL-10 salgısı yoluyla immün düzenlemeye katkıda bulunduğu görülmüştür (Moretto et al., 2004). Ek olarak, antikorların, *E. cuniculi* peros verilen şiddetli kombine immün yetmezlik farelerinde sağkalımın uzamasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Sak et al., 2006). Doku kültürü eksikliği ve küçük hayvan modelleri nedeniyle *E. bienersi* enfeksiyonlarına karşı koruyucu bağışıklık tepkileri hakkında neredeyse hiçbir şey bilinmemektedir. Rhesus ve pigtail makaklarında doğal olarak oluşan *E. bienersi* enfeksiyonları bildirilmiştir ve bunlar hem bağışıklık yetkinliğinde hem de bağışıklık yetersizliği olan insanlarda gözlenen enfeksiyonları simüle eden hayvan modellerini temsil etmektedir (Drosten et al., 2005).

2.7. Klinik Belirtiler

Microsporidia insanlarda lokalize veya yayılmış enfeksiyona neden olabilir (Ramanan & Pritt, 2014). Microsporidiosis insanlarda ortaya çıkan önemli bir fırsatçı hastalığı temsil etmektedir. Bu enfeksiyon, bir zamanlar bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarla sınırlı olduğu düşünülürken, immün yetkin bireylerde de enfeksiyonların meydana geldiği bilinmektedir (Didier & Weiss, 2011). Microsporidiosis'in klinik belirtileri bulaşma şekline, nedensel türlere, altta yatan konak bağışıklık durumuna ve tepkisine göre değişen çok çeşitlilik göstermektedir (Ryan et al., 2019). *E. bienersi* ve *E. intestinalis* insan enfeksiyonunda en sık tespit edilen Microsporidia türleridir ve kronik ishal en sık görülen klinik sendromdur. Her ne kadar rapor edilen microsporidiosis vakalarının çoğu ishali içerse de bu organizmaların neden olduğu hastalıkların kapsamı miyozit, böbrek ve ürogenital

enfeksiyon, kolanjit, asit, sinüzit, hepatit, keratokonjonktivit ve yaygın enfeksiyonun yanı sıra asemptomatik enfeksiyonu içerir (Weiss & Becnel, 2014).

2.7.1. Encephalitozoonidae

E. intestinalis, *E. hellem* dahil olmak üzere *Encephalitozoon* türleri ve *E. cuniculi*, memelilerde yaygın olarak bulunur ve hem immün yetkin hem de yetmezliği olan bireylerde tanımlanmıştır (Didier & Weiss, 2011). Microsporidia, konaklarda geniş yayılma kapasitesine sahiptir ve enfeksiyon sırasında hemen hemen her organ sistemini tutabilir. Encephalitozoonidae sinüzit, bronşiolit, nefrit, keratit, peritonit, hepatit, fulminan karaciğer yetmezliği, gastroenterit, serebrit, sistit, üretrit, prostatit, nodüler cilt lezyonları ve yaygın enfeksiyon vakalarında etiyolojik olarak tanımlanmıştır (Aurrecoechea et al., 2010). Enfeksiyon en sık immün yetmezliği olan hastalarda görülmektedir (örn. HIV enfeksiyonu olan hastalar, özellikle CD4 sayısı $50/\text{mm}^3$ olan hastalarda, transplant alıcılarında ve immünomodülatör tedavi görenlerde) (Franzen & Müller, 1999). *Encephalitozoon* türleri kendi kendini sınırlayan diyare semptomu olan immün yetkin gezginlerde de tanımlanmıştır (Wichro et al., 2005).

AIDS’li immün yetmezliği olan hastalarda diyare ve halsizlik vakalarının yaklaşık %10’u *E. intestinalis*’e bağlıdır (Van Gool et al., 1994). Enfeksiyon bağırsak nekrozu bölgelerine ve bağırsak perforasyonu ve peritonit (Tanveer & Barman, 2015) ile birlikte akut karın (Soule et al., 1997) görünümüne benzer bir görünümle sonuçlanabilir. Bu patojenin ayrıca, kolanjit (Willson et al., 1995), keratokonjonktivit, mandibula osteomyelit (Belcher Jr et al., 1997), böbrek yetmezliği, üst solunum yolu enfeksiyonu ve yaygın enfeksiyona (Dore et al., 1995) neden olduğu bildirilmiştir.

2.8. Tanı

Son yıllarda Microsporidia türlerinin tespit edilmesine yönelik tanı prosedürleri önemli ölçüde gelişmiştir (Garcia, 2002). Bu gelişmiş tekniklerle immün yetkin bireylerde Microsporidia enfeksiyonunun giderek daha fazla tespit edildiği görülmektedir (Mumcuoglu et al., 2016). Microsporidiaları tür düzeyinde tanımlayabilmek için elektron mikroskopisi gibi ultrastrüktüel inceleme veya türe

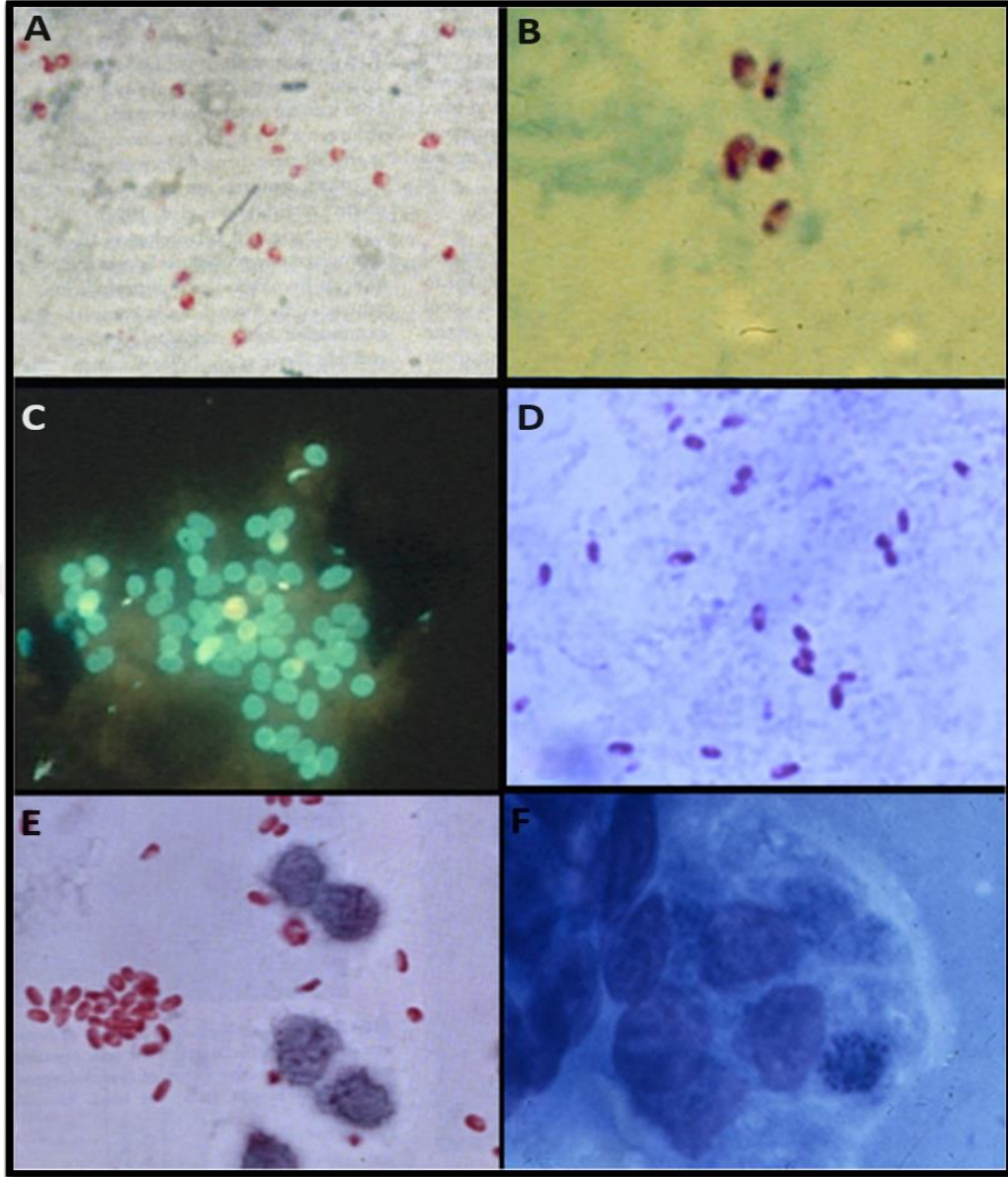
özgü Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi gibi moleküler teknikler gerekmektedir. Microsporidiosis için serolojik testler araştırma amacıyla geliştirilmiştir ve epidemiyolojik çalışmalarda enfeksiyon prevalansını tahmin etmek için kullanılmıştır. Ancak serolojik testler aktif microsporidiosisin teşhisi için yararlı değildir. Doku kültürü kullanılarak Microsporidia izolasyonu ise rutin klinik tanı için pratik değildir (Han et al., 2021).

2.8.1. Işık Mikroskopisi

Microsporidia türlerinin tanısında ışık mikroskobu cins ve tür düzeyinde ayırım yapılmasını sağlayamamasına rağmen tanıda etkin olarak kullanılan bir yöntemdir (Karaman, 2007). Işık mikroskopisi, gastrointestinal microsporidiosisin tanısında standart tekniktir ve yayılan Microsporidialarda idrarda sporların atılmasıyla birlikte böbrek tutulumu yaygın olduğundan idrar örnekleri incelenmelidir (Meng et al., 2024).

Microsporidianın tespit edilebilmesi için çeşitli yöntemler mevcuttur (Şekil 5) (Franzen & Müller, 1999). Vücut sıvılarının (örn. idrar, solunum örnekleri, duodenal aspiratlar, beyin omurilik sıvısı) incelenmesi veya biyopsi örneklerinin ışık mikroskobu ile histolojik olarak incelenmesi, microsporidiosis enfeksiyonlarını tanıması için en yaygın yollardan birisi olmakla birlikte bu yöntem Microsporidia türlerini doğrulayamamaktadır (Conteas et al., 1996). Dışkıda Microsporidia sporları ile karıştırılabilecek bakteri ve kalıntıların bulunması nedeni ile vücut sıvılarında sporları tanımlama daha kolaydır (Izquierdo et al., 2017). Sporların boyutu 1-3 µm arasında olmasından dolayı görselleştirilmesi için ×60 ila ×100 objektif gereklidir. Sporların proteinli ekzospore ve kitinli endospore sahip olmalarından dolayı Giemsa, Gram, trikrom boyaları ve floresan boyaları (Uvitex 2B ve kalkoflor beyazı) ile boyanır (Khanaliha et al., 2014). Bununla birlikte Giemsa ve Gram boyamaları histolojide faydalı olsa da dışkı incelemesi için kullanışlı değildir çünkü bu yöntemler Microsporidia ile dışkıda bulunan diğer benzer büyüklükteki yapıları ayırt edemez (Conteas et al., 1997). Kromotrop 2R boyaları ve floresan boyalar, vücut sıvılarında ve dışkı örneklerinde Microsporidia saptanmasını önemli ölçüde iyileştirmiştir (Franzen & Müller, 1999). Weber ve ark. tarafından tanımlanan kromotrop 2R boyama tekniği, 10 kat daha yüksek kromotrop 2R konsantrasyonu ve daha uzun boyama süresi kullanılarak rutin trikrom boyamanın modifikasyonuna

dayanmaktadır (Weber et al., 1992). Kromotrop 2R boyamaları zaman alıcı işlemlerdir ve Microsporidian sporları çok daha kısa sürede koyu menekşe rengine boyayan sıcak Gram-kromotrop tekniği bazı laboratuvarlar tarafından tercih edilmektedir (Moura et al., 1997). Calcofluor white M2R, Uvitex 2B, Fungi-Fluor, Fungiqua A, Cellufluor ve diğer kemofloresan optik parlaklaştırıcılar gibi Microsporidianın spor duvarındaki kitine bağlanan floresan boyalar da çeşitli klinik numunelerde sporların görselleştirilmesinde faydalı olmuştur (Wittner, 1999). Bu boyalar kolay ve hızlıdır ancak aynı zamanda mantarları ve diğer dışkı unsurlarında boyarlar (Van Gool et al., 1993). Microsporidia boyutları ve tomurcuklanma eksikliği nedeniyle maya hücrelerinden ayırt edilebilir. Hem kromotrop 2R hem de kemifloresan parlaklaştırıcı boyalar mükemmel hassasiyet (%100) ve özgüllük (kromotrop 2R için %100 ve kemifloresan boyalar için %90 ila %100) göstermiştir (DeGirolami et al., 1995).



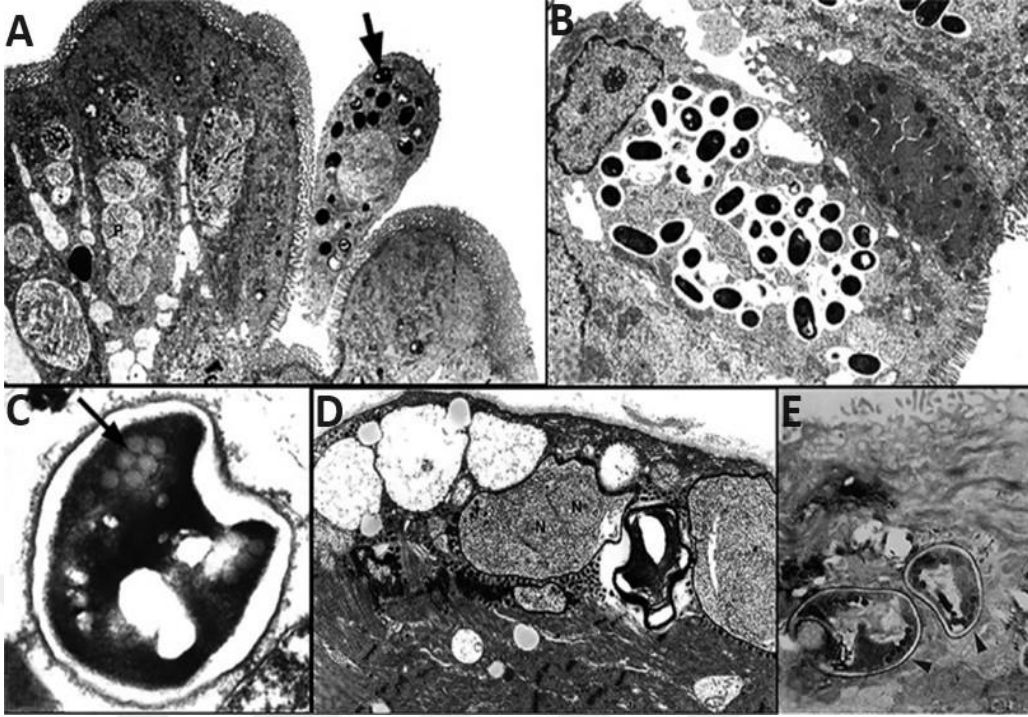
Şekil 5. Dışkıda, idrarda ve diğer klinik örneklerde Microsporidia sporları. AIDS ve ishal hastalarından alınan dışkı örneklerinin kromotrop boyaları (A ve B) (Wittner, 1999). *E. hellem* keratokonjonktiviti olan bir hastadan alınan sporları gösteren kemifloresan madde (kitin boyama) ile boyanmış konjonktival kazıma (C). AIDS'li *E. intestinalis* enfeksiyonu olan bir hastadan alınan dışkı örneği Gram-kromotrop boyama (D) (Weiss & Becnel, 2014). Yaygın *E. cuniculi* enfeksiyonu ve HIV enfeksiyonu olan bir hastadan alınan idrar sedimentinin kromotrop boyası (E). Hücre içi sporları gösteren bağırsak *E. bieneusi* enfeksiyonu olan bir hastadan alınan bağırsak biyopsi örneğinin (endoskopi ile elde edilen) dokunma preparatının metilen mavisi-azure II-fuksin boyası (F)(Han et al., 2021).

Histolojik olarak sporlar rutin fikse dokularda modifiye doku kromotropu 2R, doku Gram boyası (Brown-Hopps veya Brown-Brenn) veya Luna boyası gibi çeşitli standart boyalar kullanılarak tanımlanabilir (Peterson et al., 2011).

Microsporidialardan şüpheleniliyorsa biyopsi veya otopsi materyalinin bir örneği de elektron mikroskobu fiksatifine konulmalıdır, çünkü bir Microsporidia türünün kesin sınıflandırması ultrastrüktürel bilgilere bağlıdır. Microsporidiosis enfeksiyonları genellikle mukoza veya epiteli içerdiğinden sitolojik preparatlar tanı için özellikle yararlıdır. Microsporidian keratit vakalarında, konjonktiva ve korneanın bir doku çubuğu ile hafifçe ovulmasıyla elde edilen mikroskobik inceleme materyali, epitel hücreleri içindeki sporları göstermeyi sağlayacaktır. *E. hellem*, *E. intestinalis* (Beckers et al., 1996) ve *E. bienewisi*'ye karşı monoklonal antikorlar geliştirilmiş ve doku kesitlerinde, dışkıda ve diğer vücut sıvılarında sporları tespit etmek için immüno Floresan veya diğer immün boyama teknikleri için kullanılmıştır. Encephalitozoonidae ve *E. bienewisi* antikorlarını kullanan çevresel örneklerde sporların tespitine yönelik ticari kitler mevcuttur (Han et al., 2021).

2.8.2. Elektron Mikroskopisi

Elektron mikroskobu ile doku incelemesi en iyi yaklaşım olarak kabul edilmektedir; ancak bu seçenek tüm laboratuvarlarda mevcut değildir (Wittner, 1999). Vücut sıvılarında veya dışkı örneklerinde görülen olgun sporlar (Şekil 6), türlerin tanımlanması için önemli yapısal veriler sağlayabilirken, kesin tanımlama, doku örneklerinde görülen gelişimsel yaşam döngüsünün incelenmesini gerektirir (Franzen & Müller, 1999). Genel olarak, elektron mikroskopisi rutin mikroskopi veya moleküler tekniklerden daha az hassas olması, özel ekipman gerektirmesi, çok emek ve zaman alıcı olması nedenlerinden dolayı rutin tanı için kullanılmaz (Thellier & Breton, 2008).



Şekil 6. Microsporidiosisli hastalardan alınan biyopsi örneklerinin TEM görüntüsü. AIDS ve *E. bienewi* enfeksiyonu olan bir hastadan alınan duodenal epitel, çoğalan evreleri (P) ve geç sporogonyal plazmodileri (Sp) göstermektedir. Ok, olgun sporlar içeren dökülen enterositi işaret etmektedir (A). AIDS ve *E. intestinalis* enfeksiyonu olan bir hastadan alınan ve fibriller matris içeren vakuoller içindeki sporları gösteren bağırsak biyopsisi örneği (B). Polar tüpün üç enine kesitinin iki sırasının karakteristik bulgusunu gösteren *E. bienewi* sporu (okla gösterilmiştir). Miyozit ile başvuran ve anti-TNF- α antikorunu kullanan romatoid artritli bir hastadan alınan kas biyopsisi örneği. Biyopsi örneğinde karakteristik diplokaryotik nükleus (N) ile proliferatif formlar görülmektedir (D). *E. hellem*'e bağlı keratokonjonktiviti olan bir hastadan alınan konjonktival biyopsi örneği, polar tüpün altı kesitinden oluşan tek bir sıra ile karakteristik sporları (ok başları) göstermektedir (E) (Wittner, 1999).

2.8.3. Moleküler Teknikler

Çeşitli Microsporidial genomların başarıyla dizilenmesi, insanlarda Microsporidial enfeksiyonların tanısı için moleküler biyolojiye dayalı tekniklerin uygulanmasına yol açmıştır. Microsporidia'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve *in situ* hibridizasyon gibi moleküler bazlı yöntemler kullanılarak tespiti türlerin tanımlanması için hassas ve spesifik yöntemler sağlamaktadır (Franzen & Müller, 1999). Küçük alt birim rRNA'nın, büyük alt birim rRNA'nın ve intergenik aralayıcı bölgenin tek ve yuvalanmış primer çiftlerini kullanan PCR bazlı testler, insanlarda farklı Microsporidia türlerinin tespiti için tanımlanmıştır (Fedorko & Hijazi, 1996). PCR bazlı testler hem doku biyopsi örnekleri hem de dışkı örnekleri dahil vücut sıvıları ile kullanılmıştır (Ghosh & Weiss, 2009). Nükleik asitler DNA

ekstraksiyonunun verimliliğini artırmak için litikaz ve/veya kitinaz kullanımıyla birlikte klinik örneklerdeki Microsporidial sporların mekanik olarak parçalanmasıyla klinik örneklerden izole edilmektedir (Müller et al., 1999). PCR bazlı yöntemlerin klinik numunelerde 100 ile 1.000 spor/mL'yi tespit edebildiği gösterilmiştir (Garcia, 2002). Üç Microsporidia türü için gerçek zamanlı PCR (qRt-PCR) ile geleneksel mikroskopiye karşılaştıran bir çalışmada (qRt-PCR) yönteminin numunelerdeki sporların varlığını tespit etme olasılığının üç kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Polley et al., 2011). rRNA probları kullanılarak *in situ* hibridizasyon, klinik örneklerde Microsporidiayı tür düzeyinde tanımlamak için de kullanılmıştır ve doku örneklerinin incelenmesinde faydalı olabilmektedir (Hester et al., 2000). Ancak *in situ* hibridizasyon, PCR'dan daha az duyarlı, zaman alıcı ve gerçekleştirilmesi önemli uzmanlık gerektirdiğinden rutin klinik teşhis için yaygın olarak kullanılmamaktadır (Ghosh & Weiss, 2009).

2.9. Tedavi

Microsporidiosis için temel ilaç albendazol ve fumagillindir. Albendazol spor mitozunu durduran β -tubulin'i inhibe eder. Fumagillin ise metiyonin aminopeptidaz tip 2'yi hedef alır, bu da parazit membranında lipid birleşmesinin artmasına neden olur ve hücre kırılması ve ölümüne yol açar. Bu ajan ayrıca RNA sentezinin engellenmesinde de rol oynamaktadır (Anane & Attouchi, 2010). Albendazol, fumagilline kıyasla daha dar bir Microsporidia spektrumunu kapsamaktadır. Fumagillinin etkinliğine rağmen kemik iliğini baskılayıcı toksisitesi çekiciliğini azaltmaktadır. Albendazol, *E. bienersi* enfeksiyonunu kontrol altına alamaz ancak nitazoksanidin etkili olduğu kanıtlanmıştır (Saffo & Mirza, 2019). Tedavi için yeni ilaç hedefleri ortaya konmuştur, ancak bugüne kadar bunların etkinliğine ilişkin veriler yetersizdir (Han & Weiss, 2018). Bağırsak microsporidiosis için iki hafta boyunca günde üç kez veya dört hafta boyunca günde iki kez oral olarak 400 mg albendazol önerilmektedir (Mahmud et al., 2017). Yaygın vakaların tedavisindeki temel zorluk hastaların zayıf immünolojik durumudur. Birçok vakada albendazol kullanımının hastalarda önemli klinik iyileşme elde edilene kadar ve klinik örneklerde parazitlerden arınmaya kadar uzatıldığı görülmektedir. Ayrıca, HIV'li bireylerde $CD4^+$ düzeyi 100 hücre/mm³ ulaştıktan sonra ilacın kesilmesinin

düşünülmesi ve hastaların bağışıklık sistemlerini güçlendirmek için eş zamanlı antiretroviral almaları da önerilmektedir (Talabani et al., 2010). Böbrek nakli sonrasında hastalara ömür boyu albendazol kullanıldığı uygulamalar mevcuttur (George et al., 2012). Hastanın immünolojik durumu tam olarak düzeltilemezse, uzun süreli albendazol kullanımının yararları risklerden daha ağır gelebilir. Microsporidiya karşı kimyasal profilaksi için hala bir endikasyon yoktur, bu nedenle iyi kişisel hijyen sağlamak ve tam pişmiş gıda tüketmek, enfeksiyon riskini azaltmak için en uygun çözüm olabilir (Seatamanoch et al., 2022).

2.10. Korunma

Vücut sıvılarında enfektif sporların varlığı, klinik ortamlarda vücut sıvılarıyla çalışırken güvenlik önlemlerinin ve kişisel hijyen önlemlerinin enfeksiyonun önlenmesine yardımcı olması gerektiğini göstermektedir. Sağduyulu yaklaşımlar arasında kaynamış su içmek, elleri yıkamak, iyice pişmiş et yemek ve sebze ve meyveleri yemeden önce dikkatlice yıkamak yer alır (Deplazes et al., 2000; Didier et al., 2004) Sporlar ortamda %70 etanol, fenolik türevler, formaldehit, %1 hidrojen peroksit, sodyum hidroksit, kloramin veya amfoterik yüzey aktif maddelere 22°C’de 30 dakika boyunca maruz bırakılarak ve 120°C’de 10 dakika boyunca otoklavlanarak veya 5 dakika boyunca kaynatılarak öldürülebilirler (Liu et al., 2017). Microsporidiosis önleyen herhangi bir profilaktik ajan tanımlanmamıştır. Hastalarda trimetoprim-sülfametoksazol profilaksisi sırasında microsporidiosis gelişmiştir ve dapson, atovaquone, azitromisin, itrakonazol veya pirimetamin alan hastalarda enfeksiyon bildirilmiştir (Albrecht & Sobottka, 1997). En etkili önleyici tedbir, bağışıklık sistemi baskılanmış konaklarda bağışıklık fonksiyonunun yeniden iyileştirilmesidir (Han et al., 2021).

2.11. Arı Ürünleri

Arı ürünleri, bal arıları tarafından doğrudan veya doğal kaynaklardan üretilen bal, polen, arı sütü, bal mumu, propolis ve arı zehiri gibi ürünlerdir. Arı ürünlerinin gıda, kozmetik endüstrisi ve apiterapi amacıyla kullanımı yoğun ilgi görmektedir. Arı ürünlerinin çeşidine ve kalitesine bağlı olarak çeşitli biyolojik ve tıbbi aktiviteleri bulunmaktadır (ORUÇ & ÇAYCI, 2021).

2.11.1. Arı Ürünleri Çeşitlerinin Tanım ve Bileşenleri

Bal

Bal, bal arıları tarafından bitki ve çiçek nektarlarının tortularından üretilen daha sonra belirli bal arısı maddeleriyle birleştirilen, işlenmek ve olgunlaşmak üzere peteklerde depolanan doğal bir gıda maddesidir (Aw Yong et al., 2021). Balın kimyasal bileşenleri bal toplayan arının türü, bitki kaynağı, iklim koşulları, coğrafi bölge ve depolama koşulları gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bal enzimlerden (asit fosfataz, amilaz, katalaz, diastaz, glukoz oksidaz, invertaz ve sukroz diastaz) ve amino asit monomerlerinden (alanin, asparagin, glutamin, glisin ve prolin) oluşur (Samarghandian et al., 2017). Kafeik-, sinamik-, ferulik- vb. gibi çeşitli fenolik asitler ve başta glukonik ve sitrik asit olmak üzere çeşitli organik asitler, ardından asetik asit, formik asit ve küçük miktarlarda diğerleri balda bulunur. Bu asitler, balın pH 3.4 ile 6.1 arasında değişen asidik pH değerinden sorumludur. Balda kuersetin, kaempferol, krisin, apigenin, hesperetin, galangin, kateşin, luteolin, mirisetin ve naringenin gibi flavonoidlerde rapor edilmiştir. Bal numunelerinin toplam fenolik içeriği ve toplam flavonoid içeriği sırasıyla 4.2 ± 0.6 ila 1.9 ± 0.1 mg QE/100 g ve 31.5 ± 2.1 ila 126.6 ± 2.7 mg GAE/100 g arasında değişmektedir (Gündoğdu et al., 2019).

Bal başlıca şekerler olarak fruktoz (%38) ve glikoz (%31) gibi monosakkaritlerden, disakkaritlerden (sakkaroz, gentiobiyoz, izomaltoz, kojibiyoz, laminaribioz, maltoz, maltuloz, nigeroz ve trehaloz) ve trisakkaritlerden (sentoz) oluşan tatlı bir maddedir. Vitaminler, mineraller ayrıca suda çözünür vitaminlerin tümü ve P, Na, Ca, K, S, Mg, Cl, Si, Rb, V, Zr, Li, Sr gibi değişken mineraller dahil olmak üzere %0.02 gibi çok düşük konsantrasyonlarda rapor edilmektedir (Samarghandian et al., 2017). Bunlara ek olarak balda alkoller, aldehitler, benzen ve türevleri, terpen ve türevleri, ketonlar, piran, furan ve asit esterleri gibi uçucu bileşikler tespit edilmiştir (Meo et al., 2017). Bu kimyasal bileşimin varlığı balın antikanser, antialerjik, antibakteriyel, antioksidan, antidiyabetik, antiparaziter özellikler, ülser önleyici, iltihap önleyici, yara iyileştirici ve kalp koruyucu gibi yararlı etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır (Cornara et al., 2017).

Propolis

Yunanca pro (savunma) ve polis (şehir veya topluluk) kelimelerinden oluşan PROP veya arı tutkalı, bal arılarının tükürük bezi salgılarını başta dallar, ağaç kabuğu, çiçek tomurcukları, yapraklar ve gövdeler olmak üzere bitkilerin farklı kısımlarından biriken eksüda ile karıştırarak ürettikleri reçineli bir maddedir. PROP'un rengi yeşilden kahverengiye ve kırmızımsıya kadar çeşitlilik gösterir. PROP tatlı ve hoş bir kokuya sahiptir ve ısıtıldığında yumuşak ve yapışkan hale gelir (Pasupuleti et al., 2017). Tipik olarak ham PROP'u, reçine ve balms (%50-60), yağ asitleri, mumlar (%30-40), uçucu yağlar (%5-10), ve diğer bileşenlerden (%5) enzimler (asit fosfataz, adenosine triphosphataz, glukoz-6-fosfataz ve succinic dehidrogenaz), vitaminler (B1, B2, B6, C ve E), mineraller (Mg, Cu, F, Ca, K, Na, Mn ve Zn) oluşmaktadır (Huang et al., 2014).

PROP'da birkaç monosakkarit (fruktoz ve glikoz) ve bir disakkarit (sukroz) bulunur. Ayrıca flavonoidler (apigenin, krisin, asasetin, kateşin, daidzein, formononetin, naringenin, galangin, kaempferol, luteolin, likuiritigenin, mirisetin, pinosebrin, rutin ve kersetin), fenolik asitler (kafeik asit, sinamik asit, gallik asit, 4-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksihidrosinamik asit ve 4-hidroksibenzoik asit-metil ester), stilben türevi (resveratrol) ve terpenoidler içermektedir. PROP'da araşidonik, *cis*-13,16-dokosadienoik, *cis*-11,14,17-eikosatrienoik, *cis*-5,8,11,14,17-eikosapentaenoik, eikosadienoik, elaidik, heneikosilik, linoleik, oleik, palmitik ve palmitoleik asit gibi yağ asitleri mevcuttur (Pasupuleti et al., 2017). PROP ve özleri antibakteriyel, antikanser, antifungal, antiinflamatuar, antimikotik, antioksidan, antiülser, antiviral, kardiyoprotektif, immünomodülatör, nöroprotektif ve yara iyileştirici gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sağlamaktadır (Siheri et al., 2017).

Arı Sütü

İşçi bal arılarının mandibular ve hipofaringeal bezleri tarafından salgılanan AS, beyazımsı ile sarı renklerinde jöle benzeri bir maddedir (Pavel et al., 2014). Keskin bir kokuya, ekşi veya tatlı bir tada sahip olup suda az çözünür ve pH değeri 3.1–3.9 değerleri arasındadır (El-Guendouz et al., 2020). AS, bal arısı larvalarının beslenmesinde önemli bir rol oynar. Olgunlaşma sürecinde yalnızca işçi ve erkek arıların genç larvalarının besinidir ve tüm yaşam döngüleri boyunca kraliçe arılara sağlanır (Wang et al., 2016). Genellikle AS, su (%50-70), karbonhidratlar (%30),

proteinler (%27-41) ve lipitler (%3-19) içermektedir (Kocot et al., 2018). AS'de bulunan başlıca şekerler arasında fruktoz ve glikoz bulunur. Ayrıca sükroz ve diğer oligosakkaritlerden erloz, gentobiyoz, izomaltos, maltos, melezitos, rafinoz ve trehaloz gibi diğer oligosakkaritler çok küçük konsantrasyonlarda mevcuttur (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012). Eşsiz bir dokuz çözünür ana AS proteini grubu kraliçe bal arılarının gelişiminden sorumlu spesifik faktörler olarak işlev görür. Apisimin, jöleler ve royalisin dahil olmak üzere AS peptitlerinin antibakteriyel aktivite sağladığı gösterilmiştir (Cornara et al., 2017).

Lipid bileşimi yağ asitleri (%80-85), mumlar (%5-6), steroidler (%3-4) ve fosfolipidler (%0.4-0.8) olarak rapor edilmektedir. AS yağ asitleri genellikle yaygın olmayan kısa zincirli hidroksi ve dikarboksilik asitlerdir (8-12 karbon atomlu), örneğin 10-hidroksi- *trans*-2-dekenoik asit (10-HDA) ve 10-hidroksidekanoik asit (HDAA), *trans*-2-dekenoik asit, 24-metilenkolesterol, 4-hidroksiperoksi-2-dekenoik asit etil ester ve sebasik asit, 3-hidroksidekanoik, 9-hidroksi-2-dekenoik, 8-hidroksioktanoik ve 9-hidroksidekanoik asit. Bunların arasında 10-HDA ve 10-HDAA, AS'nin spesifik bileşikleridir (Ahmad et al., 2020).

AS flavanonlar (pinobanksin, pinosembrin, hesperidin, naringin ve naringenin), flavonlar (akasetin, apigenin, krisin ve luteolin), flavonoller (fisetin, galangin, isorhamnetin, kaempferol, kuersetin ve rutink), asit, gallik asit, 4-hidroksi-3-metoksifeniletanol, 4-hidroksibenzoik asit-metil ester, 4-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksihidrosinnamik asit, oktanoik asitler, 2-heksendioik asit ve esterleri, dodekanoik asit ve esterleri, 1,2-benzendikarboksilik asit ve benzoik asit) ve hidrokinon, metil salisilat, 2-metoksi-p-kresol, 2-metoksifenol ve pirokatekol gibi diğer fenolik bileşikler içermektedir (Kocot et al., 2018). Toplam fenolik ve toplam flavonoid sırasıyla 3 ile 9 mg GAE/g ve 0.1 ila 0.5 mg QE/g AS arasında değişir (El-Guendouz et al., 2020). AS ayrıca hormonlar (prolaktin, testosteron, östradiol ve progesteron), mineraller (Cu, Fe, K, Mg ve Zn) ve vitaminler (B1, B2, B3, B5, B6, B9 ve provitamin A) içermektedir (Maghsoudlou et al., 2019).

AS'de bulunan çeşitli kimyasal bileşenler, yaşlanma önleyici, antialerjik, antibakteriyel, antikanser, antidiyabetik, antiinflamatuvar, hipoglisemik, hipotansif, hepatoprotektif, immünomodülatör ve nöroprotektif etkiler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özellikler sergilemektedir (Petelin et al., 2019).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Arı Ürünlerinin Elde Edilmesi

Araştırmada kullanılan olan ÇB, ÇMB ve KSB, AS ve PROP örnekleri, dünya arıcılık kongresinin düzenlendiği 46. Apimondia Dünya Arıcılık ödülleri "Dünya'nın En İyi Balı" seçilen Eğriçayır Organik Arı Ürünleri Limited Şirketi'nden temin edilmiştir.

3.2. Arı Ürünlerinin Analizi

ÇB, ÇMB ve KSB örnekleri kimyasal bileşenleri Sıvı Kromatografisi-Yüksek Çözünürlük Kütle Spektrometrisi (LC-HRMS) yöntemi ile Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. PROP'un fenolik içeriği Bursa Uludağ Üniversitesi Toksikoloji ve Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, AS'nin kimyasal bileşenleri ise Intertek Test Hizmetleri A.Ş. tarafından analiz edilmiştir.

3.2.1. LC-HRMS Analizleri

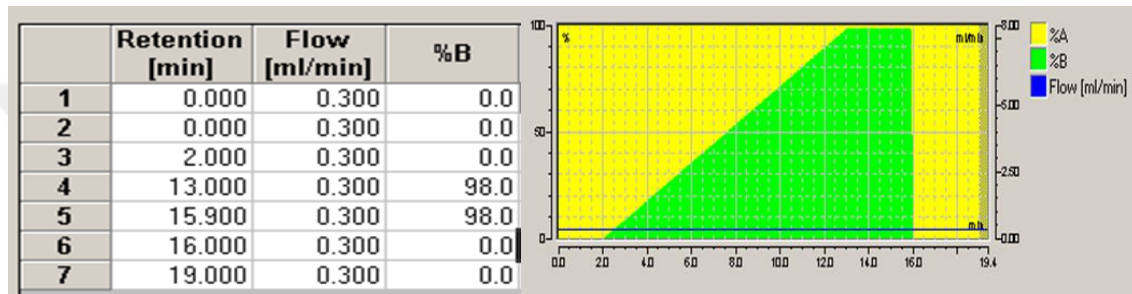
LC-HRMS analizleri DIONEX UltiMate 3000 RS pompası, DIONEX UltiMate 3000 RS otomatik numune alıcısı ve DIONEX UltiMate 3000 RS kolon firmı içeren LC sistemi ve ısıtmalı elektrosprey iyonlaşma arayüzüne sahip Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, USA) yüksek çözünürlüklü MS bileşimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Orbitrap-MS cihazı bir otomatik şırınga enjektörü (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak pozitif (Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution) ve negatif kalibrasyon (Pierce™ Negative Ion Calibration Solution) solüsyonları ile kalibre edilmiştir. Yapılan LC-HRMS analizlerinde LC ve MS kısmı sistem bilgisayarına yüklenmiş olan TraceFinder 3.2 (Thermo Scientific) programı ile eş zamanlı olarak çalıştırılmış ve veriler Xcalibur software version 2.1.0.1140 (Thermo Fisher Scientific) programı ile toplanılarak kaydedilmiştir.

3.2.2. Kromatografi ve Yüksek Çözünürlüklü MS Koşulları

Numuneler 10 g ağırlığında alınarak üzerine % 2 asetik asit içeren su çözeltisinden 5 mL eklenerek çözündürüldü. Daha sonra üzerine 5 mL metanol eklenerek 10 dakika (dk) boyunca ultrasonik banyoda karıştırıldı. Ardından 1 saat süreyle 200 rpm'de orbital çalkalayıcıda çalkalandı. Son olarak, 4500 rpm'de 10 dk

süreyle santrifüj edilerek üst sıvı fazdan alındı. Şırınga yardımıyla 0.22 mikrometre PTFE filtre ile süzülerek 1.5 mL vial içerisine alındı ve analiz için enjekte edildi.

Analizlerde Phenomenex® Gemini® 3µm NX-C18 110 Å (100 mm×2 mm) kolon kullanıldı. Kolon fırın sıcaklığı 30°C olarak ayarlandı. Elüsyon gradiyentinde hareketli A fazında, ultra saf su da hazırlanmış % 2 (v/v) glasiyel asedik asit, hareketli B fazında %99.9 saflıkta LC-MS derecesinde metanol (Sigma, USA) kullanıldı. Analizde, numune enjeksiyon hacmi 20.0 µL ve 0.3 mL/dk akış hızında gradiyent elüsyon koşulları Şekil 7’de belirtilen durumlara göre gerçekleştirildi. Analiz süresi toplam 20 dk olarak ayarlandı.



Şekil 7. Elüsyonda takip eden gradiyent koşulları.

Isıtılmış bir elektrosprey iyonlaşma ara yüzü ile donatılmış Orbitrap HRMS hem pozitif (Full MS/AIF) hem de negatif (Full MS/AIF) modda çalıştırıldı. İyonlaştırma ara yüzü kılıf gaz (sheath gas) akış oranı 35; yardımcı gaz (auxiliary gas) akış oranı 7; sprej voltaj 3.5 kV; kapiler sıcaklığı 350°C; yardımcı gaz sıcaklığı 350 °C; S-lens RF seviyesi 50 olarak ayarlandı. MS tarama aralığı 60-800 m/z; resolution 17500; ACG target 3.10⁶; maximum IT 2 ms; CE (çarpışma enerjisi, collision energy)/ step CE 25 V koşullarında gerçekleştirildi.

LC–Orbitrap HRMS analiz metoduna ait fitokimyasal bileşikler için standart konsantrasyonu 10ppb-20ppb-40ppb-60ppb-80ppb-100ppb-200ppb-300ppb-400ppb-500ppb hazırlanarak her biri üç tekrarlı şekilde enjekte edildi.

3.3. Arı Ürünlerinin Sitotoksik Potansiyellerinin Belirlenmesi

3.3.1. Arı Ürünlerinin Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Araştırmada kullanılan ÇB, ÇMB ve KSB konsantrasyonlarını hazırlamak için her bal örneğinden 0.2 g tartılarak steril bir epondorf tüpüne alındı. Üzerine 1 mL Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

besiyeri eklenerek homojen bir karışım elde edildi. Karışım 0.22 µm'lik filtreden süzülerek steril hale getirildi. Daha düşük bal konsantrasyonları elde etmek için, ana stok solüsyondan seri sulandırım yöntemi ile %20 w/v'den %0.0375 w/v'ye kadar değişen 10 farklı bal konsantrasyonu hazırlandı.

İşleme alıncaya kadar +4°C'de kuru ve karanlık bir yerde muhafaza edilen PROP örneklerinden 240 mg küçük parçalara ayrılarak üzerine 80 mL %90'luk etil alkol eklenerek bir gece düşük ısıda manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ekstrakta besiyeri eklenerek konsantrasyonu 40 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. Stok solüsyon 0.22 µm por gözenekli filtreden süzülerek steril hale getirildikten sonra yine seri sulandırım metodu ile 1000 µg/mL'den 1.9 µg/mL'ye kadar değişen oranlarda konsantrasyonlar hazırlandı.

Araştırmada kullanacağımız AS konsantrasyonlarını hazırlamak için 1000 mg AS üzerine 10 mL renksiz DMEM besiyeri eklenerek homojenizasyonu sağlandı. Daha sonra, karışım 40 dk boyunca 6000 rpm'de santrifüjlendi. Berrak süpernatant toplandı ve yeni bir santrifüj tüpüne alındı ve dipte kalan peletin üzerine 100 µL dimetilsülfoksit (DMSO) ve 10 mL DMEM besiyeri eklendi. Daha sonra süspansiyon yeniden 40 dk 6000 rpm'de santrifüjlendi. Tekrar süpernatant toplandı ve diğer süpernatant ile birleştirildikten sonra 0.22 µm por gözenekli filtreden süzülerek steril hale getirilen stok solüsyon konsantrasyonu 50 mg/mL'dir. Bu ana stok solüsyondan seri sulandırım yapılarak 50 mg/mL'den 0.09 mg/mL'ye kadar değişen oranda konsantrasyonlar hazırlanmıştır.

3.3.2. Hücre Serisi ve Kültürü

Çalışmada HEK-293 hücreleri (insan böbrek epitel hücreleri, ATCC) kullanıldı. Hücreler, %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin-streptomisin solüsyonu içeren DMEM besiyeri içerisinde üretilmiştir (Thermo-Fisher Scientific, ABD). Kültürler, nemli koşullar altında ve 37°C'lik %5 CO₂ içeren bir etüvde inkübe edilmiştir. HEK-293 hücre serisinin devamlılığını ve çoğalmasını sağlamak amacıyla çalışma süresince pasajlar gerçekleştirildi. Pasaj işlemi kısaca şu şekilde yapıldı: Hücre kültür flasksındaki besiyeri aspirasyon ettikten sonra, hücreler PBS ile yıkandı. Ardından, hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için Tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılması sağlandı. Tripsin aktivasyonu durdurulmak için DMEM kullanıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu,

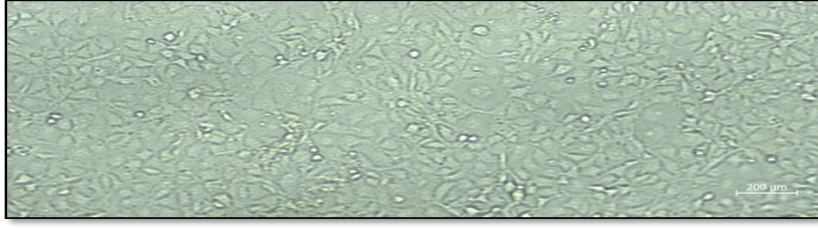
yeni hücre kültür flasklarına bölünerek pasajlandı. Bu sayede, HEK-293 hücrelerinin kültür serisinin devamlılığı sağlandı.

3.3.3. Sitotoksikite Testi

Araştırmada kullanılan arı ürünlerinin farklı konsantrasyonlarının, HEK-293 hücreleri üzerindeki sitotoksik potansiyeli XTT;(2,3-bis(2-mthoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) yöntemi ile araştırılmıştır.

XTT testinin uygulama şekli aşağıdaki şekilde yapılmıştır (Şekil 8):

- HEK-293 hücreleri, 96 kuyucuklu mikrotitre plaklarına 1×10^4 hücre/mL (her kuyucuğa 100 μ L nihai hacimde) ekilerek, 37°C’de %5 CO₂’li ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücrelerin kuyucuk tabanına yapışması sağlandı.
- Hücrelerin yapışmasının ardından, arı ürünlerinden hazırlanan konsantrasyonlardan 100 μ L, her bir kuyucuğa eklenerek, tekrar 37°C’de %5 CO₂’li ortamda 24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 μ L XTT etiketleme reaktifi eklendi.
- İki saatlik tetrazolyum reaksiyonundan sonra örneklerin absorbansı mikrotitre plak okuyucuda (Thermo Scientific Microplate Photometer, Multiskan FC, ABD), 450 nm’de ölçüldü. Kontrol olarak, besiyeri içerisinde test edilen örnekler olmadan aynı hücreler kullanıldı.
- Eşdeğer hacimde kültür ortamı ve XTT etiketleme reaktifi (100 μ L kültür ortamı başına 10 μ L XTT etiketleme reaktifi) bazal kontrol sağlamak için ayrı bir kuyucuğa eklenmiştir.
- Sitotoksikite ölçümleri dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.
- Örneklerin optik yoğunluğu (OD) negatif kontrolünkiyle karşılaştırılmış ve yüzde hücre canlılığı (%)=[(OD450 (örnek)/OD450(negatif kontrol))x100] formülü kullanılarak belirlenmiştir.



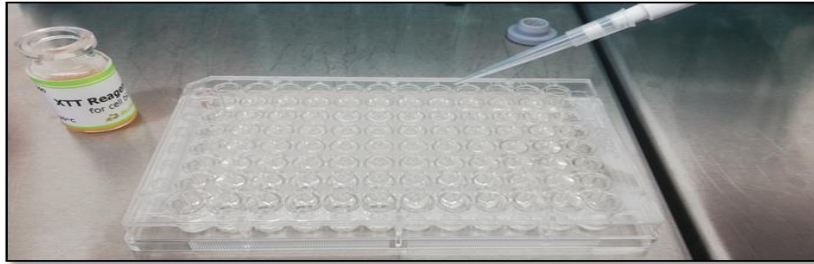
HEK-293 hücreleri 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarına ekildi



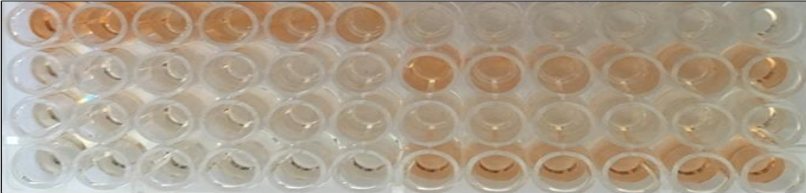
HEK-293 hücreleri 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarına ekildi. Mikroplaklar, hücrelerin yapışmasını sağlamak için, 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 24 saat inkübe edildi.



Arı ürünlerinden hazırlanan konsantrasyonlardan kuyucuklara eklendi. Tekrar 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı.



İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 µL XTT etiketleme reaktifi eklendi.



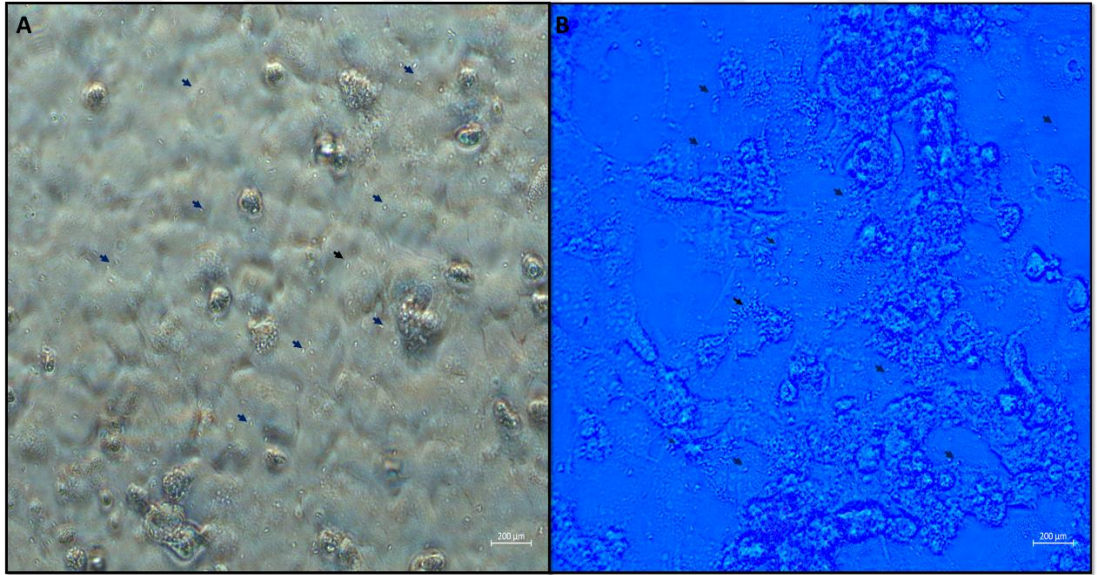
İki saatlik tetrazolyum reaksiyonundan sonra numunelerin absorbansı mikrotitre plaka okuyucuda 450 nm'de ölçüldü.

Şekil 8. Arı ürünlerinin sitotoksik potansiyelinin belirlenmesinde kullanılan XTT yönteminin aşamaları.

3.4. Arı Ürünlerinin *E. intestinalis* Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

3.4.1. Sporların Eldesi

Araştırmada *E. intestinalis* (ATCC 50506) sporlarını elde etmek için HEK-293 hücre hattı kullanıldı. Hücreler doku kültürü plaklarına ekildi ve 37°C’de %5 CO₂ ortamında gece boyunca kültürlendi. Tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak üzere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra doku kültürü plakları 5 parazit/1 hücre oranı olacak şekilde, 10⁵ *E. intestinalis* spor/mL içeren besiyeri ile değiştirilmesiyle enfekte edildi. Bu aşamada yukarıda bahsedilen besiyeri içeriğinden farklı olarak hücrelerin strese girip hem çoğalmalarını yavaşlatmak hemde hücrelerin sporlarla enfekte olmalarını sağlamak amacıyla %2 oranında FBS kullanıldı. Ertesi gün hücrelere girmeyen sporları uzaklaştırmak için plaklar PBS ile yıkandı. Sporların ekiminden 10 gün sonra besiyerinde serbest sporlar görülmeye başlandı (Şekil 9). Haftada iki kez besiyeri içerisindeki serbest sporlar besiyeri ile birlikte toplandı. Ortamdaki ölmüş hücreleri uzaklaştırmak için 0.5 µm porluk filtreden geçirilen besiyeri 4000 devirde 15 dk santrifüj edilerek sporlar toplandı.



Şekil 9. HEK-293 hücre hattında üretilmiş serbest *E. intestinalis* sporlarının (oklar) inverted mikroskoptaki filtresiz (A) ve mavi filtreli (B) görüntüleri (×40).

3.4.1. Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

Arı ürünlerinin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının *E. intestinalis* üzerine etkisini belirlemek için iki farklı yöntem uygulandı: kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRt-PCR) ve thoma lamı ile sayım yöntemi. Buna ek olarak, arı ürünlerinin etkisini mikroskopik olarak görselleştirmek için ayrı bir prosedür uygulanarak boyanan preparatlarda spor yoğunluğu değerlendirildi.

qRt-PCR Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

Konak Hücrelerin Enfekte Edilmesi ve Arı Ürünleri ile Muamele Edilmesi

Çalışmada kullanılacak HEK-293 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına her bir kuyucuğa 3 mL 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde kültürlendi ve 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat beklendikten sonra tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak üzere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler üzerine 1×10^5 spor içeren besiyeri eklendi ve hücrelerin enfekte olması için 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat beklendikten sonra hücrelere giremeyen serbest sporları uzaklaştırmak üzere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında, ÇB (%1.25, %0.6, %0.3 w/v), ÇMB (%5, %2.5, %1.25 w/v), KSB (%2.5, %1.25, %0.6 w/v) PROP (250, 125, 62.5 µg/mL) ve AS (25, 12.5 6.25 mg/mL) sitotoksik olmayan en yüksek üç konsantrasyonlarını içeren %2 FBS'li DMEM besiyeri hücreler üzerine eklenerek 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Her konsantrasyon 3 tekrarlı çalışıldı. Kültürler 10 gün boyunca takip edildi ve besiyeri 3. ve 7. gün aynı konsantrasyonlarda arı ürünleri içeren besiyeri ile yenilendi. Enfeksiyondan 10 gün sonra deney sonlandırıldı. Parazit yoğunluğunu ölçmek için, tüm ortam ve tripsinle kaldırılan konak hücreler, ayrı ayrı tüplere toplandı. Tüpler daha sonra 4000 devirde 15 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Pelet daha sonra yapılacak olan DNA izolasyonu için -20 °C'de saklandı.

DNA İzolasyonu

Örneklerden DNA izolasyonu Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde yapıldı. -20°C'de muhafaza edilen örnekler izolasyon öncesinde oda ısısında çözündürüldü ve DNA izolasyonu, "PureLink Genomic DNA Mini Kit" (Invitrogen, USA) ile kit prosedürüne göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Pelet üzerine 180 µL Digestion Buffer ve 20 µL proteinaz K eklendi ve 15 sn vortekslendi.

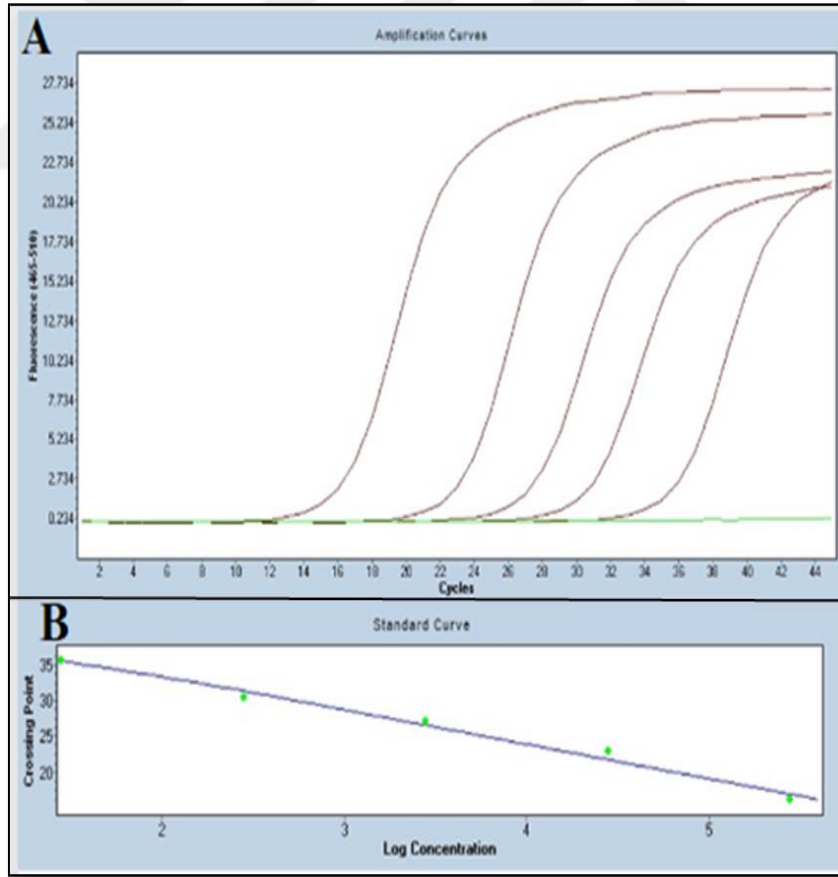
2. Tüpler 55°C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında partikülleri tamamen uzaklaştırmak için lizat oda sıcaklığında 3 dk 18000×g’de santrifüj edildi.
3. Süpernatant yeni, steril bir ependorfa aktarıldı ve 20 µL RNase A eklendi. İki dk inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası örnek üzerine 200 µL Lysis/Binding Buffer eklendi ve vortekslendi.
5. Lizat üzerine 200 µL %96-100 etanol eklendi ve vortekslendi.
6. Yaklaşık 640 µL lizat spin koluma aktarıldı ve 10000×g’de oda ısısında 1 dk santrifüj edildi.
7. Toplama tüpü uzaklaştırıldı ve spin kolum yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
8. Kolum üzerine 500 µL Wash Buffer 1 eklendi ve 10000×g’de oda ısısında 1 dk santrifüj edildi.
9. Toplama tüpü uzaklaştırıldı ve spin kolum yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
10. Kolum üzerine 500 µL Wash Buffer 2 eklendi ve 18000×g’de oda ısısında 3 dk santrifüj edildi.
11. Spin kolumu yeni bir toplama tüpüne yerleştirdi ve 18000×g’de 3 dk boş santrifüj edildi.
12. Spin kolumu yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi ve kolum membranının direkt üzerine 100 µL Elution Buffer eklendi ve oda ısısında 1 dk inkübe edildikten sonra 18000×g’de 1 dk santrifüj edilerek elüsyon sağlandı.
13. Elde edilen DNA kullanılana kadar - 20°C’de saklandı.

qRt-PCR Yönteminin Uygulanması

Çalışmada elde edilen DNA örnekleri, *E.intestinalis*’in 16S rRNA gen bölgesini hedef alan *E. intestinalis* F (5’ - cctgactggacggacagaag - 3’) ve *E. intestinalis* R (5’ - ttcgtccttcacgtcacat - 3’) primerleri (Çetinkaya et al., 2016) kullanılarak Light Cycler 480 (Roche Diagnostic, Almanya) cihazında qRt-PCR ile analiz edildi.

qRt-PCR işlemi için amplifikasyonlar 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; 5 µl genomik DNA, 1 µL *E.intestinalis* F primeri, 1 µL *E. intestinalis* R primerleri, 10 µL 2x SYBR-Green Master (Roche Diagnostic, Almanya) ve 3 µl distile su kullanılarak gerçekleştirildi. Termal profili; 95°C’de 10 dk 1 siklus; 95°C’de 10 sn, 60°C’de 30 sn ve 72°C’de 1 sn 45 siklus ve 40°C’de 30 sn 1 siklus olarak belirlendi.

Analizlerinde parazit yükünün hesaplanması için *E.intestinalis* 16S SSU rRNA gen bölgesini içeren plazmit DNA’sından hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardaki seri dilüsyonlar kullanıldı. Ana stoğun kopya sayısı 2.8×10^6 olarak hesaplandı. Ana stoktan 10’ar kat sulandırılarak beş dilüsyon hazırlandı. Bu dilüsyonlar hazırlanırken 450 µL distile su içerisine bir önceki dilüsyondan 50 µL eklenerek dilüe edildi ve seri dilüsyonlardan elde edilen kopya sayıları standart eğrinin oluşturulması ve örneklerdeki parazit yükünün belirlenmesinde kullanıldı (Şekil 10).



Şekil 10. *E. intestinalis* 16S SSU rRNA gen bölgesinden hazırlanan plazmit DNA’sından hazırlanmış seri dilüsyonların qRt-PCR analiz sonuçları. Amplifikasyon eğrileri (A). Standart eğri (B).

Thoma Lamı ile Sayım Yöntemiyle Parazit Yükünün Değerlendirilmesi Hücrelerin Enfekte Edilmesi ve Arı Ürünleri ile Muamele Edilmesi

HEK-293 hücreleri 24 kuyucuklu doku kültürü plaklarına kuyucuk başına 1.5 mL 5×10^5 hücre yoğunluğunda ekildi. Hücreler 2 mM L-glutamin ve %5 FBS içeren DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO₂ ortamında gece boyunca inkübe edildikten sonra tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak üzere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra doku kültürü plakları 1×10^5 *E. intestinalis* spor/mL içeren %2 FBS'li DMEM besiyeri ile değiştirilerek enfekte edildi. Ertesi gün hücrelere hücreler içerisine giremeyen sporları uzaklaştırmak için PBS ile yıkandı. Arı ürünlerinin yine toksik olmayan en yüksek üç konsantrasyonlarını içeren %2 FBS'li DMEM besiyeri ilave edildi ve her konsantrasyon 3 tekrarlı çalışıldı. Kültürler 10 gün boyunca takip edildi ve besiyeri 3. ve 7. günlerde aynı konsantrasyonlarda arı ürünleri içeren besiyeri ile parazitlere veya hücrelere zarar vermeden her bir kuyucuğa ilave edilerek yenilendi. 10. gün Microsporidia sporlarının konak hücrelerden salınması için tüm kuyucuklara %10 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu ilave edildi. Serbest kalan spordan konak hücre artıklarını çıkarmak için 4000 RPM'de 15 dk santrifüj edildi. Saflaştırılmış *E. intestinalis* sporlarını içeren peletler PBS ile yıkandı ve %5 FBS ve 2 mM L-glutamin ile desteklenen DMEM uygun konsantrasyonlara ayarlanarak bir thoma lamı ile sayılana kadar +4°C saklandı.

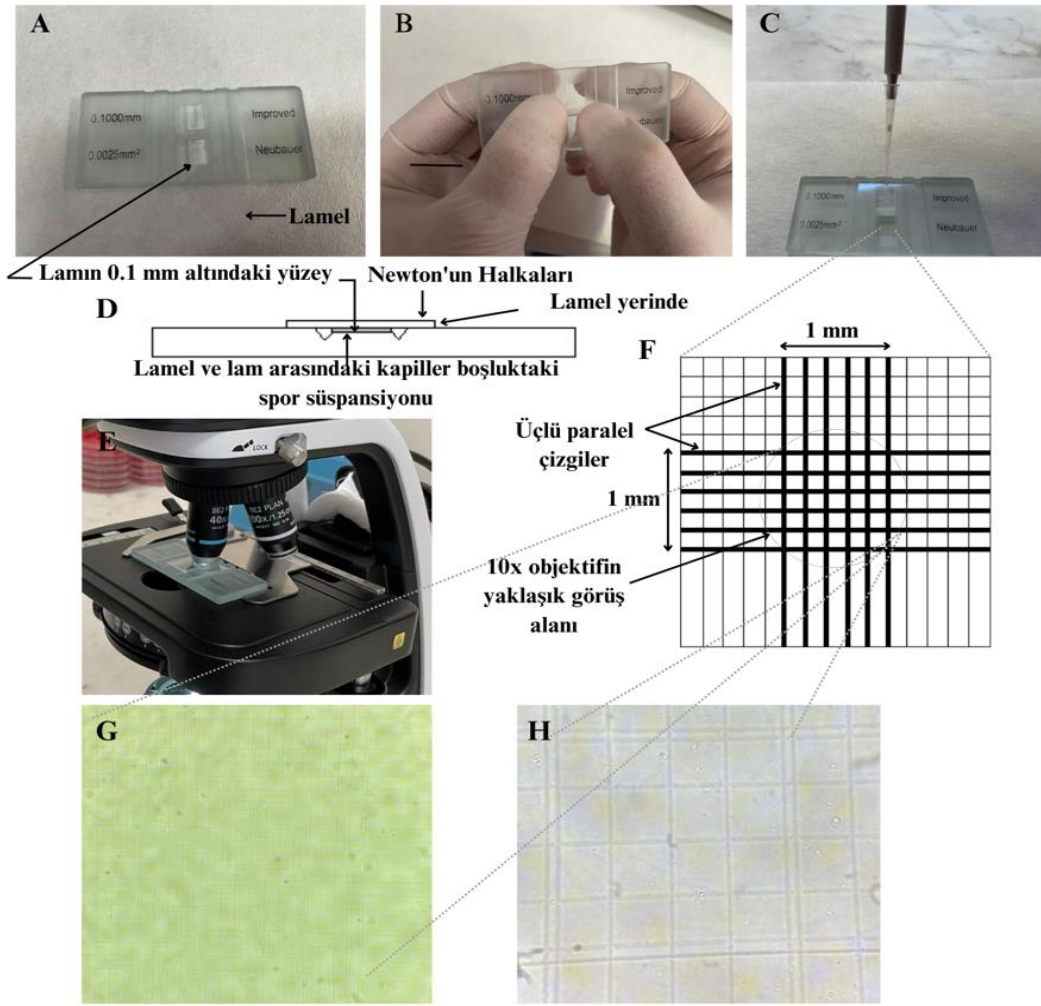
Thoma Lamı ile Sayım Yöntemi

Thoma lamının esası 0.1 mm³ hacimde sayım yapılmasıdır. Bu yöntemde öncelikle, +4°C'de muhafaza edilen örnekler oda ısısına çıkarıldı ve sporların thoma lamı ile sayım yöntemi aşağıdaki şekilde yapıldı (Şekil 11).

1. Thoma lamı ve lamel alkollü steril bir bez ile temizlendi (Şekil 11A).
2. Thoma lamı üzerine steril lamel konuldu ve bastırıldı (Şekil 11B).
3. Lamelin kenarından, vortekslenen, *E. intestinalis* sporlarını içeren besiyeri bir mikropipet yardımı ile aktarıldı (Şekil 11C). Böylece çukur alan içinde tam olarak 0.1 mm yüksekliğinde sıvı bulunması sağlanmış oldu (Şekil 11D).
4. Sayım yapılacak alan cam yüzeydeki çizgilerle belirlenmiştir. Thoma lamında 1 büyük kare (Şekil 11G), 16 orta boy kare, her orta boy kare, her orta boy

karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapıldı.

- Thoma lamında sayım sonucu $A \times SF \times 16 \times 10.000$ formülü ile hesaplandı. A: Bir orta boy karede sayılan hücre adedi, SF: Seyreltme faktörü, 16: 16 adet orta boy kare olduğundan tüm kare sonucuna erişmek için kullanılan çarpan $10.000:0,1 \text{ mm}^3$ 'deki sayım sonucunu 1 mL'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir.



Şekil 11. Thoma lamı ile sayım yönteminin aşamaları. Thoma lamı ve lamel (A) ve lamelin lam üzerine yerleştirilerek hazırlanması (B). Birleştirilmiş bir thoma lamına spor süspansiyonunun eklenmesi (C). Spor örneğinin 0.1 mm derinliğindeki bölmedeki konumunu gösteren slaytın uzunlamasına kesitinin şematik görünümü (D). Mikroskopta thoma lamın görünümü. (E). Thoma lamında toplam alanın şematik görünümü (F). Noktalı dairenin çevrelediği merkezi alan ortalama 10× objektifin kaplayacağı alandır. Bu alan yaklaşık olarak ızgaranın merkezi $1 \times 1 \text{ mm}^2$ kapsar. Merkezi $1 \times 1 \text{ mm}^2$ oluşturan bir lamın $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ gösteren mikrofotografı (G). İki paralel çizgiyle sınırlanan ve en küçük 16 kareyi ($50 \times 50 \mu\text{m}$) içeren, $200 \mu\text{m}$ 'lık daha küçük karelerden birinin mikrofotografı ($\times 40$) (H).

Arı Ürünlerinin Etkisini Mikroskopik Olarak Görselleştirme ve Boyama

Araştırmada kullanılan arı ürünleri konsantrasyonlarının *E. intestinalis* sporlarına etkisini görselleştirmek amacı ile steril lameller her bir arı ürünü için üç tekrarlı olacak 6 kuyulu doku kültürü şişelerinin tabanına yerleştirildi ve yukarıda ayrıntıları anlatılan ‘Konak Hücrelerin Enfekte Edilmesi ve Arı Ürünleri ile Muamele Edilmesi’ başlığındaki prosedürler tekrarlandı. On günlük sürenin sonunda, lameller şişenin tabanından dikkatlice çıkarıldı ve trikrom ile boyanarak, kapsamlı fotoğrafik dokümantasyon ile $\times 100$ büyütmede incelendi.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Arı ürünlerinin (ÇB, ÇMB ve KSB, AS, PROP) çeşitli konsantrasyonlarının *in vitro* etkisini değerlendirmek için toplanan, revize edilen ve doğrulanan veriler Sosyal Bilimler İstatistik Paketi 23 (SPSS 23) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

İstatistiksel veriler altı kez tekrar sonucunda elde edildi ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (Ss) olarak sunuldu. Arı ürünleri konsantrasyonlarında görülen spor sayılarının kontrol gruplarıyla karşılaştırması Bağımsız İki Örneklem t Testi ile test edilmiştir. Tüm arı ürünlerinin konsantrasyonlarına göre parazit sayısı ortalamalarının karşılaştırması Anova varyans analizi testi ile test edilmiştir. Farklılık görülen arı ürünleri konsantrasyonları için Tukey Testi ile ikili olarak karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Arı Ürünlerinin Analizinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda *E. intestinalis* sporları üzerine *in vitro* etkisi araştırılan ÇB, ÇMB, KSB'nin fenolik bileşen içerikleri LC-HRMS yöntemi ile, PROP'un fenolik bileşen içeriği Diyot dizisi tespiti ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-DAD) sistemi ile analiz edilmiştir. AS'nin kimyasal bileşenleri ise ISO 12824 (108048) (L) yöntemi ile analiz edilmiştir.

4.1.1. ÇB, ÇMB ve KSB Ballarının Fenolik Bileşenleri

Analiz sonucu tespit edilen bileşikler ve miktarları Tablo 1'de listelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bal türlerinin niceliksel olarak farklı fenolik profillere sahip oldukları tespit edilmiş olmakla birlikte, ÇB'nin fenolik bileşen içeriğinin ÇMB ve KSB'na göre daha zengin olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 1. ÇB, ÇMB ve KSB'nin Fenolik Bileşen İçerikleri

Tespit Edilen Fenolik Bileşikler	Bal Türleri (ppb)		
	ÇB	ÇMB	KSB
Benzoik asit	260.672	140.906	277.639
4-Hidroksibenzoik asit	200.684	242.509	137.499
3,4-dihidroksibenzaldehit (Protokatekuik aldehit)	3.343	-	6.752
Vanilik asit	257.285	371.987	70.294
Gentisik asit	47.874	160.42	51.751
3,4-Dihidroksifenilasetik asit(DOPAC)	257.285	400.305	70.294
Trans sinamik asit	26.051	-	35.7
Kumarik asit (trans-3-Hidroksisinnamik asit)	21.835	18.539	25.906
Kafeik asit	168.294	124.135	40.861
Kinik asit	2425.507	-	-
3-(4-Hidroksifenil) propiyonik asit	1919.943	646.757	37008.205
α -Siyano-4-hidroksisinnamik asit	449.84	21.869	-
Genkvanin(4',5-Dihidroksi-7-metoksiflavon, Apigenin 7-O-metil eter)	3.583	1.152	-
İzorhamnetin (Kuersetin 3'-metil eter)	142.698	112.746	155.411
Eriodiktyol (3,4,5,7-Tetrahidroksiflavanon)	19.56	37.825	-
Eskülin hidrat	3.045	-	3.133
Prosiyanidin B2	6.83	-	-
Doksorubisin Hidroklorür	12.983	-	-
Arbutin	1.35	-	-
Protokatekuik asit (3,4-Dihidroksibenzoik asit)	507.967	1097.043	723.356
Klorojenik asit	3.54	-	-
3-hidroksifenilasetik asit (3-HPA)	2.851	5.374	4.751
Homovanillik asit((4-Hidroksi-3-metoksifenilasetik asit)	673.61	3053.061	6198.34
Luteolin 7-rutinosid	0.68	-	-
Ellagik asit	166.859	106.43	-
Rosmarinik asit	11.376	-	-
Salisilik asit	120839.3	232918.231	-
Afzelin (Kaempferol 3-rhamnosid)	8.85	-	7.203
Kaempferol	11.445	-	7.167
Kuersetin	73.659	69.265	5.295
Naringenin	407.281	199.629	12.858
Luteolin	74.8	-	-
Apigenin (5,7-Dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-kromen-4-on)	54.613	-	-
Diosmetin (Luteolin 4'-metil eter)	27.155	-	-
2,4-dihidroksibenzoik asit (beta-Rezorsiklik asit)	-	42.734	42.726
Ferulik asit	-	12.292	-
Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit)	-	-	3.177
Rutin hidrat M-OH2	-	-	7.262

4.1.2. PROP'un Fenolik Bileşenleri

Çalışmamızda PROP'un kimyasal bileşimi HPLC-DAD yöntemi ile Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarında analiz edilmiştir.

PROP numunesinde analizi sonuçlarında belirlenen 17 fenolik bileşen ve miktarları Tablo 2 de verilmiştir. Analiz sonucunda PROP numunesinde kuersetin, kaemferol, pinosembrin, galangin, epigallokateşin gallat, naringenin, apigenin, kirisin, trans-kalkon flavanoidleri tespit edilirken kafeik asit, sinamik asit gibi fenolik asitlerde bulunmuştur. Kafeik asit fenetil ester (CAPE) PROP numunesinde ana bileşen olarak tespit edilmiştir.

Tablo 2. PROP'un Fenolik Bileşen İçeriği

Tespit Edilen Fenolik Bileşikler	Miktar (µg/g)
Gallik asit	189.17
Epigallokateşin gallat	11.04
Kafeik asit	461.85
P-Kumarik asit	12.96
Trans-Ferulik asit	185.19
Trans-İsoferulik asit	26.43
Dimetoksisinnamik asit	149.73
Kuersetin	280.35
Trans-Sinamik asit	84.84
Naringenin	752.01
Apigenin	270.51
Kaemferol	177.90
Krisin	1203.75
Pinosembrin	2811.00
Galangin	3843.63
Kafeik asit fenetil ester (CAPE)	5157.48
Trans-Kalkon	2640.54

4.1.3. AS'nin Kimyasal Bileşimi

Çalışmamızda AS'nin kimyasal bileşimlerini belirlemek için Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) 12824'e göre analiz uygulanmıştır. Analiz edilen AS

örneğin genel olarak yapısında proteinler, lipitler, karbonhidratlar, lipit içeriği ve şekerler tespit edilmiştir (Tablo 3).

Yapılan analizde ayrıca AS bileşenlerinden 10-hidroksi- α -2-dekonoik asit (10-HAD) olarak adlandırılan pek çok bakteri ve fungusa karşı antibiyotik etki gösteren bir madde bulunduğu belirlenmiştir. AS için en önemli kalite faktörlerinde birisi olan ve kütleye en az %1.40 ve üzerinde bulunması gereken 10-HAD'ın miktarı %2.39 olarak bulunmuş olup uygun şartlarda üretilmiş AS olduğu kanıtlanmıştır. AS'nin kimyasal bileşimi üretildiği zamana, yöreye, AS'nin üretiminde kullanılan kolonilerin ırkına ve beslenme şartlarına bağlı olarak önemli düzeyde değişim göstermektedir.

Tablo 3. AS'nin Kimyasal Bileşimi

İçerik	Miktarı-Birimi
Nemli içerik	%63.3
10-Hidroksi-2- Dekanik asit (10-HAD)	%2.39
Protein	%14.6
Toplam şeker	%11.7
Fruktoz	%5.2
Glukoz	%4.8
Sukroz	%1.7
Toplam asitlik (mL 1N NaOH/100g)	%36.5
Toplam lipitler	3.3 mL

4.2. Arı Ürünlerinin Sitotoksik Potansiyeli

Araştırmada kullanılan arı ürünlerinin sitotoksik potansiyelleri XTT yöntemi ile değerlendirildi ve hücreler üzerinde toksik etki göstermeyen en yüksek üç konsantrasyon *in vitro* *E. intestinalis* sporları üzerinde etkisinin değerlendirilmesi için kullanıldı.

4.2.1. Bal Örneklerinin Sitotoksik Potansiyeli

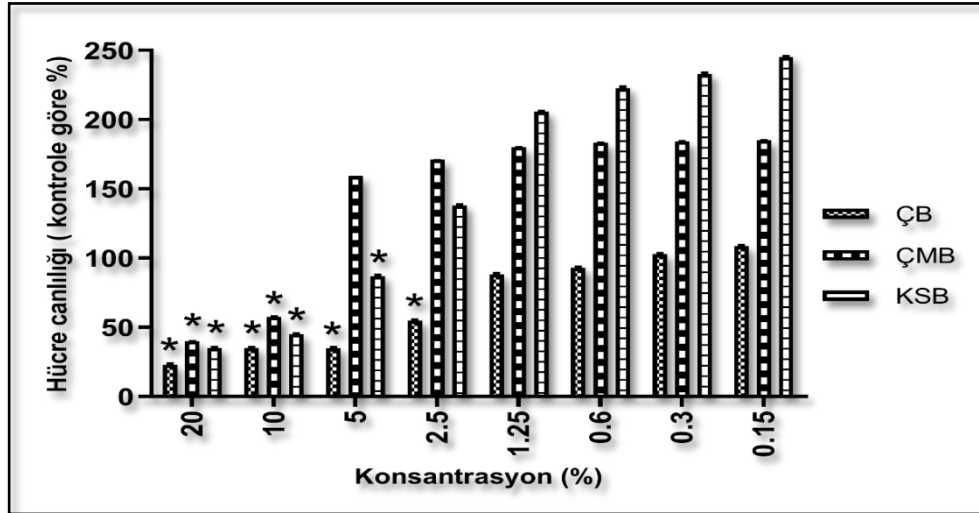
Sitotoksosite sonuçlarına göre, %1.25, %0.6, %0.3 w/v konsantrasyonlarında ÇB'nin toksik etki göstermediği ve bu konsantrasyonlardaki canlılık oranlarının

istatistiksel olarak kontrol grubuyla anlamlı bir fark göstermediği tespit edildi ($p>0.05$). Ancak, %20, %10, %5, %2.5 w/v konsantrasyonlarındaki canlılık oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.05$), bu nedenle bu konsantrasyonlar sitotoksik olarak değerlendirildi.

ÇMB'nin %5, %2.5, %1.25 w/v konsantrasyonları hücreler üzerinde toksik etki göstermedi ve bu konsantrasyonlardaki canlılık oranları kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlı farklı değildi ($p > 0.05$). Bununla birlikte, %20, %10 w/v konsantrasyonlarındaki canlılık oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0.05$), bu nedenle bu konsantrasyonlar sitotoksik olarak değerlendirildi.

KSB'de ise %2.5, %1.25, %0.6 w/v konsantrasyonları hücreler üzerinde toksik etki göstermedi ($p>0.05$). Sitotoksik olarak değerlendirilen, %20, %10, %5 w/v konsantrasyonlarındaki canlılık oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0.05$).

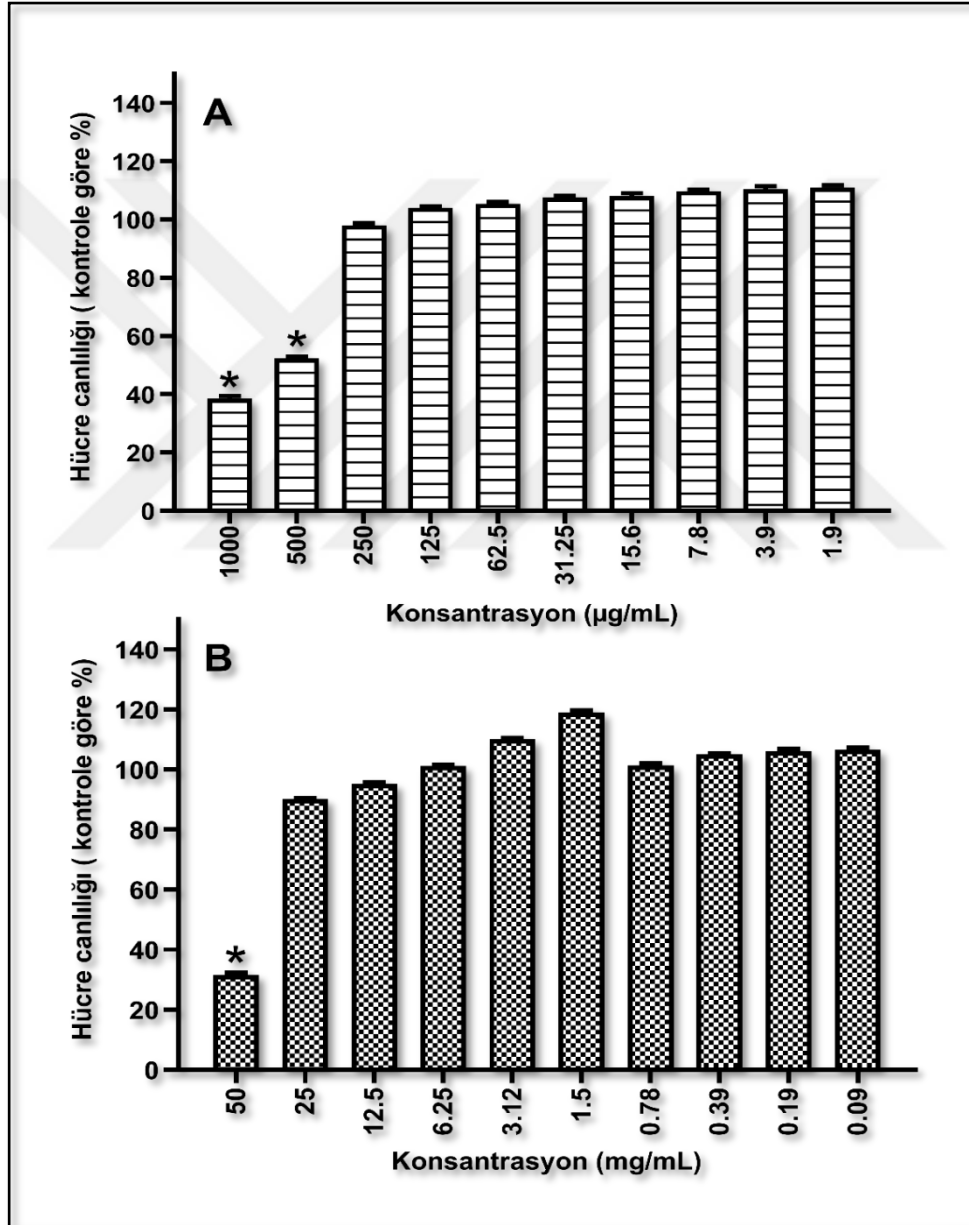
Şekil 12'de ÇB, ÇMB ve KSB'nin seri sulandırımrlarla hazırlanan %20-0.035 w/v arasındaki on farklı konsantrasyonun XTT yöntemi ile HEK-293 hücreleri üzerine *in vitro* sitotoksitesi görülmektedir.



Şekil 12. ÇB, ÇMB ve KSB'nin %20, %10, %5, %2.5, %1.25, %0.6, %0.3, %0.15, %0.075, %0.035 w/v konsantrasyonların XTT yöntemi ile HEK-293 hücreleri üzerine *in vitro* sitotoksitesi. * $p<0.05$ vs kontrol.

4.2.2. PROP ve AS Örneklerinin Sitotoksik Potansiyelleri

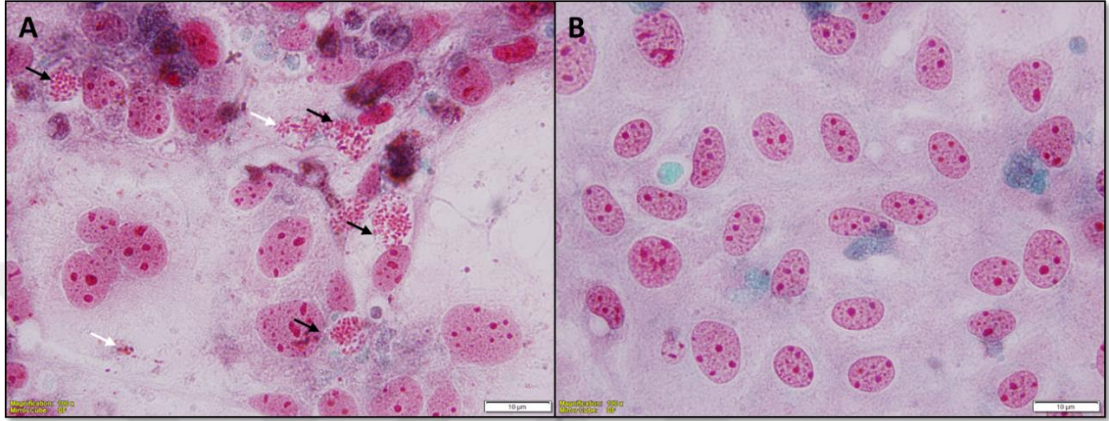
PROP'un 250, 125, 62.5 µg/mL konsantrasyonları HEK-293 hücreleri üzerinde toksik etki göstermedi ($p>0.05$); ancak, 1000, 500 µg/mL konsantrasyonlarındaki canlılık oranı kontrol ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$), bu konsantrasyonlar sitotoksik olarak değerlendirildi (Şekil 13A.). AS'nin 25, 12.5, 6.25 mg/mL konsantrasyonları HEK-293 hücreleri üzerinde toksik etki göstermedi ($p>0.05$) (Şekil 13B).



Şekil 13. PROP (250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 µg/mL) (A) ve AS'nin (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.5, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09 mg/mL) (B) *in vitro* sitotoksitesi. * $p<0.05$ vs kontrol.

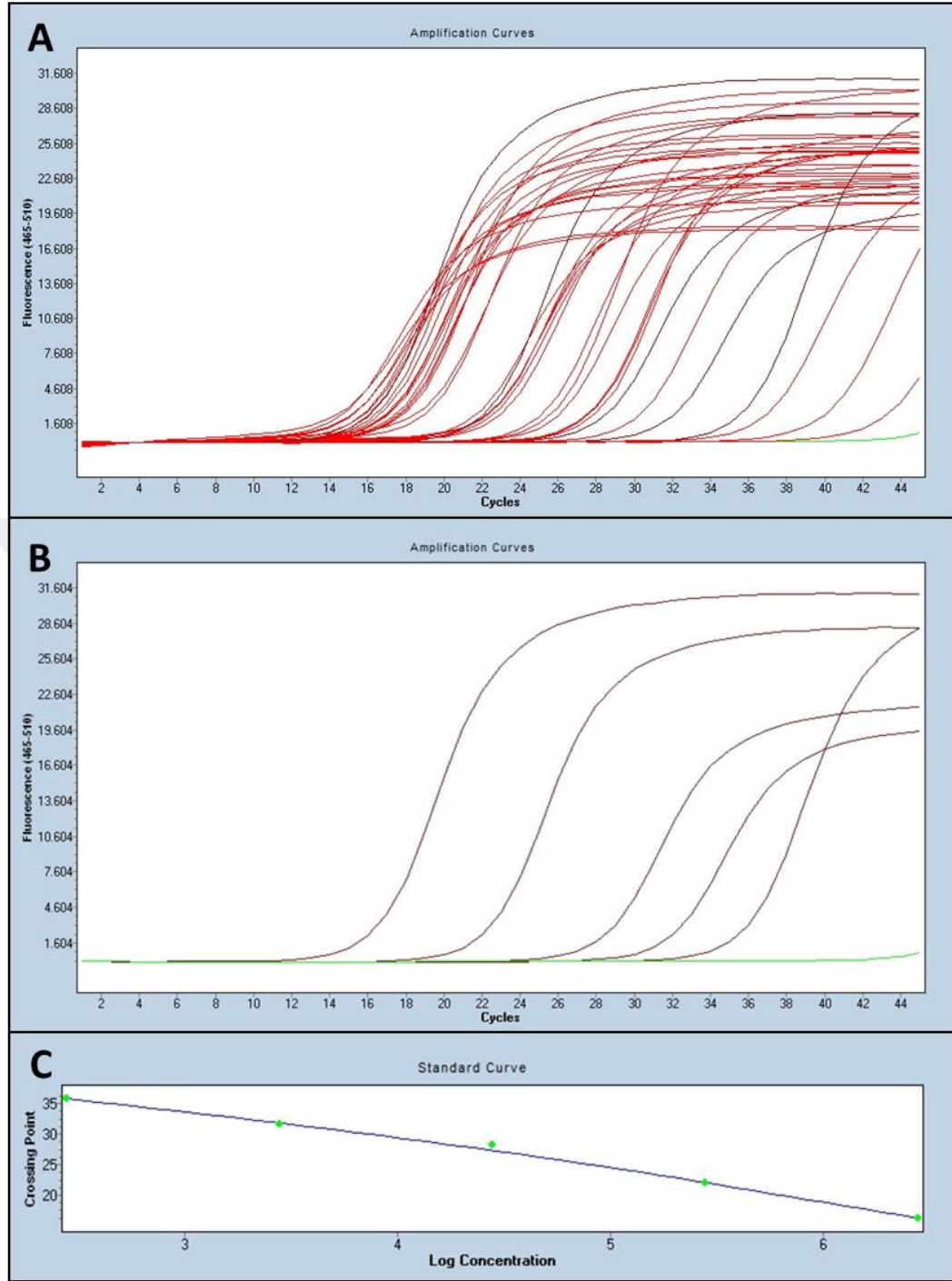
4.3. Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

Parazit yükünün değerlendirilmesi qRt-PCR ve thoma lamı yöntemi ile yapılmıştır. Buna ek olarak, araştırmada kullanılan arı ürünlerinin *E. intestinalis* sporlarına etkisini görselleştirmek için hazırlanan preparatlardan hazırlanan mikrofotograflar kontrolle kıyaslanarak (Şekil 14) değerlendirilmiştir.

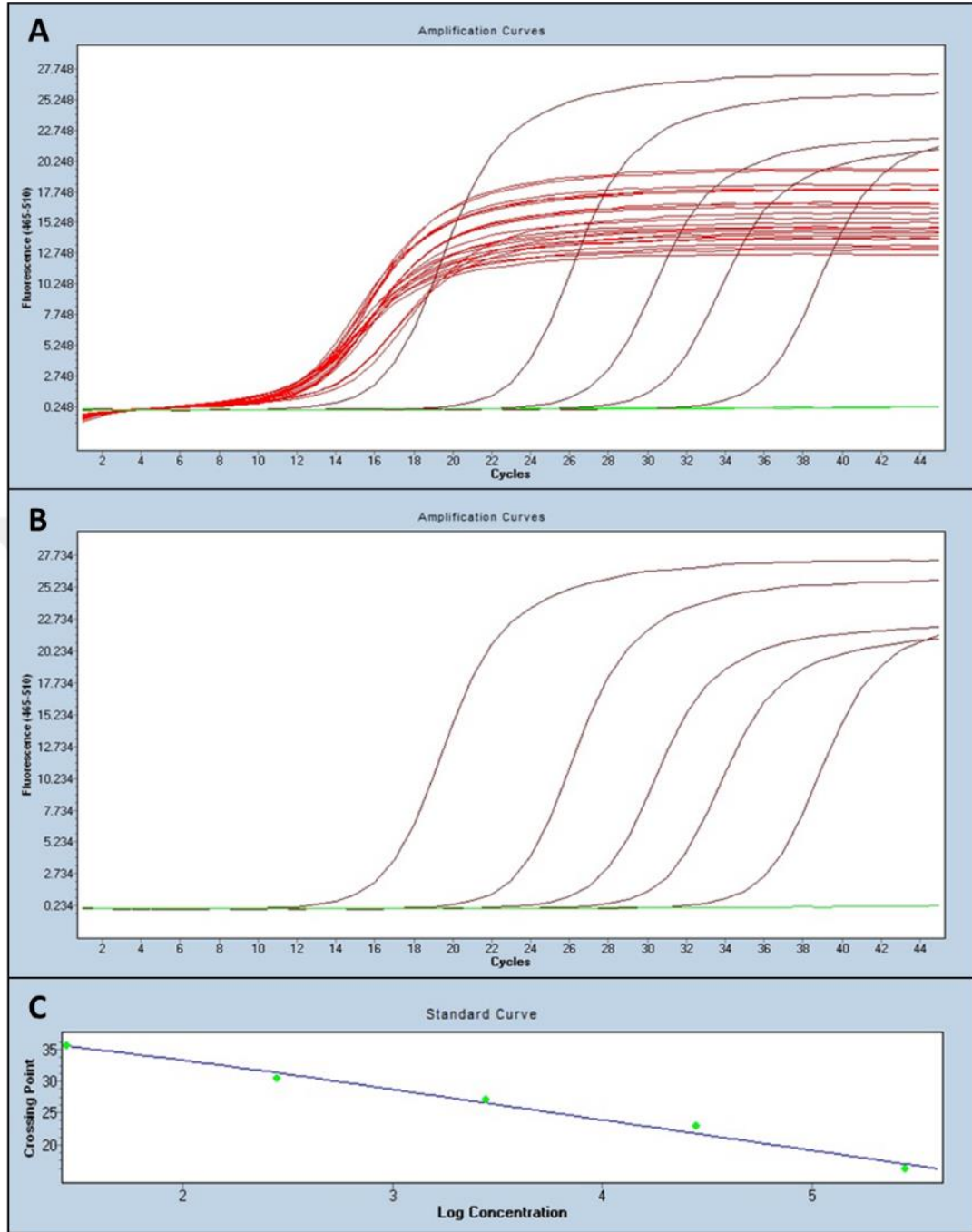


Şekil 14. Arı ürünleri olmadan *E. intestinalis* yoğunluğunun (A) ve sadece HEK-293 hücrelerinin (B) on günlük inkübasyon dönemi sonrasında trikrom ile boyanmış görüntüleri.

Arı ürünlerinin qRt-PCR yöntemi ile *E. intestinalis* sporları üzerine etkisini değerlendirmek için, *E. intestinalis* 16S SSU rRNA bölgesinin plazmid kodlamasından hazırlanan seyreltme serileri kullanıldı. Ana stoğun kopya sayısı 2.8×10^6 olarak hesaplandı Ana stoktan 10'ar kat sulandırılarak 5 dilüsyon hazırlandı. Şekil 15'de ÇB, PROP ve AS'nin Şekil 16'da ise ÇMB, KSB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının qRt-PCR sonuçları görülmektedir.



Şekil 15. ÇB, PROP ve AS'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarıyla muamele edilen *E. intestinalis* yükünün qRt-PCR sonuçları. ÇB, PROP ve AS'nin amplifikasyon grafiği (A); Standart grafik (B); Standart eğri (C).



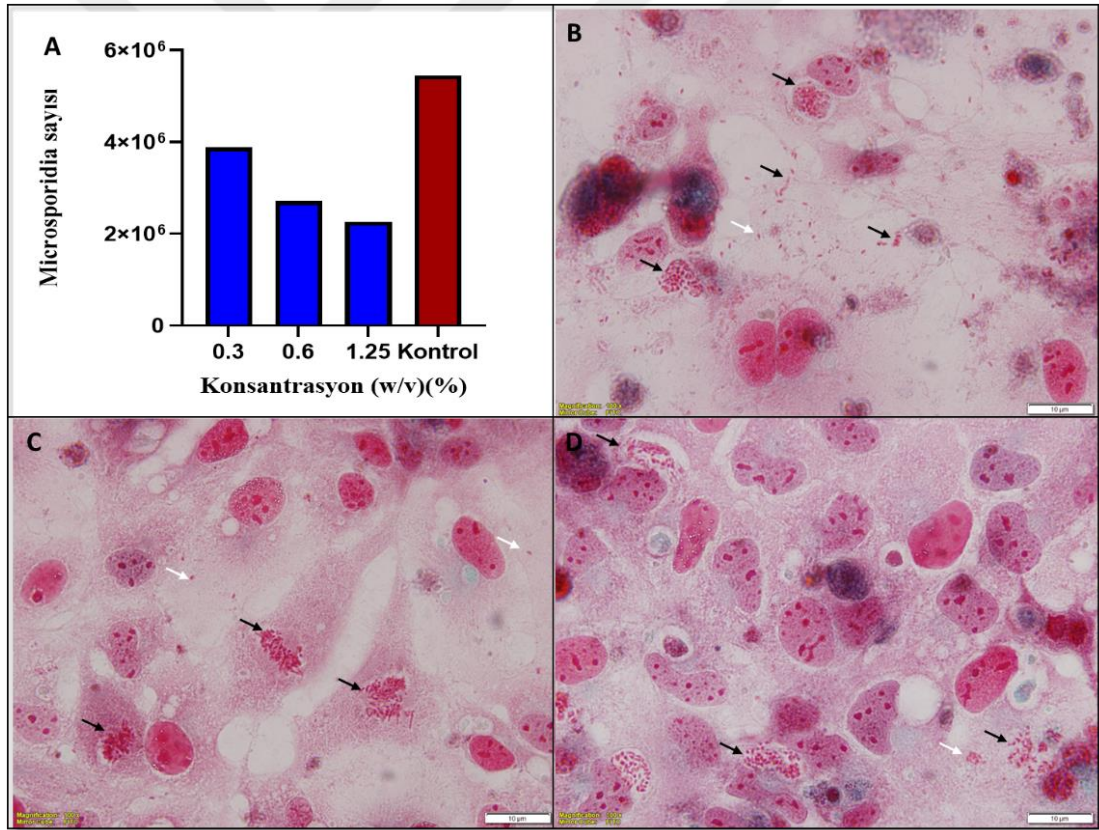
Şekil 16. ÇMB ve KSB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarıyla muamele edilen *E. intestinalis* yükünün qRt-PCR sonuçları. ÇMB ve KSB'nin amplifikasyon grafiği (A); Standart grafik (B); Standart eğri (C).

4.3.1. Bal Örneklerinin Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

qRt-PCR Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

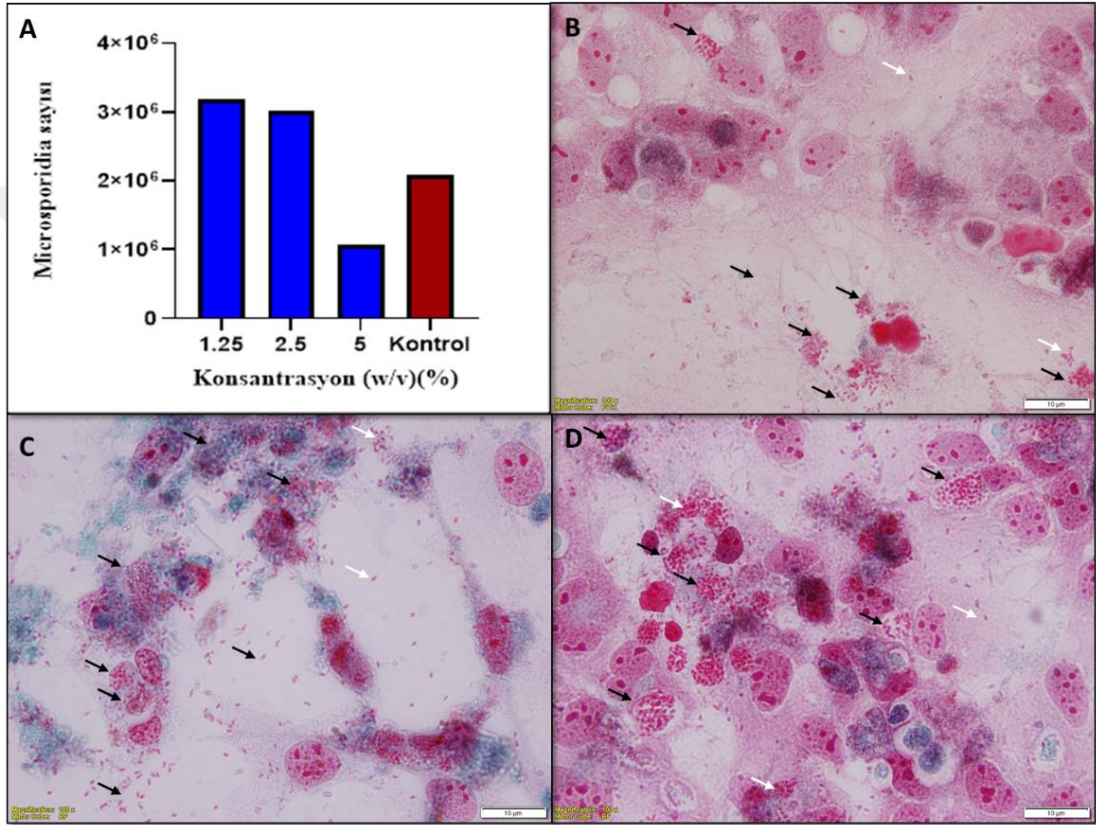
Araştırmada, qRt-PCR yöntemi ile *E. intestinalis* üzerine etkisi değerlendirilen üç bal türünden ÇB'nin bütün konsantrasyonları ve ÇMB'nin %5 (w/v) konsantrasyonu inhibitor etki göstermiş olup, bal örneklerinin diğer konsantrasyonları proliferatif etki göstermiştir.

İstatistiksel olarak, bağımsız iki örneklem t testi sonuçlarına göre, ÇB'nin tüm konsantrasyonları, kontrol grubuna kıyasla *E. intestinalis* sporları üzerinde doza bağlı inhibitör etki sergilemiştir ($p<0.05$). ÇB'nin *in vitro* etkisi değerlendirilen, sitotoksik olmayan en yüksek üç konsantrasyonu olan %1.25, %0.6 ve %0.3 (w/v) konsantrasyonları sırasıyla %58.4, %50.1, %28.7 inhibisyon etki göstermiştir (Şekil 17).



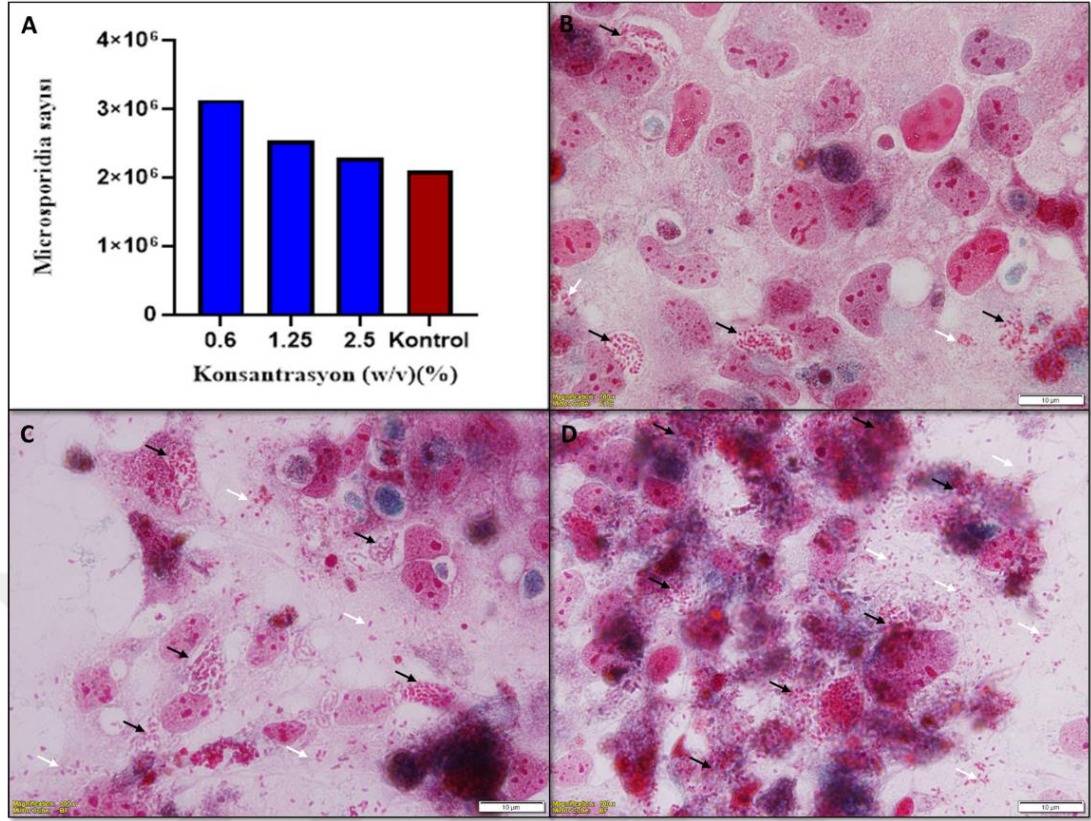
Şekil 17. ÇB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyondan sonra *E. intestinalis* sporları üzerindeki *in vitro* etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi (A). %1.25 (w/v) (B), %0.6 (w/v) (C) ve %0.3 (w/v) (D) konsantrasyonlardaki *E. intestinalis* yoğunluğunun on günlük inkübasyon dönemi sonrasında trikrom ile boyanmış görüntüleri.

ÇMB’de değerlendirilen üç konsantrasyondan sadece en yüksek konsantrasyon olan %5 (w/v), kontrol grubuna kıyasla *E. intestinalis* sporlarının çoğalması üzerinde inhibitör etki sergilemiştir ($p<0.05$). Bu konsantrasyonda kontrole göre %49.2 inhibisyon tespit edilmiştir. Diğer iki konsantrasyon *E. intestinalis* sporlarının proliferasyonunu arttırmıştır. ÇMB’nin %2.5 (w/v) konsantrasyonu %44.0, %1.25 (w/v) konsantrasyonu ise %52.5 *E. intestinalis* sporları üzerine proliferatif etki göstermiştir (Şekil 18).



Şekil 18. ÇMB’nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi (A). %5 (w/v) (B), %2.5 (w/v) (C) ve %1.25 (w/v) (D) konsantrasyonlardaki *E. intestinalis* yoğunluğunun on günlük inkübasyon süresinin ardından trikrom ile boyanmış görüntüleri.

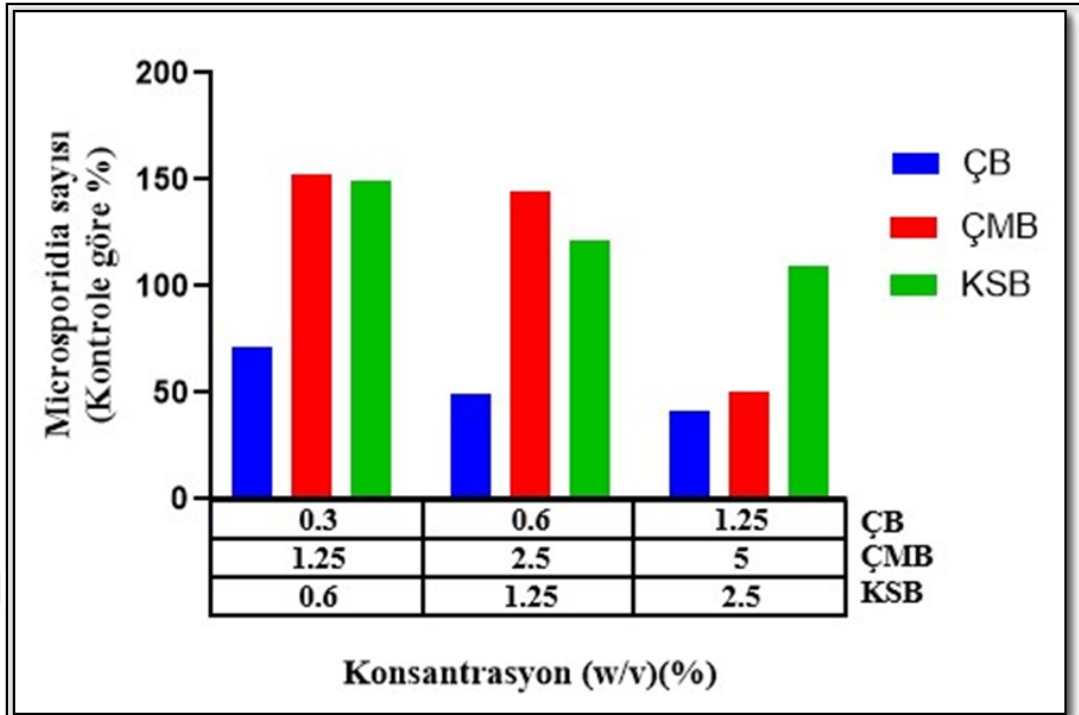
KSB’nin araştırmada değerlendirilen konsantrasyonlarından %1.25 ve %0.6 (w/v) konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla *E. intestinalis* sporları üzerine sırasıyla %21.7 ve %49.9 proliferatif aktivite göstermiştir ($p<0.05$). KSB’nin %2.5 (w/v) konsantrasyonunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 19).



Şekil 19. KSB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi (A). %2.5 (w/v) (B), %1.25 (w/v) (C) ve %0.6 (w/v) (D) konsantrasyonlardaki *E. intestinalis* yoğunluğunun on günlük inkübasyon süresinin ardından trikrom ile boyanmış görüntüleri.

Sonuç olarak, araştırmada kullanılan bal örneklerinden sadece ÇB'nin bütün konsantrasyonları *E. intestinalis* sporları üzerine inhibitor etki göstermiştir. ÇMB ve KSB genel olarak *E. intestinalis* sporlarının proliferasyonunu arttırmıştır.

Araştırmada kullanılan bal türlerinin non-sitotoksik en yüksek üç konsantrasyonunun *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin kontrole göre yüzde canlılık oranları ve ortalama $\text{değer} \pm \text{Ss}$ verileri Şekil 20'de görülmektedir.



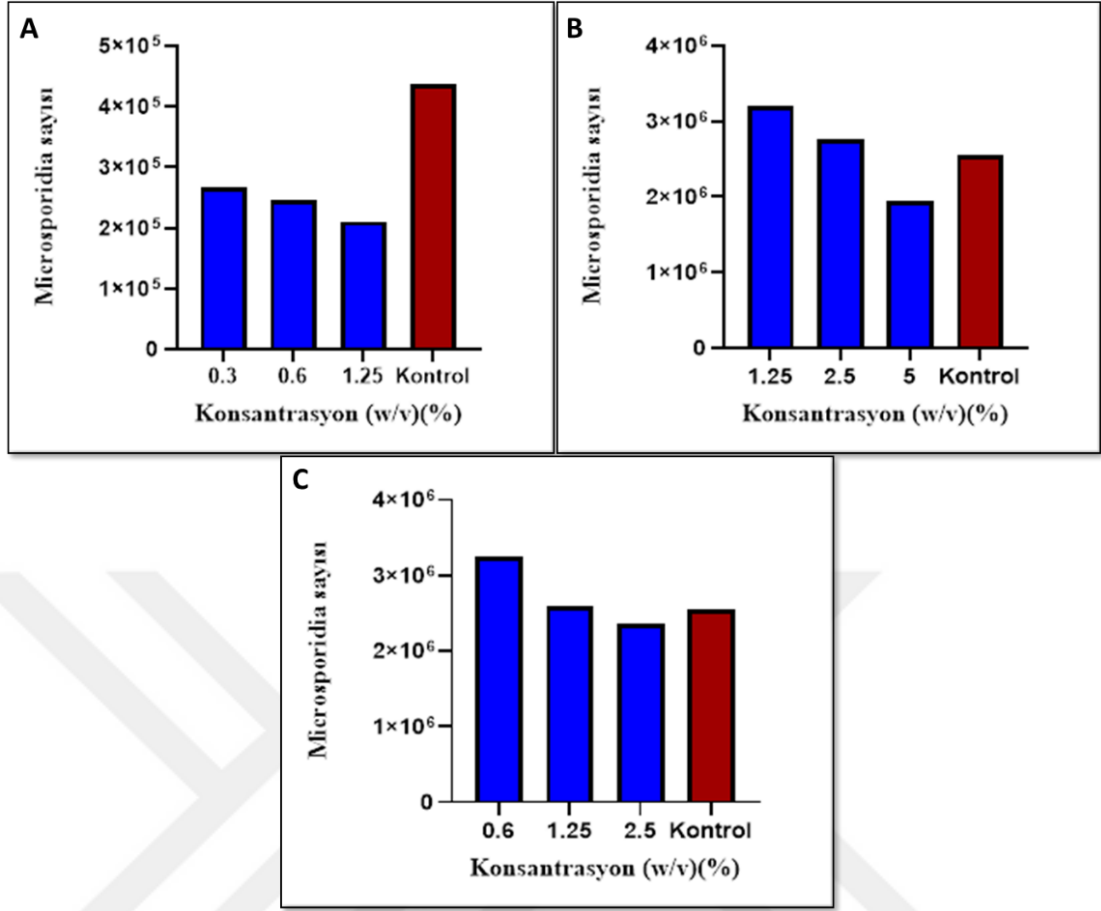
Bal türü	Konsantrasyon (w/v) (%)	Ortalama/Ss	p değeri
ÇB	1.25	2.26 x10 ⁶ ±0.09x10 ⁶	0,001*
	0.6	2.72 x10 ⁶ ±0.37x10 ⁶	0,001*
	0.3	3.88 x10 ⁶ ±0.54x10 ⁶	0,017*
Kontrol	5.45 x10 ⁶ ±0.42x10 ⁶		
ÇMB	5	1.06 x10 ⁶ ±0.18x10 ⁶	0,01*
	2.5	3.01x10 ⁶ ± 0.13x10 ⁶	0,01*
	1.25	3.19x10 ⁶ ±0.18x10 ⁶	0,01*
KSB	2.5	2.28x10 ⁶ ±0.21x10 ⁶	0,202
	1.25	2.54x10 ⁶ ±0.17x10 ⁶	0,011*
	0.6	3.13x10 ⁶ ±0.03x10 ⁶	0,001*
Kontrol	2.09 x10 ⁶ ±0.05x10 ⁶		

Şekil 20. ÇB, ÇMB ve KSB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi ile elde edilen verilerin kontrole göre yüzde canlılık oranları, ortalama değer±Ss ve p değerleri.

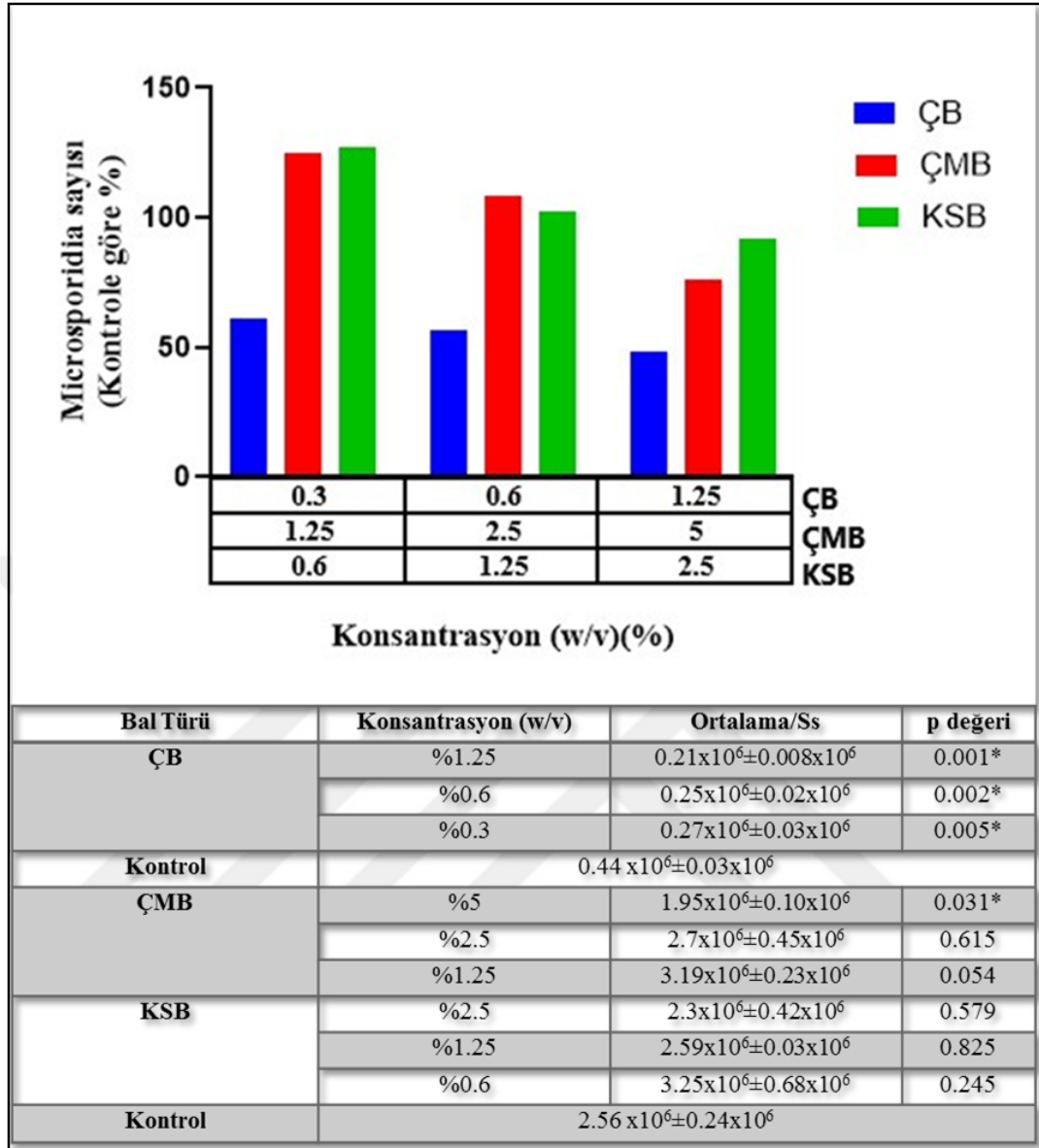
Thoma Lamı Sayım Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

Araştırmada, *E. intestinalis* üzerine etkisi değerlendirilen üç bal türünün thoma lamı sayım yöntemi ile qRt-PCR yöntemi ile değerlendirme sonuçları karşılaştırıldığında, ÇB'de istatistiksel olarak benzer sonuçlar elde edilmişken, ÇMB ve KSB'de farklı sonuçlar elde edilmiştir. ÇB'de, *E. intestinalis* üzerine etkisi değerlendirilen %1.25, %0.6 ve %0.3 (w/v) konsantrasyonları sırasıyla %51.9,

%43.5, %38.9 oranlarında inhibisyon etkisi göstermiştir (Şekil 21.A). ÇMB’de değerlendirilen üç konsantrasyondan sadece en yüksek konsantrasyon olan %5 (w/v)’de kontrol grubuna kıyasla *E. intestinalis* sporlarının çoğalması üzerinde inhibisyon etkisi gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Bu konsantrasyonda, kontrole göre %23.6 inhibisyon tespit edilmiştir. Diğer iki konsantrasyonda ise kontrol grubuna göre *E. intestinalis* sporları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiş olup, bu konsantrasyonlarda qRt-PCR yöntemiyle elde edilen verilerden farklı sonuçlar elde edilmiştir ($p>0.05$) (Şekil 21.B). KSB’nin araştırmada değerlendirilen konsantrasyonlarında ise kontrol grubuna kıyasla *E. intestinalis* sporları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiş olup, %2.5 (w/v) konsantrasyonu hariç yine veriler qRt-PCR yöntemiyle elde edilen verilerden farklılık göstermiştir ($p>0.05$) (Şekil 21.C). Şekil 22’de üç bal türünün araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin thoma sayım yöntemi ile elde edilen verilerin kontrole göre yüzde canlılık oranları, ortalama $\text{değer} \pm \text{Ss}$ verileri ve p değerleri görülmektedir.



Şekil 21. ÇB (A), ÇMB (B) ve KSB'nin (C) araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin thoma sayım yöntemi ile değerlendirmesi.

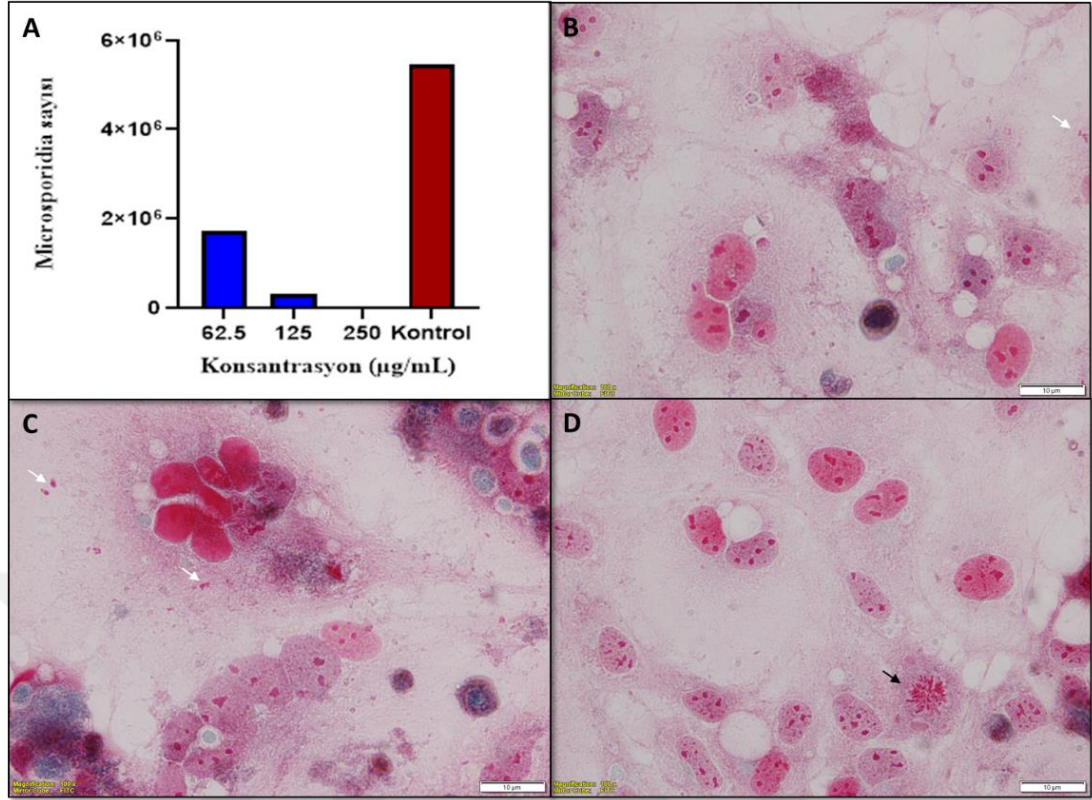


Şekil 22. ÇB, ÇMB ve KSB'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin thoma lamı sayım yöntemi ile elde edilen verilerin kontrole göre yüzde canlılık oranları, ortalama değer±Ss verileri ve p değerleri.

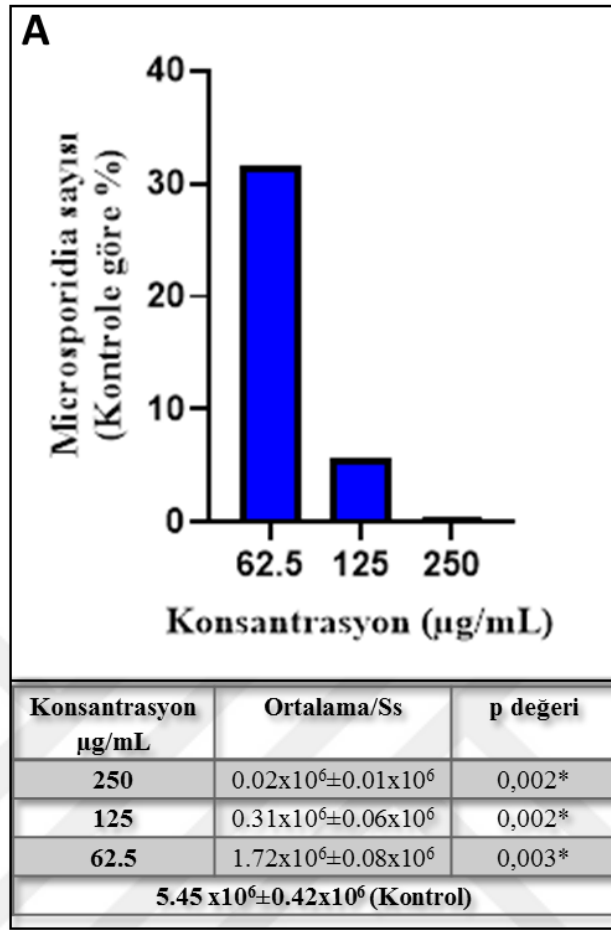
4.3.2. PROP Örneğinin Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

qRt-PCR Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

PROP'un değerlendirilen tüm konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla *E. intestinalis* sporlarının çoğalması üzerinde önemli derecede inhibitör etki sergilemiştir ($p < 0.05$). PROP'un *in vitro* etkisi değerlendirilen, sitotoksik olmayan en yüksek üç konsantrasyonu olan 250, 125, 62.5 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla % 99.62, %94.27 ve %68.4 inhibisyon etki göstermiştir (Şekil 23, 24).



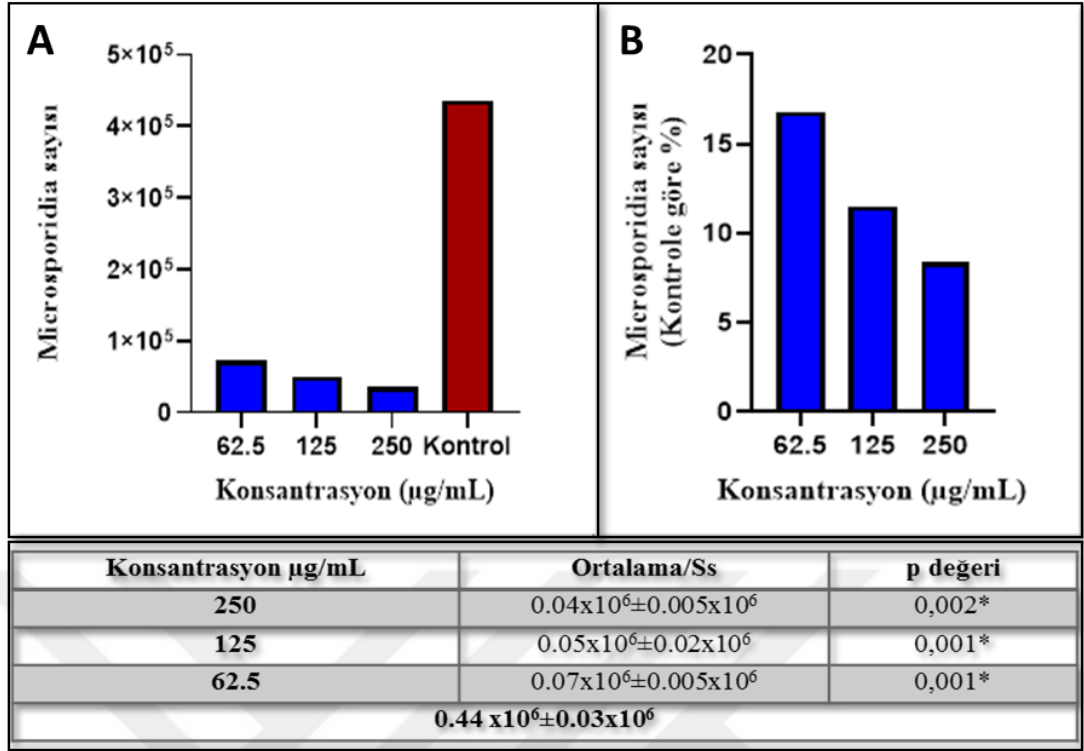
Şekil 23. PROP'un araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından *E. intestinalis* sporları üzerindeki *in vitro* etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi (A). %250 µg/mL (B), %125 µg/mL (C) ve %62.5 µg/mL (D) konsantrasyonlardaki parazit yoğunluğunun on günlük inkübasyon süresinin ardından boyanmış görünüşleri.



Şekil 24. PROP'un araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR ile elde edilen verilerin kontrole göre yüzde canlılık oranları, ortalama değer±Ss ve p değerleri.

Thoma lamı sayım yöntemi ile parazit yükünün değerlendirilmesi

PROP'un değerlendirilen tüm konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla *E. intestinalis* sporlarının çoğalması üzerinde inhibitör etki sergilemiştir ($p<0.05$). PROP'un *in vitro* etkisi değerlendirilen, sitotoksik olmayan en yüksek üç konsantrasyonu olan 250, 125, 62.5 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla % 91.6, %88.5 ve %83.2 inhibisyon etki göstermiştir. Bu sonuçlar qRt-PCR ile elde edilen verilerle büyük oranda benzerlik göstermektedir (Şekil 25).

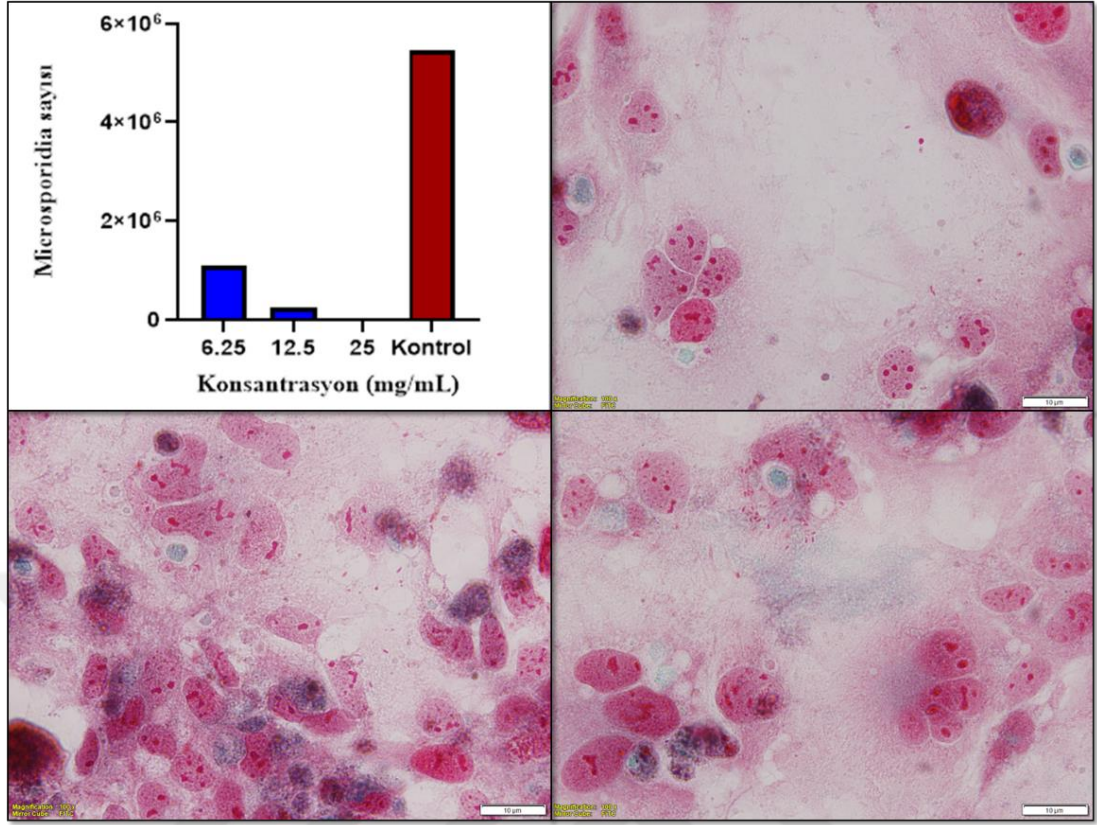


Şekil 25. PROP'un 62.5, 125, 250 µg/mL konsantrasyonlarında on günlük inkübasyondan sonra *E. intestinalis* sporları üzerine *in vitro* etkilerinin thoma lamı ile sayım yöntemi ile değerlendirmesi. Kontrole kıyasla *E. intestinalis* spor sayıları (A), Kontrole göre yüzde canlılık oranları (B).

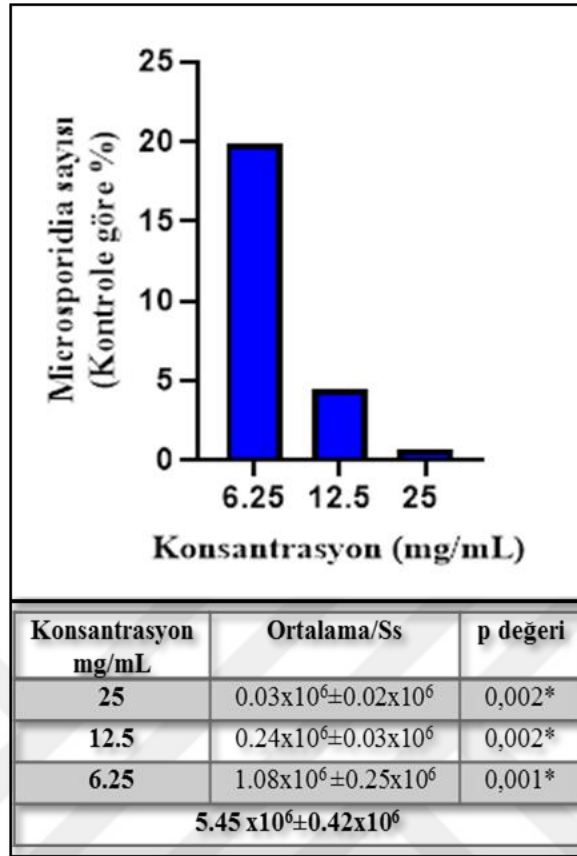
4.3.3. AS Örneğinin Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

qRt-PCR Yöntemi ile Parazit Yükünün Değerlendirilmesi

AS'nin tüm konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla *E. intestinalis* sporlarının çoğalması üzerinde inhibitör etki sergilemiştir ($p < 0,05$). AS'nin değerlendirilen sitotoksik olmayan en yüksek üç konsantrasyonu olan 25, 12.5, 6.25 mg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %99.35, %95.5, %80.16 antimicrosporidial etki göstermiştir (Şekil 26, 27).



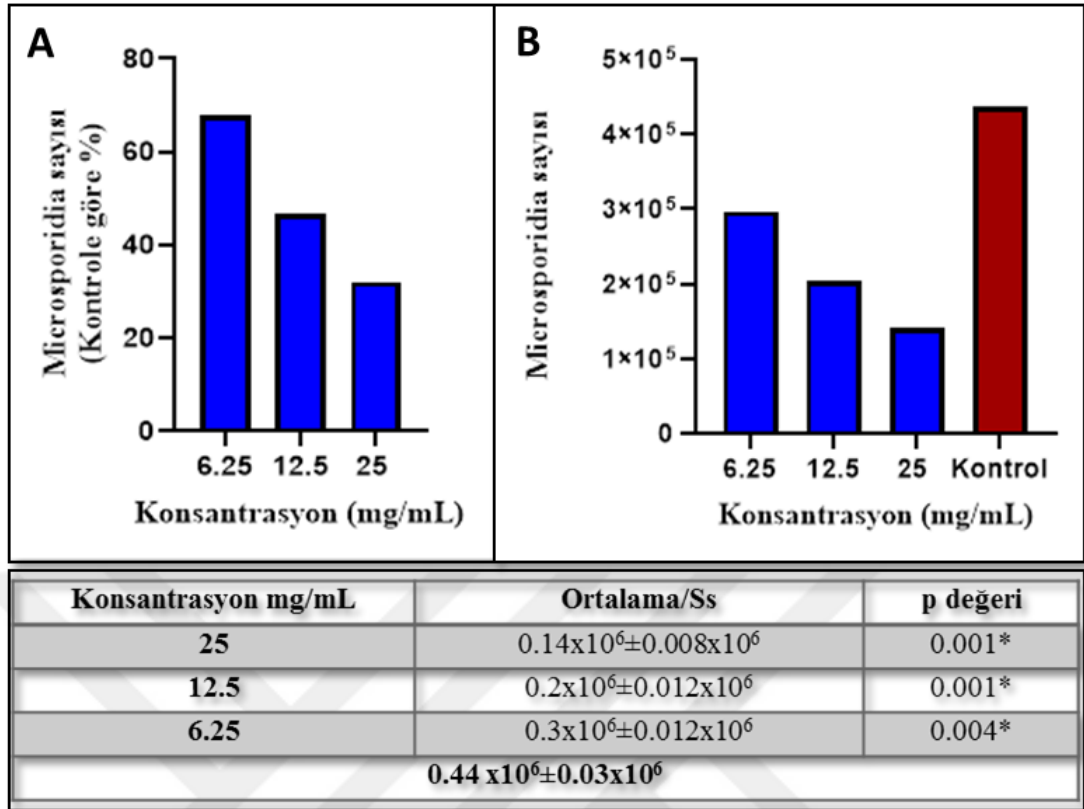
Şekil 26. AS'nin araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının on günlük inkübasyon süresinin ardından *E. intestinalis* sporları üzerindeki *in vitro* etkilerinin qRt-PCR değerlendirmesi (A). 25 mg/mL (B), 12.5 mg/mL (C) ve 6.25 mg/mL (D) konsantrasyonlardaki parazit yoğunluğunun on günlük inkübasyon süresinin ardından boyanmış görüntüleri.



Şekil 27. AS'nin, araştırmada kullanılan konsantrasyonlarının *E. intestinalis* sporları üzerindeki etkilerinin qRt-PCR ile elde edilen verilerin kontrole göre yüzde canlılık oranları, ortalama değer±Ss ve p değerleri.

Thoma lamı sayım yöntemi ile parazit yükünün değerlendirilmesi

AS'nin araştırmada değerlendirilen konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla *E. intestinalis* sporları üzerinde inhibitör aktivite sergilemesine rağmen inhibisyon oranı qRt-PCR ile kıyaslandığında düşük oranda kalmıştır. Thoma lamı yöntemi ile değerlendirilen 25, 12.5, ve 6.25 µg/mL konsantrasyonları sırasıyla %67.9, %53.4 ve %32 inhibisyon etki göstermiştir (Şekil 28). Buna karşın, qRt-PCR yönteminde ise sırasıyla %99.35, %95.5, %80.16 antimicrosporidial etki göstermiştir.



Şekil 28. AS'nin 25, 12.5, 6.25 mg/mL konsantrasyonlarında on günlük inkübasyondan sonra *E. intestinalis* sporları üzerine *in vitro* etkilerinin thoma lamı ile sayım yöntemi ile değerlendirmesi. Kontrole kıyasla *E. intestinalis* spor sayıları (A), Kontrole göre yüzde canlılık oranları (B).

5. TARTIŞMA

Paraziter enfeksiyonlar tüm dünyada özellikle, subtropikal, tropikal ve ılıman iklimlere sahip ülkelerde hala en önem arzeden halk sağlığı sorunları arasındadır (Sunyoto et al., 2018). Microsporidia türleri, neredeyse tüm omurgasızlar ve omurgalılar dahil olmak üzere son derece geniş bir konak aralığına sahip zorunlu hücre içi parazitlerdir (Luo et al., 2021). Yaşam döngüleri proliferatif bir merogonik aşamayı ardından karakteristik olarak küçük (1-4 µm), çevreye dirençli, enfektif sporlarla sonuçlanan sporogonik bir aşamayı içerir (Fayer, 2004). Bu parazitlerin insanlarda oluşturduğu enfeksiyonlar, genellikle kendini sınırlar veya asemptomatiktir, ancak immün yetmezliği olan AIDS'li hastalarda, organ nakli sonrası hastalar ile immün baskılayıcı ilaçlar veya immün modülatör antikorlar alan hastalarda ciddi enfeksiyon etkenleri olarak karşımıza çıkarlar. (B. Han & L. M. Weiss, 2017). Microsporidia türleri en yaygın olarak ishale yol açmakla birlikte, ensefalit, oküler enfeksiyon, sinüzit, miyozit veya yayılmış enfeksiyon etkeni de olabilmektedirler (Weber et al., 1994). *E. bienersi* immün yetmezliği olan bireylerde gastrointestinal hastalığa neden olduğu en sık bildirilen türdür ve bunu *E. intestinalis* takip etmektedir (García-Torres et al., 2018). Çiftlik hayvanları en sık tanımlanan rezervuar konaklardır. Bulaşma spor içeren hayvan dışkılarından ve atık sulardan veya sporla kontamine olmuş hayvancılık ürünlerinden meydana gelebilmektedir (Li et al., 2020). Microsporidiosis tedavi etmek için çeşitli tıbbi rejimler kullanılmıştır, ancak tedavinin sonuçları hayal kırıklığından ümit vericiye kadar değişmektedir. Microsporidia bir zamanlar "ilkel" protozoa olarak kabul edildiğinden birçok anti-protozoan ilaçlar terapötik ajan olarak test edilmiştir. Bu anti-protozoan ilaçların çoğu microsporidiosis tedavisinde etkili olmamıştır. Yaygın olarak kullanılan antiprotozoan ve antibakteriyel ajan trimetoprim sülfametoksazol, *E. bienersi* veya *E. intestinalis*'e karşı minimum aktiviteye sahiptir (Conteas et al., 2000). Metronidazolün *E. intestinalis*'in çimlenmesini inhibe ettiği *in vitro* gösterilmiş olsa da, klinik çalışmalar microsporidiosis karşı etkisiz olduğunu göstermiştir (He et al., 1996). Microsporidiosis tedavisi için şu anda onaylanmış ilaçlar, sırasıyla β -tubulin ve MetAP2'yi hedefleyen albendazol ve fumagillindir. İyi çalışılmış bu iki hedefin dışında microsporidiosis ilacının geliştirilmesi için daha fazla terapötik hedefe ihtiyaç vardır. Literatürde benzer çalışmaların bulunmaması nedeni ile araştırmadaki

temel amacımız insanları enfekte eden en yaygın parazit sınıfı olan protozolardan *E. intestinalis* spoları üzerinde ÇB, ÇMB ve KSB, PROP ve AS'nin *in vitro* etkilerini değerlendirmektir.

Arı ürünleri, geleneksel şifa uygulamalarında uzun süredir kullanılmaktadır ve yapılan çalışmalar, bu ürünlerin antikanser, antibakteriyel, antiviral ve antiparaziter özellikler sergilediğini göstermektedir. Arı ürünlerinde bulunan bazı kimyasal bileşiklerin kanser ve mikrobiyal hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalığı tedavi etmede etkili olduğu belirtilmektedir. Son gelişmeler ve araştırma araçlarının geliştirilmesiyle birlikte, bal, PROP, arı poleni, AS, arı ekmeği, bal mumu ve arı zehiri gibi arı ürünleri üzerinde kanser ve bulaşıcı hastalıkların yönetimiyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Mevcut literatür, arı ürünlerinin kanser ilerlemesini hafifletme, bakteriyel ve viral proliferasyonu inhibe etme ve parazitlerle ilgili semptomları hafifletme konusundaki etkinliğini doğrulamaktadır.

Son yıllarda, arı ile ilgili ürünlerin farmakolojik ve kimyasal özelliklerinin taranmasına büyük bir ilgi olmuştur (Cauich-Kumul & Campos, 2019). Arı ile ilgili ürünler dünya çapında birçok toplulukta bazı bulaşıcı hastalıkların tedavisi için geleneksel olarak bitkisel ilaçlar olarak popüler bir şekilde kullanılmaktadır (El-Guendouz et al., 2019). Çeşitli araştırmalar, arı ürünlerinin schistosomiosis, trypanosomiosis, leishmaniasis, toxocariasis, plasmodiosis, toxoplasmosis, blastocystis enfeksiyonu, amebiosis, giardiosis, cryptosporidiosis, echinococcosis gibi birçok bulaşıcı hastalığın tedavisinde bilimsel olarak etkili olduğunu göstermiştir (F. Nainu et al., 2021). Arı ürünlerinin iyileştirici özellikleri doğrudan kimyasal bileşenleriyle ilişkilendirilmiştir. Ancak, arı ürünlerinin kimyasal bileşenleri karmaşıktır ve antiparaziter aktivitelerindeki bölgesel varyasyonlar, botanik kaynaklarına ve coğrafi kökenlerine göre farklılık gösterebilir (Alotaibi et al., 2019; Siheri et al., 2017). Bu nedenle, araştırmada kullandığımız arı ürünlerinin kimyasal içerikleri karakterize edilerek değerlendirilmiştir.

Bal türlerinde %20 w/v'den %0.0375 w/v'ye kadar değişen 10 farklı konsantrasyonda sitotoksik potansiyeli araştırılmış olup, sitotoksik olmayan en yüksek üç konsantrasyonun *E. intestinalis* üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Bal ürünlerinin *E. intestinalis* üzerine *in vitro* etkisi qRt-PCR ve thoma lamı ile sayım yöntemi olmak üzere iki farklı yöntemde değerlendirilmiştir. Bu iki yöntemi

karşılaştırma olanağı bulduğumuz araştırmamızda, bazı arı ürünleri ve konsantrasyonlarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Referans yöntemimiz qRt-PCR ve thoma lamı ile sayım yönteminin birbirine göre avantaj ve dezavantajları olduğu araştırma sürecinde gözlemlenmiştir. Thoma lamı ile sayım yönteminde sporları sayarken, sayım esnasında gözü çok fazla yorması, sporların homojen yayılmayıp kümeleşmesinde dolayı hatalı sayım gibi dezavantajları vardır. Ancak bu yöntemin maliyetinin düşük olması, çabuk sonuç vermesi, yapılışının kolay olması gibi önemli avantajlara da vardır. qRt-PCR yöntemi ise çabuk, duyarlı ve yüksek özelliğe sahipken, maliyetinin yüksek olması, kros reaksiyonlar/nonspesifik DNA amplikasyonları, sterilite, yalancı pozitif/negatif değerlendirme ve deneyimli personel gerektirme gibi dezavantajlara sahip olduğu yine araştırma sürecinde gözlemlenmiştir.

Bal, halk hekimliğinde uzun zamandan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır ve modern araştırmalar *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda balın güçlü biyoaktif bileşikler içerdiğini göstermiştir. Bal üzerine yapılan çalışmalar, bal türlerinin antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra anti-inflamatuar, anti-proliferatif, anti-mutajenik, anti-tümör, anti-glisemik, antioksidan, özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Khataybeh et al., 2023; Sajid & Azim, 2012).

Fenolik bileşikler bitkiler aleminin sahip olduğu en yaygın bileşik gruplarından birisidir (Skibola & Smith, 2000). Bitkilerin meyve, tohum, yaprak ve gövde gibi farklı kısımlarında bulunabilmektedirler (Coşkun, 2006). Bitkilere tat, renk gibi birçok özellik kazandıran fenolik bileşikler aynı zamanda yabancı organizmalara ve UV ışınlar karşı bitkileri koruyan sekonder metabolitlerdir (Shirley, 1996). Bununla birlikte, insan ve hayvanların fenolik bileşikleri içeren bitki ve meyve tüketmeleri sonucunda birçok biyolojik aktiviteler ortaya çıkabilmektedir (Skibola & Smith, 2000). Yapılan çalışmalar sonucunda fenolik bileşiklerin antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiparaziter, antitümoral, antioksidan, antiinflammatuar, immunmodulator, gastroprotektif ve antiülser, antidiyaretik, antispazmodik, kardioprotektif, hepatoprotektif, nöroprotektif, analjezik, antidiyabetik, şelatör ve sedatif etkilerin de içinde olduğu birçok biyolojik aktivitesi rapor edilmiştir (Sorucu, 2015).

Fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidlerden oluşmaktadır. Vanilik, kafeik ve ferulik asitler baldaki hakim fenolik asitlere; kuersetin, isohamnetin,

kamferol ve metoksikamferol ise baldaki hakim flavonoidlere örnek olarak gösterilebilir (Olas, 2020). Bu bileşenler analiz edilen bal türlerimizde de tespit edilmiştir. Bitkilerden gelen nektarlar balda fenolik bileşenlerin kaynağını oluşturur ve baldaki fenolik bileşenlerin çeşidi ve miktarı botanik orijine bağlı olduğu gibi bitkilerin yetiştiği bölgenin ekolojik koşullarına ve aynı zamanda işleme yöntemlerine de bağlıdır (Becerril-Sánchez et al., 2021). Bu nedenle bal türleri arasında fenolik bileşen içeriklerinde farklılar görülmektedir ve bu farklılıklar bal türlerinin biyolojik aktivitelerine de yansımaktadır. Araştırmamızdaki sonuçlarımızda bunu desteklemektedir. Fenolik bileşenlerini incelediğimiz üç bal türünün birbirlerinden farklı içeriğe sahip olduğu tespit edilmiş olup *in vitro* deneylerimizde farklı biyolojik aktiviteler sergilemişlerdir. Fenolik bileşen içeriğinde gözlemlenen farklılıklar arının nektar topladığı bitki türüne, nektarın toplanma metoduna, mevsimsel ve çevresel faktörlere, coğrafi kökenine ve depolama koşullarından kaynaklanmaktadır. LC-HRMS sistemi analizi sonuçlarına ÇB'nin fenolik bileşen içeriğinin ÇMB ve KSB göre daha zengin olduğu gözlemlenmiştir. Ülkemizde üretilen bazı çiçek ve salgı ballarının fenolik asit ve flavonoid profilinin belirlendiği çalışmalarda (Alpat, 2018; Haroun, 2006; Murat, 2024) fenolik bileşen içerikleri ile araştırmamızda kullandığımız bal türlerinin içerikleri niteliksel anlamda genel olarak uyumlu olduğu değerlendirilmiştir.

Arı ürünlerinin flavonoid ve fenolik bileşenleri tarafından kolaylaştırıldığı düşünülen protozoa enfeksiyonlarına karşı etkili olması için önerilen birkaç farmakolojik mekanizması vardır (Dutra et al., 2019; Gomes et al., 2021):

- (1) Reaktif oksijen türleri (ROS) özellikle süperoksit dismutaz ve nitrojen metabolitlerinin üretimi yoluyla paraziti öldüren makrofajların aktivasyonu (Cunha et al., 2020; Emran et al., 2018),
- (2) Etkilenen dokuda anjiyogenezin değişmesi (Cunha et al., 2020; de Miranda et al., 2019),
- (3) Interferon- γ , TNF- α , IL-1, IL-4 ve IL-17 üretimini etkileyerek immünomodülatör etkilerin uyarılması (dos Santos Thomazelli et al., 2017; Yesmin et al., 2020),
- (4) Parazitlerde apoptoz benzeri mekanizmaların uyarılması (Cunha et al., 2020),

(5) Parazitlerde membran bozulması (Menna-Barreto et al., 2009).

Araştırmamızda kullandığımız üç bal türünün fenolik bileşenler açısından farklı içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir. Fenolik bileşen içeriğindeki bu farklılıklar, arının nektar topladığı bitki türüne, nektarın toplanma yöntemine, mevsimsel ve çevresel faktörlere, coğrafi kökene ve depolama koşullarına bağlı olabilir. LC-HRMS sistemi analizi sonuçlarına göre, ÇB'nin fenolik bileşen içeriğinin ÇMB ve KSB'ye kıyasla daha zengin olduğu gözlemlenmiştir. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda, fenolik asit ve flavonoid profilinin belirlendiği çiçek ve salgı ballarının fenolik bileşen içeriklerinin, araştırmamızda kullandığımız bal türlerinin içerikleriyle genel olarak uyumlu olduğu görülmüştür (Alpat, 2018; Haroun, 2006; Murat, 2024).

LC-HRMS analizi sonuçlarına göre, fenolik bileşenler açısından daha zengin içeriğe sahip olan ÇB'nin *E. intestinalis* sporları üzerinde önemli derecede inhibisyon etkisi göstermesinin, ÇB'nin fenolik içeriği ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. ÇB'nin fenolik bileşenleri arasında bulunan ve ÇMB ile KSB içerisinde bulunmayan bazı fenolik bileşenler, önemli biyolojik aktiviteler sergilemektedir. Bu fenolik bileşenler arasında kinik asit, prosiyanidin B2, doksorubisin hidroklorür, arbutin, klorojenik asit, luteolin 7-rutinosid, rosmarinik asit, luteolin ve apigenin bulunmaktadır. Özellikle, kinik asitin diğer bileşenlere göre oldukça yüksek miktarda (2425.507 ppb) olduğu saptanmıştır.

Son yıllarda, doğal antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip ajanlar popüler bir şekilde araştırılmaktadır. Bu bileşenler arasında yer alan kinik asit, birçok yenilebilir meyve ve bitkide bulunan doğal bir fenolik bileşiktir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada, kinik asidin membran akışkanlığını azaltarak geniş spektrumlu antimikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Ercan & Doğru, 2022). Başka bir çalışmada ise, kinik asidin özellikle gıda kaynaklı patojenler üzerinde etkili olduğu ve membran akışkanlığını azaltıp hücre membranına zarar vererek *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Bai et al., 2018). Ayrıca, kinik asidin L-lizin ve peptidoglikan sentezine zarar vererek hücre duvarı sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Bai et al., 2022). Kinik asidin *Pseudomonas aeruginosa*'nın bakteriyel biyofilm oluşumunu önlediği ve *P.*

aeruginosa ile ilişkili enfeksiyonlara karşı kullanılabileceği de rapor edilmiştir (Lu et al., 2021).

Araştırmada kullandığımız bal türlerinden sadece ÇB’de bulunan luteolinin, yapılan araştırmalarda mikobakterilerde FAS-I’i ve DNA helikaz, DnaB, RecBCD (Collins et al., 2019) ve apigeninin DNA girazını inhibe ettiği (Estevinho et al., 2008), klorojenik asitin sitoplazma ve nükleotid sızıntısına neden olan membran geçirgenliğinde de artışa neden olduğu (Górniak et al., 2019) rapor edilmiştir.

Kuersetin, çalışmamızda kullandığımız bal türlerinden en yüksek oranda ÇB’de bulunmaktadır. Kuersetinin antiprotozoan özelliklerine ilişkin araştırmalar son yıllarda araştırmacılar tarafından büyük bir ilgi görmektedir. Araştırmalar, kuersetinin *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp., *Trichomonas* spp. ve *Toxoplasma gondii* gibi geniş bir patojen yelpazesine karşı güçlü antiprotozoan aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır. İmmünomodülatör rollerine ek olarak, kuersetinin mitokondriyal fonksiyonu bozduğu, apoptotik/nekrotik hücre ölümünü indüklediği, demir alımını bozduğu, yağ asidi sentezi ve glikolitik yollarda yer alan çoklu enzimleri inhibe ettiği, DNA topoizomeraazların aktivitesini baskıladığı ve bu patojenlerde çeşitli ısı şok proteinlerinin ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir. (Memariani et al., 2024). Bu özellikleri göz önüne alındığında ÇB’deki kuarsetinin diğer bal türlerine kıyasla daha yüksek konsantrasyonda olmasının *E. intestinalis* spolarının inhibisyonundan sorumlu olabileceği kanısındayız.

Flavonoidlerin *Cryptosporidium parvum* ve *E. intestinalis*’es karşı etkili olduğu hipotezini test etmek için yapılan bir çalışmada, 11 tane flavonoid tek başına veya kombinasyon halinde değerlendirilmiştir. *In vitro* hücre kültürü analizleri kullanılarak, HCT-8 hücreleri veya E6 hücreleri sırasıyla *C. parvum* ve *E. intestinalis* ile enfekte edilerek 1-200 μ M aralığındaki dozlarda bileşiklerle muamele edildiği araştırmada, altı bileşiğin *C. parvum*’a karşı etkili olduğu rapor edilmiştir. Araştırmada kullanılan bileşiklerden, kuersetin ve apigenin, *E. intestinalis*’e karşı sırasıyla 15 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarda, EC₅₀ düzeyinde aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışma sonuçlarına göre, bu bileşiklerin etkinliğini arttırmak için diğer orta derecede aktif ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılabileceği vurgusu yapılmıştır (Mead & McNair, 2006).

Bal türlerinin LC-HRMS sistemi analizi sonuçlarına göre yine sadece ÇB’de görülen prosiyanidin B2, doğal olarak oluşan yenilebilir pigmentlerin en iyi temsil edenlerden biridir. Prosiyanidin B2 çok sayıda biyoaktiviteye sahiptir ve diabetes mellitus, diyabetik komplikasyonlar, ateroskleroz ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı gibi çok çeşitli insan hastalıklarını tedavi etme/önleme potansiyeline sahiptir (Chen et al., 2023). Yalnızca ÇB’de tespit edilebilen bir başka bileşen arbutin antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel özellikler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik aktivite sergilemesinin yanısıra kozmetik ürünlerde ve bitkisel diyet takviyelerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Deisinger, 1996). Çeşitli çalışmalarda arbutinin obeziteyi, alkolik yağlı karaciğer hastalığını, karaciğer hasarını önlediği, oksidatif stresi ve lipid metabolizmasını modüle ettiği de bildirilmiştir (Jiang et al., 2023). Analiz edilen fenolik bileşenlerden rosmarinik asit, keşfedilen ikincil metabolitler arasındadır ve bitkilerde tanımlanan biyoaktif bir bileşiktir. Kanser tedavisinde rosmarinik asit ve türevleri kemopreventif ve kemoterapötik etkiler sergilemiştir. Çeşitli çalışmalarda rosmarinik asitin antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antitümör, antioksidan ve antianjiyogenik etkiler gibi çok sayıda önemli biyolojik etkileri de rapor edilmiştir (Ijaz et al., 2023). Yine araştırma sonuçlarımıza göre sadece ÇB’de tespit edilen flavonoidlerden olan diosmetin; doğada yaygın olarak bulunur ve antiinflamatuvar, antioksidan ve antitümör aktivitelere sahiptir (Ning et al., 2021). Çalışmalarda diosmetinin hücrelerde ROS üretimini ve malondialdehid oluşumunu inhibe ederek güçlü bir antioksidan olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Zhao et al., 2023).

Analiz sonuçlarına göre ÇB’de, ÇMB’ye oranla daha fazla miktarda tespit edilen, KSB’de ise bulunmayan doğal bir fenolik bileşen olan ellagik asit sık sık araştırma konusu olmuş ve antiparaziter etki potansiyeline sahip olduğundan dolayı büyük ilgi görmüştür (Simões-Pires et al., 2009). Milano Üniversitesi’nden bir grup araştırmacı ellagik asidin, *in vitro Plasmodium falciparum*’un klorokine duyarlı ve klorokin dirençli suşlarının proliferasyonunu inhibe ettiğini saptamışlardır. Ellagik asidin antimalaryal etkisinin önerilen bir mekanizması, parazitin hemoglobin parçalanmasının toksik yan ürünlerini nötralize ettiği bir süreç olan, beta-hematin (hemozoin) oluşumunun baskılanması olarak bildirilmiştir (Jiao et al., 2022). Muchtar ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, ellagik asidin, *P. falciparum*’un

sindirim vakuolündeki alkalinizasyonunu indüklediği tespit edilmiş olup, araştırmacılar ellagik asidin, potansiyel olarak antimalaryal etkiye sahip olabileceğini vurgulamışlardır. (Muchtar et al., 2022). Ellagik asidin, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* ve helmintler gibi parazitlerin gelişimini engelleme potansiyeli araştırmalarda gösterilmiştir (Bakar, 2023). Araştırmamızda bal türlerinin fenolik bileşen analizi sonuçlarına göre ellagik asit ÇB’de 166.859 ppb, ÇMB’de 106.43 ppb bulunurken, KSB’de bulunmamaktadır. ÇB’nin tüm konsantrasyonlarının ve ÇMB’nin %5 w/v konsantrasyonu *E. intestinalis* sporları üzerinde inhibitör etki gösterirken, KSB sporlar üzerinde inhibitör etki göstermemesinin nedenleri arasında, bu fenolik bileşenin eksikliğinin rol oynadığı düşünülebilir.

Araştırmamızda kullandığımız üç bal türünün fenolik içeriklerinden ÇB’de daha fazla miktarda görülen fenolik bileşiklerden biride kafeik asittir. Kafeik asit çeşitli mikrobisidal ve immün düzenleyici özelliklere sahip özelliklere sahiptir. Yapılan bir çalışmada; kafeik asidin *in vitro* *Leishmania amazonensis* promastigotları ve enfekte makrofajlar üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Kafeik asitin apoptoz benzeri mekanizmalar yoluyla antipromastigot etkiyi desteklemiştir. *L. amazonensis* ile enfekte makrofajlarda TNF- α , nitrik oksit ve ROS üretimini artırarak, makrofajların aktivitesini güçlendirdiği görülmüştür (da Silva Bortoleti et al., 2019).

ÇB’de ÇMB’ye oranla daha fazla miktarda bulunan bir flavon olan genkvanin *in vitro* ve *in vivo* olarak biyolojik ve farmakolojik araştırmalarda çalışılmış, dikkate değer antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteler sergilemiştir. Genkvanin, glukokinaz aktivasyonu yoluyla, metabolik sendrom ve diyabete karşı potansiyel bir rol ile antihiperglisemik aktivite gösterdiğini bildirilmiştir. Kardiyovasküler hastalık riskini azaltmış ve nörodejeneratif hastalıklara karşı da yardımcı olmuştur. Yine, antitümör, antibakteriyel, antiviral etkiler gibi diğer biyolojik özellikler de araştırmalarda gösterilmiştir. (El Menyiy et al., 2023).

ÇB’nin fenolikasit içeriğinde KSB’ye göre yüksek miktarda bulunan ve ÇMB’de bulunmayan diğer bir bileşen ise kaemferoldur. Diyetle alınan bir flavonoid olan kaemferolün antiparazit etkilere ve çeşitli tıbbi kullanımlara sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada kaemferolün, tek başına ve albendazol ile kombine olarak, farelerde trichinellosisin, bağırsak ve kas evrelerini önleme ve tedavi etmede etkinliği araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, kombine ilaçlarla

tedavi edilen grupta, yetişkinlerin ve keseli larvaların sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş ($p < 0.05$), bağırsak ve kas iltihabında dikkate değer bir iyileşme ve larvaların kapsüler tabakasının kalınlığında bir azalma görülmüştür. Kaemferol-albendazol kombinasyonu, inflamasyonu ve larva kapsül oluşumunu modüle ederek sinerjistik bir etkiye sahip olan bir trichinellosis ilacı olarak umut vaat ettiğini çalışmalarında vurgulamışlardır (Maged et al., 2023).

LC-HRMS sistemi analizi sonuçlarımıza göre, üç bal türünden en fazla ÇB'de bulunan bir başka bileşen ise naringenindir. Bu flavonoid, gıda takviyesi özellikleri yanında, belirli bakteri veya virüslerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek içinde kullanılmıştır. Bazı etki mekanizmaları hala belirsiz olmasına rağmen, naringenin bir anti-inflamatuar, anti-enfektif ajan olarak etki göstermiştir. Çeşitli inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde bir sonraki profilaktik madde olarak potansiyel kullanımı çalışmalarda vurgulamaktadır (Cai et al., 2023).

Bazı balların, fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteleri, birçok araştırmacı tarafından ele alınmıştır. Ancak bu balların antiparaziter aktiviteleri dikkate alındığında, araştırma boşluğu bulunmaktadır (Mohammed et al., 2019). Çalışmamız ile bu alana katkı sağlanmak istenmiştir. ÇB'de *E. intestinalis* sporları üzerinde inhibitör etki gözlemlenirken, genel olarak ÇMB ve KSB'de proliferatif etki gözlemlenmiştir. Bu etki mekanizmalarının anlaşılır olması için bal türlerinin tüm bileşenlerinin aktivite ve sentez mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması gerekmektedir. Bal türlerinin microsporidiosis üzerindeki etkinliğini daha iyi açıklığa kavuşturacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Doğal ve pazarlanan bal örneklerinin anti-acanthamoebic aktivitesini belirlemek için yapılan bir çalışmada, her iki bal numunesinde de flavanoid (ekstrenin gramı başına kuersetin eşdeğeri) ve fenolik asit içerikleri (gram başına gallik asit eşdeğeri) test edilmiştir. Ayrıca, antioksidan aktiviteleri de ölçülmüştür. Araştırma sonuçlarına göre, doğal bal konsantrasyona bağlı olarak güçlü amoebisidal etki sergilemiştir. Doğal bal ile muamele edilen *Acanthamoeba castellanii* trofozoitlerinde acanthopodia kaybı, amiplerin yapıştığı yerden ayrıldığı, yuvarlak bir şekil aldığı, boyutlarının küçüldüğü, sitoplazmik kütesinin azaldığı ve kültür ortamında yüzdükleri gözlenmiştir. Buna karşılık, araştırmada, pazarlanan bal örnekleri doğal bal örnekleri ile kıyaslandığında, *A. castellanii*'ye karşı daha düşük

etkinlik göstermiştir. Bu etkinlik farkını araştırmacılar, kuersetin ölçümleriyle belirlenen flavonoid oranı ve gallik asit ölçümleriyle belirlenen fenolik asit oranının ve antioksidan aktivitenin, pazarlanan balla karşılaştırıldığında doğal balda daha yüksek olmasına bağlamışlardır (Yousuf et al., 2016). Hegazi ve ark. yaptıkları araştırmada, kullandıkları arı ürünlerinin (PROP, bal ve arı zehiri) farklı konsantrasyonlarının, *T. gondii* takizoitleri canlılığı üzerindeki yıkıcı etkisini biyoaktif bileşiklerine, asidik pH'ına ve yüksek şeker içeriğine bağlamışlardır (Hegazi et al., 2014).

Farklı bazı bal örneklerinin, parazitler üzerine etkisi birçok araştırma ile ortaya konmuştur. Sonuç olarak, doğal bir gıda katkı maddesi olan *C. spinosa* balı, *T. gondii* ile enfekte sıçanlara 28 gün boyunca oral olarak verilerek IgM, IgG ve bazı sitokinler araştırılmıştır. Antikor titresini arttırdığı deneysel olarak gösterilmiştir. Ayrıca kontrol grubundaki sıçanlarla karşılaştırıldığında, enfeksiyondan sonraki 7. günde IFN- γ , IL-1 ve IL-6 seviyelerinin istatistiksel olarak daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Hegazi et al., 2017).

Bassam ve ark.'nın 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada *Leishmania major*, *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum* üzerine bal dilüsyonlarının etkinliğini, aynı konsantrasyonlardaki şeker dilüsyonları ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak, bal ve şekerin antileishmanial etkinliğe sahip olduğu, fakat elde edilen sonuçlar ile balın şekerden daha üstün olduğunu ve balın düşük konsantrasyonlarının dahi parazit hareketini engelleme yeteneğinin olduğu sonucuna varılmışlardır (Bassam et al., 1997). Nilforoushzadeh ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, kutanöz leishmaniasis tanımlı hastalarda, Glucantime® enjeksiyonu ile birlikte topikal bal uygulanmış; Glucantime® bal kombinasyonunun, tek başına Glucantime® göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, kutanöz leishmaniasis tedavisinde bu kombinasyonun yeni bir tedavi protokolünün geliştirilmesinde potansiyel bir ajan olabileceğini vurgulamışlardır (Nilforoushzadeh et al., 2007). Benzer şekilde Gholizadeh ve ark. antimon bileşiklerinin kullanımındaki sınırlamalar nedeniyle, destek tedavi ihtiyacını vurguladıkları araştırmalarında *in vitro* ve *in vivo* olarak *L. major* üzerine balın etkisini araştırmışlardır. Araştırmada balın, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Promastigotlar ve makrofajlar için MTT kolorimetrik yöntem kullanılarak IC_{50} hesaplanmış, flow sitometri ile

hücrelerin nekroz ve apoptoz durumları tespit edilmiş ve makrofaj hücreleri içindeki amastigotlar da değerlendirilmiştir. Buna ek olarak, BALB/c farelerinin kuyruklarında deneysel olarak oluşturulan modelde de, balın etkisi *in vivo* olarak araştırılmıştır. Sonuç olarak, 400 µg/mL konsantrasyondaki bal ekstraktının tüm aşamalarda en iyi etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Gholizadeh et al., 2022).

Güvenli ve etkili ilaçların eksikliği hastalığı tedavi etmek için doğal kökenli yeni ilaçlara yönelik araştırmalara katkı sağlamayı hedefleyen bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, *Lucilia sericata* larva atılımı/salgısının (AS) *Apis mellifera* balı ile kombinasyon halinde *L. major* üzerindeki etkileri *in vitro* bir modelde gözlemlenmiştir. Bal ve larval AS fraksiyonlarının çeşitli konsantrasyonları makrofaj J774A.1 hücre hattı kullanılarak hücre içi amastigotlarına ve *L. major* promastigotlarına karşı test edilmiştir. Sonuç olarak, deney grubundaki promastigotların canlılık oranları ve enfekte makrofaj hücresi başına amastigot sayısının negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, *L. sericata*'nın larva ES fraksiyonları *A. mellifera* balı ile kombinasyon halinde *L. major*'e karşı sinerjistik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Sherafati et al., 2023).

Sinha ve ark. giardiosis ve trichomoniosis standart tedavisi olan metronidazol ve tinidazole karşı ilaç direnci ortaya çıkmıştır. Bu nedenle yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaçtan yola çıkarak yapılan araştırmada, *Leptospermum scoparium*'dan elde edilen manuka balının *Giardia* ve *Trichomonas* üzerindeki etkisini *in vitro* olarak metronidazol ve tinidazol ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Araştırma sonucunda, her iki parazitte de standart tedaviye göre manuka balının daha etkili olduğu araştırmada, giardiosis veya trichomoniosis hastalarında ek tedavi olarak kullanılabileceği vurgusu yapılmıştır. (Sinha et al., 2018).

Balın hastalıklarla mücadeledeki potansiyeli göz önüne alındığında yapılan başka bir çalışmada çeşitli balların (*Ziziphus spina-christi*, *Acacia nilotica*, *Acacia seyal* ve *Cucurbita maxima*) *E. histolytica* ve *Giardia lamblia*'ya karşı *in vitro* antiprotozoal aktivitesi değerlendirilmiştir. Test edilen balların tümü, trofozoitlerin sayısını inhibe etmiştir ve inhibisyon seviyesinin test edilen konsantrasyonlara ve inkübasyon sürelerine göre değiştiği bulunmuştur. *A. seyal* balı 72 saatlik inkübasyonun ardından ≤50 µg/mL konsantrasyonda *E. histolytica* trofozoitlerinin

hareketliliğini tamamen durdurmuştur. *Z. spina-christi*, *A. seyal* ve *A. nilotica* balları 72 saat sonra ≤ 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda *G. lamblia* trofozoitlerini tamamen inhibe etmiştir. Bu inhibitör aktiviteler $IC_{50}=0.27$ gösteren metronidazolün etkisine benzer olduğu çalışmada tespit edilmiştir. (Mohammed et al., 2019).

Yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda *Aloe vera* etanol ekstraktı ve balın *Acanthamoeba* kistlerine karşı etkisi klorheksidin ile karşılaştırılmalı olarak, *in vitro* değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, hem *A. vera* etanol ekstraktı hem de bal *Acanthamoeba* kistlerinin canlılığı üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı bir etki göstermiştir. SEM kullanılarak yapılan incelemelerde, bal ile muamele edilen kistler oldukça deforme olmuş çok küçük boyutlarda olduğu görülürken; klorheksidin ile muamele edilen kistlerde daha az yapısal ve morfolojik değişiklikler görülmüştür. (Kadry et al., 2021).

Microsporidiosisin prevalansı ve şiddeti son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Tıpta, veterinerlikte ve tarımda bu patojenlerin tedavisi son zamanlarda ilgi odağı haline gelmiştir. Şu anda ticari olarak temin edilebilen yalnızca birkaç antimicrosporidial ilaç bulunmaktadır. Bu enfeksiyonlar için yeni terapötik ajanlara ihtiyaç vardır. Araştırmamızda *in vitro* etkisi araştırılan ÇB'nin, *E. intestinalis* sporları üzerindeki inhibisyon verileri, microsporidiosis tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak düşünülebileceğine işaret etmektedir.

PROP eski çağlardan beri tıpta kullanılan bir arı ürünüdür. Antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, antitümör ve immünomodülatör aktiviteleri araştırılmış olmasına rağmen, antiparazitik özellikleri ile ilgili araştırmalar sınırlıdır (de L. Paula et al., 2021). Paraziter hastalıklar özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir insan sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir ve bu paraziter hastalıkların bazıları “İhmal Edilen Tropikal Hastalıklar” olarak kabul edilmektedir (Pink et al., 2005). Propolis, protozoonlardan *Trypanosoma* spp. ve *Leishmania* spp. *in vitro* ve *in vivo* olarak umut verici sonuçlar göstermiştir. Bununla birlikte, sıtmanın etiyolojik ajanı olan *Plasmodium* spp. ve helmintler, özellikle *Fasciola* spp. ve *Schistosoma* spp. için daha az çalışma vardır (de L. Paula et al., 2021). Literatürde, *Microsporidia* ile enfekte olmuş arılar üzerinde PROP'un microsporidiosis üzerine etkisini değerlendiren bazı çalışmalar rapor edilmiştir. PROP'un etanol ekstraktları *Nosema ceranae* enfeksiyon oranını ve arı ölüm oranını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Bankova et al.,

1983). Kuzey New York'tan alınan PROP'un diklorometan ekstraktının doza bağılı bir şekilde *N. ceranae* spor yüklerini büyük ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (Burnham et al., 2020). Benzer bir çalışmada da, İtalya'da bal arısı *A. mellifera*'dan alınan PROP'un etanol ekstraktının *N. ceranae* ile enfekte olmuş işçi arıların spor yükünü azalttığı, besin tüketimi ve yaşam süresini arttırdığı bildirilmiştir (Mura et al., 2020).

Araştırmamızda PROP'un HPLC-DAD analizi sonuçlarına göre baskın fenoliklerin sırasıyla; kafeik asit, fenetil ester, galangin, pinosembirin, trans-kalkon, krisin, naringenin olduğu görülmektedir. Daha düşük miktarlarda gallik asit, epigallokateşin gallat, p-kumarik asit, trans-ferulik asit, trans-isoferulik asit, dimetoksisinamik asit, kuersetin, trans-sinamik asit, apigenin, kaempferol tespit edilmiştir. Bulunan bileşenler literatürde yapılan çalışmalarda içeriklere benzerdir (Kasiotis et al., 2017; Kasote et al., 2017; Shi et al., 2012). Patel ve ark. tarafından HPLC/MS ve UPLC/MS tekniklerini kullanarak gerçekleştirilen analizde PROP'un ana biyoaktif kimyasal bileşenlerini, özellikle de krisin, artemisin C, galangin, kuersetin ve kaempferol (flavonoidler), kafeik asit fenetil ester, nemorosona (bir benzofenon), kardanol ve kardol (fenolik lipidler) ve p-kumarik asit (fenolik asit) bileşenleri tespit edilmiştir (Patel, 2016).

PROP esas olarak bitkisel sekonder metabolit içeriği (fenolikler ve terpenoidler) nedeniyle çeşitli etki mekanizmaları yoluyla, protozoan parazitlere karşı etki göstermektedir. Araştırmalar, PROP bileşenlerinden taxifolin-3-asetil-4'-metil eter (flavonol türevi) ve bilobol hücre lizisini indükleyerek, fosfolipid metabolizmasını bozarak, fosfatidil gliserol ve fosfatidil inositol lipidleri gibi önemli lipidlerin patojenlerini tüketerek anti-tripanozomal aktivite gösterdiğini vurgulamışlardır (Siheri et al., 2019). Buna ek olarak rosmarinik asit ve apigenin (her ikisi de PROP'da sıklıkla bulunan fenolikler) *Leishmania donovani*'de hücre lizisi, sitoplazmik yoğunlaşma, kinetoplast ve nükleer DNA agregasyonu şeklinde fiziksel hasara neden olur. Bu PROP fenolikleri ayrıca G0/G1 fazında hücre durmasını ve indüklenen demir arındırmasını teşvik etmiştir (Antwi et al., 2019). Kaempferol ise aktin, miyozin II ağır zinciri ve korteksilin II'nin ekspresyonunu değiştirerek parazitlerin yapışma mekanizmalarını etkilemektedir (Bolaños et al., 2015). Epikateşinin ısı şok proteini 70, miyozin II ağır zinciri ve aktin ekspresyonunun

modifikasyonu gibi resveratrol ve kaempferol ile benzer etkiyi indüklediği gösterilmiştir. Ek olarak epikateşin enerji metabolizması ile ilişkili enzimler olan ofruktoz-1,6-bifosfat aldolaz ve gliseraldehid-fosfat dehidrojenazın ekspresyonunu da etkilemektedir (Bolaños et al., 2014).

Apigenin, kuersetin ve kafeik asit farklı etki mekanizmaları yoluyla antiparazitik etkiler göstermektedir. Apigenin *L. amazonensis*'te hücre çoğalmasının inhibisyonunu ve ROS ifadesinin yukarı regülasyonunu indükler. Apigenin ayrıca parazit mitokondrisinde şişmeye neden olur ve sonuç olarak parazitin mitokondriyal membran potansiyelini değiştirmektedir (Fonseca-Silva et al., 2015). Kuersetin tedavisi *L. amazonensis*'te ROS üretimini önemli ölçüde artırmaktadır ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu ve membran potansiyeli bozulmasını indüklemektedir (Sen et al., 2008).

Kafeik asit, parazitik hücrelerde morfolojik değişikliklere, hücresel plazma zarının ve mitokondrinin bütünlüğüne neden olmaktadır ve apoptozu teşvik eder. Kafeik asidin ayrıca ROS ve TNF- α ekspresyonunu teşvik ederek enfekte makrofajların inflamatuvar tepkisini arttırdığı, aynı zamanda IL-10 ekspresyonunu ve makrofajların antiparazitik aktivitesini önemli ölçüde artıran demirin varlığını azalttığı, çalışmalarda gösterilmiştir (da Silva Bortoleti et al., 2019). Özdal ve ark., Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan PROP örneklerinde kafeik asit içeriğinin 0,04 ila 0,61 mg/g aralığında olduğunu bildirmiştir (Ozdal et al., 2019). Çalışmamızda PROP'un analiz sonuçlarında kafeik asit bu değerler arasında tespit edilmiştir.

PROP'un kimyasal bileşimi ve çeşitli sınıflandırmaları coğrafi kökenine ve botanik kaynağına yakından bağlıdır. Çünkü arılar, habitatlarına bağlı olarak farklı bitki kaynaklarını seçerler (Sforcin & Bankova, 2011). Farklı botanik kaynakların kimyasal bileşimi, coğrafi bölgeleri ve toplandıkları dönem/mevsim, PROP'un kimyasal bileşimine katkıda bulunur (de L. Paula et al., 2021). Yapılan bir çalışmada Brezilya'nın farklı eyaletlerinden, farklı mevsimlerde toplanılan kırmızı PROP örneklerinin olası aktivite farklılıkları araştırılırken, antiprotozoan ve sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Kırmızı PROP örneklerinin *Leishmania* ve *Trypanosoma* parazitlerine karşı *in vitro* tüm ekstraktların parazitlere karşı yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca yağışlı mevsimde toplanan kırmızı PROP'un, kuru mevsimde toplanandan daha etkili olduğu belirtilerek kırmızı

PROP örnekleri üzerinde mevsimselliğin etkisini gözlemlemişlerdir (da Silveira Regueira-Neto et al., 2018). Başka bir çalışmada, PROP metanolik ekstraktlarının *Giardia* trofozoitlerinin *in vitro* büyümesini engellemenin yanı sıra, 200 µg/mL ekstraktının 48 saat sonra morfolojik hasara neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca PROP aktivitelerinin mevsimselliği de, yaz aylarında toplanan örneğin en aktif örnek olmasıyla ($IC_{50}=23.8\pm2.3$ µg/mL) vurgulanmıştır (Alday-Provencio et al., 2015). Çalışmaların verilerine bakıldığında mevsimsellik PROP'un biyolojik aktivitesine doğrudan müdahale eden bir durumdur.

Etkili arı ürünlerinin konsantrasyonundaki farklılıklar, ağırlıklı olarak deneylerde kullanılan parazitlerin türü ve kökeninin yanı sıra, hazırlama yönteminden de etkilendiğine dair çalışmalar rapor edilmiştir (Barua et al., 2020). PROP ekstraktlarını elde etmek için uygulanan ekstraksiyon yönteminin geniş bir aralığı vardır. Etanol gibi organik çözücü kullanan geleneksel ayırma tekniğinden, süperkritik sıvı ekstraksiyon yöntemi gibi daha karmaşık bir yöntem kadar değişmektedir. Ekstraksiyon yöntemleri, ekstrakttaki aktif madde miktarını etkileyebilir. Dolayısıyla ekstraktların biyolojik aktivitelerini değiştirebilmektedir (Devequi-Nunes et al., 2018). PROP ekstraksiyonunda endüstride en çok etanol tercih edilmesinin sebebi ise daha fazla biyoaktif çözmesidir (Bakkaloğlu & Arıcı, 2019). Bu nedenle çalışmamızda PROP konsantrasyonları hazırlanırken, etanolik PROP ekstraktlarının yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmalarından dolayı çözücü olarak etanol kullanılmıştır.

Brezilya'nın farklı bölgelerinden toplanan farklı PROP türleri (kırmızı, yeşil ve kahverengi) ile bir çalışma yapılmıştır. PROP ekstraktları süperkritik ekstraksiyon ve etanolik ekstraksiyon yoluyla elde edilmiştir. Ham PROP numunelerinde nem, su aktivitesi, protein, lipid ve lif içeriğini belirlemek için analizler yapılmıştır. Tüm ekstraktlar için fenolik bileşikler, flavonoidler, *in vitro* antioksidan aktivite, kateşin, ferulik asit ve luteolin içeriği ve iki bakteriye (*S. aureus* ve *E. coli*) karşı antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. Ayrıca yeşil ve kırmızı etanolik özler için antileishmanial potansiyel de değerlendirilmiştir. Sonuçlar ekstraksiyon yöntemlerinin yanı sıra, örneklerin türü ve botanik kökeni ile uyumlu olan ekstraktlar arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir ($p>0.05$). Süperkritik sıvı ile ekstraksiyon etanolik ekstraktlarla karşılaştırıldığında, en yüksek antioksidan bileşik

içeriğine sahip ekstraktlar elde etmek için verimli olmadığı gözlemlenmiştir. En iyi sonuçlar, antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu için daha yüksek bir seçiciliğe işaret eden etanolik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktlar olarak belirlenmiştir (Devequi-Nunes et al., 2018). Bu çalışmada bulunan sonuçlar PROP'un ekstraksiyon işlemiyle fenolik bileşenlerinin ve biyolojik aktivitelerinin etkinliğini artırdığı doğrulanmaktadır. Bu nedenle kullanılan çözücü seçimi ekstraktın özelliklerinin belirlenmesinde etkilidir.

PROP'un antimikrobiyal ve antiparaziter özellikleri açısından patojen üzerindeki etkisi ve konak üzerindeki etkisi olmak üzere iki ayrı etkiye sahiptir. Patojenlerle ilgili olarak PROP; patojenlerin konak hücrelerini istila etme yeteneğini engelleyerek (fiziksel bir bariyer oluşturarak ve konak hücrelere istila için gerekli enzimleri ve proteinleri inhibe ederek) etki etmektedir. Ayrıca PROP, patojenlerin genetik materyallerinin replikasyonu için gerekli olan enzimleri inhibe ederek patojenlerin replikasyon sürecini de engellemektedir. Bunlara ek olarak PROP, hücresel organelleri ve enerji üretiminden sorumlu bileşenleri bozarak, patojenlerin metabolik süreçlerini de engellemektedir. Konak açısından PROP, bir immünomodülatör görevi görmektedir. Doğuştan gelen bağışıklığı düzenler ve inflamatuvar sinyal yollarını modüle etmektedir. PROP ayrıca enfeksiyon boyunca konağın hücresel antioksidan durumunun korunmasına da yardımcı olmaktadır (Zulhendri et al., 2021).

Siheri ve ark., Libya'nın farklı bölgelerinden gelen çeşitli PROP ekstraktlarının, farklı etkinlik seviyelerinde *in vitro* antiplazmodial aktiviteye sahip olduğunu bulmuştur (Siheri et al., 2016). Ayrıca İran'ın dört farklı bölgesinden gelen PROP ekstraktlarının anti-plazmodiyal olduğu gösterilmiştir (Afrouzan et al., 2017). AlGabbani ve ark. *Plasmodium chabaudi* ile enfekte olmuş farelerde metanolik ekstrakt üzerindeki etkiyi araştırmışlardır. PROP'un parazitemiyi azaltmasının, doza bağımlı olduğu görülmüştür ve 100 mg/kg PROP ekstraktı %70'e kadar azalma sağlamıştır. Ayrıca PROP tedavisinin enfeksiyonla ilişkili oksidatif stresi tersine çevirdiği de gösterilmiştir. PROP tedavileri interferon- γ ve inflamatuvar TNF- α 'yı önemli ölçüde arttırmıştır. Bu da PROP'un immünomodülatör özelliklerini göstermektedir. PROP tedavilerinin ayrıca enfekte farelerin dalaklarının histolojik görünümünü önemli ölçüde iyileştirdiği; en yüksek PROP konsantrasyonunun 100

mg/kg *P. chabaudi* enfeksiyonunun neden olduğu dalak hasarını neredeyse tamamen tersine çevirdiği gösterilmiştir (AlGabbani et al., 2017).

PROP'un fenolik bileşiklerinin *Trypanosoma brucei*'ye karşı etkisi araştırılmış ve iki özel kafeik asit ester β -fenetil kafeat ve farnesil kafeatın, *in vitro* güçlü anti-trypanozomal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Otoguro et al., 2012). Dantas ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise, Bulgar PROP'unun etanol özütü *Trypanosoma cruzi* ile enfekte deneysel İsviçre farelerine 25 ila 100 mg/kg vücut ağırlığı arasında değişen dozlarda oral yoldan uygulanmıştır. Bulgar PROP'u 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün ile tedavi parazitemide azalmaya yol açtığı ayrıca hepatik veya renal toksik etki göstermemiştir. Etanolik Bulgar PROP'u ile tedavi dalak kütlelerinde bir azalmaya yol açmıştır. Ayrıca periferik kandaki lökosit profilinin analizi T hücre alt kümelerinin nicelleştirilmesi ve dalaktaki fenotipik belirteçler ile gösterildiği gibi başlangıçtaki enflamatuvar reaksiyonu modüle etmiştir. Verilere göre *T. cruzi* ile enfekte olmuş farelerin etanolik PROP ekstraktı ile tedavisinin, bağışıklık hücrelerinin temel özelliklerine müdahale ettiği bildirilmiştir (Dantas et al., 2006).

Brezilya yeşil PROP'unun ekstresi (hekzanlar/diklorometan 1:1), *Schistosoma mansoni* erişkinlerine etkisi *in vitro* olarak test edilmiştir. 24 saat sonra 200 μ g/mL'de tüm parazitleri öldürdüğü, 100 μ g/mL'de 36 IC₅₀ değeri ile parazitin canlılığının 24. ve 72. saatlerde sırasıyla %70 ve %86 oranında azaltığı gözlemlenmiştir. Ayrıca solucan tegumentinde gözle görülür şekilde soyulma ve kabarcıkların oluşmasına neden olduğu tespit edilmiştir (A. de L. Paula et al., 2020). Paula ve ark. ise schistosomiosis kemoterapisinde praziquantel kullanılmasında bu ilaca dirençli parazitlerin artması nedeniyle, Brezilya yeşil PROP'unun heksandiklorometan 1:1 ekstraktının yanı sıra başlıca izole bileşikler artepilin C, kafeik asit, kumarik asit ve drupaninin *S. mansoni*'ye karşı *in vitro* schistosomiscidal aktivitesi değerlendirmişlerdir. PROP ekstraktı *S. mansoni*'nin yetişkin solucanlarına karşı 72 saatte 36.60 (26.26-51.13) μ g/mL IC₅₀ değeri göstererek aktif olmuştur. Ana izole edilmiş bileşikler IC₅₀ değerleri >100 μ M ile inaktif olduğu, ancak ekstraktta bulunan aynı aralıktaki izole edilmiş bileşiklerin kombinasyonu 72 saatte 41.17 (39.89-42.46) μ g/mL IC₅₀ değeri ile aktif olarak gözlemlenmiştir. PROP ekstraktı ve izole edilmiş bileşiklerin kombinasyonu *S. mansoni*'nin tegumentinde değişikliğe; kafeik asit ise yumurtanın olgunlaşmasında değişikliğe neden olmuştur. (A. de L.

Paula et al., 2020). Schistosomiosis ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, Brezilya kırmızı PROP'unun *S. mansoni* üzerindeki etkileri *ex vivo* ve bir hayvan schistosomiosis modelinde değerlendirilmiştir. Araştırmada *in vitro* olarak PROP'un ham ekstraktı eşleştirme ve yumurta üretimi incelenmiştir. Fenotipik ve tegümental değişikliklere yol açtığı tespit edilmiştir. Araştırmanın *in vivo* olarak yapılan bölümünde ise, bu doğal ürünün solucan yükü ve yumurta üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak, kontrol grubuna kıyasla hem erken hem de kronik *S. mansoni* enfeksiyonunda solucan yükünü ve yumurta üretimini önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. (Silva et al., 2021).

Nunez ve ark *G. lamblia* ile enfekte olan 256 çocukta PROP'un etkisini klinik bir çalışma olarak yürütmüşlerdir. Araştırmacılar, 20 gün boyunca %30 PROP preparatı alan çocuklarda iyileşme oranını (%79.8), standart ilaç olan metronidazol tedavisi (%79,3), ile neredeyse aynı sonucu elde etmişlerdir. Çalışmanın verileri, PROP'un terapötik açıdan anlamlı giardisidal aktivitesini ortaya koymuştur (Nunez et al., 2004). Benzer sonuçları, Freitas ve ark., PROP'un *Giardia* üzerine *in vitro* etkisini araştırdıkları çalışmada almışlardır (Freitas et al., 2006). Başka bir çalışmada, etanolik PROP ekstraktının *Giardia duodenalis* trofozoitlerinin çoğalması ve yapışması üzerindeki *in vitro* etkileri değerlendirilmiştir. PROP, trofozoitlerin çoğalmasını inhibe ettiği, inhibisyon seviyesinin ekstrakt konsantrasyonuna ve inkübasyon sürelerine göre değiştiği gözlemlenmiştir. PROP, ayrıca parazitin yüzeye yapışmasını da engellemiştir. Çalışma sonucunda PROP'un anti-giardial ajan olarak kullanımına ilişkin bir perspektife sahip olduğu gösterilmiştir (Freitas et al., 2006).

El-Beih ve ark., cryptosporidiosisli rat modelinde, PROP'un 50 mg/kg etanolik ve su ekstraktlarının etkisini değerlendirmişler, sonuç olarak tedavinin 7. gününden sonra ookistlerde sırasıyla %89 ve %75'lik bir azalma belirlemişlerdir. Bununla birlikte, her iki ekstrakt ile tedavi edilen enfekte sıçanlarda nötrofil sayısında ve α 2- ve β -globulin seviyelerinde belirgin bir artış görülürken, lenfositlerde enfekte olmayan gruba kıyasla önemli bir düşüş tespit edilmiştir. (El-Beih et al., 2017). Dantas Silva ve ark. yaptıkları çalışmada, Brezilya PROP'unun etanolik ekstraktlarının yeşil, kırmızı ve kahverengi numunelerinin *in vitro* olarak *T. cruzi* epimastigotları üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Test edilen tüm etanolik ekstraktların *T. cruzi* epimastigotlarının çoğalması üzerine inhibitör etkisini ilk 24

saatte gözlemlenmiştir. 96 saat sonra, sadece kırmızı prop örnekleri için kalıcı bir inhibitör etki tespit etmişlerdir (Dantas Silva et al., 2017).

Etanolik PROP ekstraktının *A. castellanii* trofozoitleri ve kistleri üzerine etkisinin değerlendirildiği *in vitro* bir çalışmada, 8.0 mg/mL ve daha yüksek konsantrasyonlarda amebosidal etki tespit edilmiştir (Topalkara et al., 2007).

Yapılan bir çalışmada avrupa PROP'unun 35 örneğinin ekstraktları protozoanlardan *T. brucei*, *T. congolense* ve *Leishmania mexicana*'nın yabani tip ve dirençli suşlarına karşı ayrıca bir arı paraziti olan *C. fasciculata*'ya karşı test edilmiştir. Araştırmada bütün PROP örnekleri, değişen oranlarda aktivite sergilemiş olup, en yüksek aktivite *L. mexicana*'ya karşı bulunmuştur. (Alotaibi et al., 2019).

Yapılan çalışmalara bakıldığında PROP'un etki mekanizmaları yeterince anlaşılmamış olsa da, parazitoloji için mükemmel bir doğal ürün olduğu kanıtlanmıştır. Araştırmamızda literatürde ilk çalışma olarak *in vitro* etkisi araştırılan PROP'un, *E. intestinalis* sporları üzerinde inhibitör etkisi gözlemlenmiştir. Kesin etki mekanizmalarını aydınlatmak ve bu bileşiklerin prelinik ve klinik ortamlardaki terapötik etkinliğini değerlendirmek için, daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte, PROP ile ilgili çalışmaların hedef anahtar toksisite dahil olmak üzere etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve temel aktif bileşenlerinin standardizasyonu olmalıdır.

Doğal bir ürün olan AS, dünyanın farklı yerlerinde uzun süredir geleneksel ilaçlarda, sağlıklı gıdalarda ve kozmetikte kullanılan; insan sağlığı için çok değerli bir ürün olarak kabul edilmektedir (Pasupuleti et al., 2017). AS, işçi bal arılarının hipofaringeal ve mandibular bezleri tarafından üretilen, kraliçe arı ve larvaların gelişiminde kritik bir role sahip olan bir besindir. (Organization, 2020). Üzerinde en çok çalışılan arı ürünü olan AS'nin antimikrobiyal, antioksidan, yaşlanma karşıtı, immünomodülatör gibi birçok etkisi ortaya konmuştur (Organization, 2020). Literatürde Microsporidia türleri üzerine AS'nin *in vitro* etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlayamadık. Araştırmamızda parazit yükünü değerlendirmek için uygulanan yöntemlerden hem qRt-PCR yöntemi hemde thoma lamı ile sayım yöntemi sonuçlarına göre AS, *E. intestinalis* sporları üzerinde önemli derecede antimicrosporidial aktivite göstermiştir.

AS'deki bileşikler göz önüne alındığında, önceki çalışmalar AS'nin ana bileşiminin sırasıyla su (%50-60), proteinler (%18), karbonhidratlar (%7-18) ve lipidler (%3-8) olduğunu göstermiştir (Ahmad et al., 2020). Araştırmamızda yapılan ISO 12824 AS analiz sonuçlarımızda benzer kimyasal içerik tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada AS ve üç ana yağ asidinin (trans-10-hidroksi-2-dekenoik asit (10-H2DA), 10-hidroksidekanoik asit (10 HDAA), sebasik asit (1,10-dekandioik asit)) insektisidal, antimalaryal, antileishmanial ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak AS, 10 H2DA, 10-HDAA ve sebasik asit, 2.4 ila 8.4 µg/mL arasında değişen IC₅₀ değerleri ile güçlü ($p < 0.0001$) antileishmanial etki göstermiştir. AS, 10-H2DA, 10-HDAA ve sebasik asidin çeşitli konsantrasyonları nitrik oksit üretimini, plazma membran geçirgenliğini ve kaspaz-3 benzeri aktivite seviyesini doza bağlı bir yanıt olarak önemli ölçüde artırmıştır ($P < 0.05$). Mevcut araştırmanın sonuçları AS ve üç ana yağ asidinin umut verici insektisidal, antimalaryal ve antileishmanial etkilerini ortaya koyduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Alkhaibari & Alanazi, 2022).

Yapılan başka bir çalışmada PROP, AS, deve kuşu yağı ve *A. vera*'yı içeren kombinasyonların BALB/c farelerinde deneysel olarak *L. major* ile oluşturulan modelde potansiyel terapötik etkileri değerlendirilmiş olup, önerilen doğal kombinasyonların ülser boyutunu azaltmada standart ilaç olan Glucantime®'e göre anlamlı derecede daha etkili olduğu görülmüştür ($p < 0.05$) (Mahmoudi et al., 2022).

AS'nin antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, gübreleme, yara iyileştirici, yaşlanma karşıtı, insülin benzeri aktivite, antitumör, antidiyabetik ve antiinflamatuvar potansiyellere sahip olduğunu doğrulayan birçok çalışma vardır. İçerdiği biyoaktif bileşenler öncelikle bu işlevlerden sorumludur (Civelek, 2022). AS'nin antioksidan etkisi bitkiler, maya, sıçanlar ve laboratuvar hayvanları üzerinde *in vitro* olarak kanıtlanmıştır. Sıçanlarda ve *in vitro* deneylerde lipid peroksidasyonunu da azalttığı tespit edilmiştir (Pavel et al., 2011).

Klinik araştırmalara göre AS tedavisi, malondialdehit düzeylerini, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitesini iyileştirerek, diyabet hastalarının eritrositlerindeki oksidatif stresi azaltmıştır (Pourmoradian et al., 2014). Bir çalışma da AS'nin, fumonisin neden olduğu oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığı ve antioksidan kapasiteyi önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (El-Nekeety et al., 2007).

AS'nin, DNA'yı dokulardaki oksidatif hasardan koruduğu keşfedilmiştir. Araştırmacılar, farelere bir süre AS verdikten sonra DNA ve kandaki oksidatif stres belirteci seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını ve oksidatif hasarın azalması nedeniyle farelerin ortalama yaşam süresinin uzadığını gözlemlemişlerdir (Inoue et al., 2003). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada, AS'nin antioksidan aktiviteyi uyardığı ve bağırsak florasını düzenlediği gösterilmiştir (Chi et al., 2022). Proteinler ve peptitler gibi suda çözünebilen AS bileşenleri, gram pozitif ve negatif bakterileri inhibe etme konusunda güçlü bir yeteneğe sahiptir. Bu antibakteriyel bileşenlerin tamamının, arıların koruyucu bağışıklık sisteminde rol oynadığı düşünülmektedir (Pavel et al., 2011).

AS, tümör kaynaklı anjiyogenezi inhibe ederek bağışıklık fonksiyonunun uyarılmasının yanı sıra, karaciğer/akciğerde tümör oluşumunun baskılanması gibi anti-kanser özelliklere de sahip olduğu araştırmalarda gösterilmiştir (Ahmad et al., 2020). AS, hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir ve farklı tipteki tümör hücrelerinde apoptozu arttırmaktadır; ayrıca farklı kemokinlerin, antioksidanların ve büyüme faktörlerinin üretimini ve kanserli kişilerde, özellikle antikanser ilaçları ile tedavi edilenlerde, kanserle ilişkili moleküllerin ekspresyonunu etkilemektedir. *In vitro* ve hayvan çalışmalarına göre AS sadece 4T1 meme kanseri hücrelerinin gelişimini azaltmakla kalmamış, aynı zamanda yüksek TNF- α ve azalmış IL-6 ve IL-10 seviyeleri ile görüldüğü gibi meme kanserinin neden olduğu hayvan modellerinin bağışıklığını da arttırmıştır (Zhang et al., 2017). Yapılan başka bir çalışmada AS'nin singenik Balb/c farelerinde WEHI-164 fibrosarkom hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Fare meme kanseri modelini kullanan Zhang ve ark., AS tedavisinin tümör kütlesini azalttığını; böbrekler ve karaciğer de dahil olmak üzere birçok organın antioksidatif aktivitesini iyileştirdiğini göstermişlerdir. Ek olarak, tedavi antioksidan enzimatik aktiviteyi uyarmıştır. AS'nin antitümör ve antioksidan biyoaktif özellikleri arasındaki olası bir bağlantı vurgulamıştır (Shirzad et al., 2013).

AS ayrıca insülin benzeri bir aktiviteye sahiptir. İnsülin benzeri bir peptit AS'den saflaştırılmıştır ve çözünürlük, kromatografik, immünolojik ve biyolojik özellikler bakımından omurgalıların insülinine benzediği gözlemlenmiştir (Kramer et al., 1982). AS'nin sağlıklı sporculara uygulanması, insülinlerini önemli ölçüde

azaltmış ve plazmadaki tiroksin (T4) hormonu seviyelerini artırmıştır (Büyükipekçi et al., 2018). AS içerdiği insülin benzeri peptitlerin insülinik etkisi sayesinde glikozun enerji için oksidasyonuna katkıda bulunarak kan şekeri seviyesini koruyabilmektedir. 20 gönüllü üzerinde yapılan araştırmada AS tüketen bireylerin glikoz seviyelerinin % 11.9 oranında düştüğü keşfedilmiştir (Münstedt et al., 2009).

AS birçok tıbbi uygulamaya sahip doğal bir arı salgısıdır ve eski çağlardan beri kullanılan çok sayıda değerli bir tıbbi özelliğe sahiptir. AS, günümüzde insan sağlığını iyileştirmeye yönelik popüler bir fonksiyonel ve tedavi edici besindir. Sağlığa yararlı özellikleri nedeniyle, çoğunlukla bir gıda ürünü olarak alınmakta veya takviye olarak diğer ürünlerde bulunmaktadır. AS veya belirli bileşenlerinin antioksidan, antikanser, antiproliferatif, antibakteriyel ve antifungal, nöroprotektif, yara iyileştirici, immünomodülatör, anti-aging ve insülin benzeri etkilere sahip olduğu bildirilmesine rağmen antiparaziter özelliği hakkında literatürde çalışmalar yok denecek kadar azdır. Araştırma sonuçlarımız AS'nin microsporidiosis'e karşı yeni terapötik müdahalelerin geliştirilmesi için umut verici aday olarak arı ürünlerinin potansiyelini desteklemektedir. Doğal AS ve izole edilmiş bileşiklerin herhangi bir faydasını ve etki mekanizmasını kanıtlamak için daha fazla deney (*in vitro*, hayvan araştırmalarında ve klinik deneylerde) ve doğrulama yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız literatürdeki ilk değerlendirme olarak *in vitro* modelde ÇB'nin, özellikle PROP ve AS'nin *E. intestinalis*'e karşı güçlü antimicrosporidial etkilerini göstermiştir. Potansiyel tıbbi ve farmasötik özellikleri nedeniyle ÇB, PROP ve AS antimicrosporidial ilaçların geliştirilmesinde etken madde havuzunda bir seçenek olarak değerlendirilmelidir. Ancak KSB ve ÇMB ise *E. intestinalis* sporları üzerinde proliferatif etki göstermiştir. Kesin etki mekanizmalarını aydınlatmak ve arı ürünlerin prelinik ve klinik ortamlardaki microsporidial aktivitelerini değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- A. de L. Paula, L., Santos, M. F., Pagotti, M. C., Faleiros, R., Ramos, H. P., Veneziani, R. C., Bastos, J. K., Caffrey, C. R., Ambrosio, S. R., & Magalhães, L. G. (2020). Uncovering biological application of Brazilian green propolis: a phenotypic screening against *Schistosoma mansoni*. *Chemistry & Biodiversity*, 17(9), e2000277.
- Afrouzan, H., Zakeri, S., Mehrizi, A. A., Molasalehi, S., Tahghighi, A., Shokrgozar, M. A., Es-Haghi, A., & Djadid, N. D. (2017). Anti-plasmodial assessment of four different Iranian propolis extracts. *Archives of Iranian medicine*, 20(5), 270-281.
- Ahmad, S., Campos, M. G., Fratini, F., Altaye, S. Z., & Li, J. (2020). New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 382.
- Albrecht, H., & Sobottka, I. (1997). Enterocytozoon bienersi infection in patients who are not infected with human immunodeficiency virus. *Clinical infectious diseases*, 25(2), 344-344.
- Alday-Provencio, S., Diaz, G., Rascon, L., Quintero, J., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Astiazaran, H., Hernandez, J., & Velazquez, C. (2015). Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit in vitro growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Planta medica*, 81(09), 742-747.
- AlGabbani, Q., Mansour, L., Elnakady, Y. A., Al-Quraishy, S., Alomar, S., Al-Shaebi, E. M., & Abdel-Baki, A.-A. S. (2017). In vivo assessment of the antimalarial and spleen-protective activities of the Saudi propolis methanolic extract. *Parasitology research*, 116, 539-547.
- Alkhaibari, A. M., & Alanazi, A. D. (2022). Insecticidal, antimalarial, and antileishmanial effects of royal jelly and its three main fatty acids, trans-10-hydroxy-2-decanoic acid, 10-hydroxydecanoic acid, and sebacic acid. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022.
- Alotaibi, A., Ebiloma, G. U., Williams, R., Alenezi, S., Donachie, A.-M., Guillaume, S., Igoli, J. O., Fearnley, J., De Koning, H. P., & Watson, D. G. (2019). European propolis is highly active against trypanosomatids including *Crithidia fasciculata*. *Scientific reports*, 9(1), 11364.
- Alpat, U. (2018). *Çam balının fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin ülkemizde üretilen diğer önemli ballarla karşılaştırılması* [Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Anane, S., & Attouchi, H. (2010). Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterologie clinique et biologique*, 34(8-9), 450-464.
- Antwi, C. A., Amisigo, C. M., Adjimani, J. P., & Gwira, T. M. (2019). In vitro activity and mode of action of phenolic compounds on *Leishmania donovani*. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(2), e0007206.
- Aurrecochea, C., Barreto, A., Brestelli, J., Brunk, B. P., Caler, E. V., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., & Grant, G. (2010). AmoebaDB and MicrosporidiaDB: functional genomic resources for Amoebozoa and Microsporidia species. *Nucleic acids research*, 39(suppl_1), D612-D619.
- Aw Yong, P. Y., Islam, F., Harith, H. H., Israf, D. A., Tan, J. W., & Tham, C. L. (2021). The potential use of honey as a remedy for allergic diseases: a mini review. *Frontiers in pharmacology*, 11, 599080.
- Bakar, A. C. T. N. H. H. N. A. (2023). A review of the antiparasitic effects of ellagic acid and other phenolic compounds isolated from medicinal plants. *Biochemistry and Molecular Biology*, 26(1), 10-21.
- Bakkaloğlu, Z., & Arıcı, M. (2019). Farklı çözücülerle propolis ekstraksiyonunun toplam fenolik içeriği, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri. *Akademik Gıda*, 17(4), 538-545.
- Bankova, V., Popov, S., & Marekov, N. (1983). A study on flavonoids of propolis. *Journal of natural products*, 46(4), 471-474.
- Barua, N., Aziz, M. A. I., Tareq, A. M., Sayeed, M. A., Alam, N., ul Alam, N., Uddin, M. A., Lyzu, C., & Emran, T. B. (2020). In vivo and in vitro evaluation of pharmacological activities of *Adenia trilobata* (Roxb.). *Biochemistry and Biophysics Reports*, 23, 100772.
- Beckers, P., Derks, G., Gool, T. v., Rietveld, F., & Sauerwein, R. (1996). Encephalocytozoon intestinalis-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *Journal of clinical microbiology*, 34(2), 282-285.

- Bergquist, R., Morfeldt-Månsson, L., Pehrson, P. O., Petrini, B., & Wasserman, J. (1984). Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 16(4), 389-391.
- Bolaños, V., Díaz-Martínez, A., Soto, J., Marchat, L. A., Sanchez-Monroy, V., & Ramírez-Moreno, E. (2015). Kaempferol inhibits *Entamoeba histolytica* growth by altering cytoskeletal functions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 204(1), 16-25.
- Bolaños, V., Díaz-Martínez, A., Soto, J., Rodríguez, M. A., López-Camarillo, C., Marchat, L. A., & Ramírez-Moreno, E. (2014). The flavonoid (–)-epicatechin affects cytoskeleton proteins and functions in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Proteomics*, 111, 74-85.
- Burnham, A. J., De Jong, E., Jones, J. A., & Lehman, H. K. (2020). North American propolis extracts from Upstate New York decrease *Nosema ceranae* (Microsporidia) spore levels in honey bees (*Apis mellifera*). *Frontiers in microbiology*, 11, 1719.
- Büyükepeççi, S., Sarıtaş, N., Soylu, M., Mistik, S., & Silici, S. (2018). Effects of royal jelly and honey mixture on some hormones in young males performing maximal strength workout.
- Cai, J., Wen, H., Zhou, H., Zhang, D., Lan, D., Liu, S., Li, C., Dai, X., Song, T., & Wang, X. (2023). Naringenin: A flavanone with anti-inflammatory and anti-infective properties. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 164, 114990.
- Cali, A., Takvorian, P., Weiss, L., & Becnel, J. (2014). Microsporidia: pathogens of opportunity.
- Cali, A., & Takvorian, P. M. (2014). Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. *Microsporidia: pathogens of opportunity*, 71-133.
- Calvo, M., Carazo, M., Arias, M. L., Chaves, C., Monge, R., & Chinchilla, M. (2004). Prevalence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 54(4), 428-432.
- Cama, V. A., Pearson, J., Cabrera, L., Pacheco, L., Gilman, R., Meyer, S., Ortega, Y., & Xiao, L. (2007). Transmission of *Enterocytozoon bienersi* between a child and guinea pigs. *Journal of clinical microbiology*, 45(8), 2708-2710.
- Canning, E. U., & Lom, J. (1986). *The microsporidia of vertebrates*. Academic Press (London) Ltd.
- Cauich-Kumul, R., & Campos, M. R. S. (2019). Bee propolis: Properties, chemical composition, applications, and potential health effects. In *Bioactive compounds* (pp. 227-243). Elsevier.
- Chen, J., Zhong, K., Jing, Y., Liu, S., Qin, S., Peng, F., Li, D., & Peng, C. (2023). Procyanidin B2: A promising multi-functional food-derived pigment for human diseases. *Food Chemistry*, 420, 136101.
- Chi, X., Liu, Z., Wang, H., Wang, Y., Xu, B., & Wei, W. (2022). Regulation of a new type of selenium-rich royal jelly on gut microbiota profile in mice. *Biological Trace Element Research*, 200(4), 1763-1775.
- Cislakova, L., Prokopcakova, H., Stefkovic, M., & Halanova, M. (1997). *Encephalitozoon cuniculi*--clinical and epidemiologic significance. Results of a preliminary serologic study in humans. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie: Casopis Spolecnosti pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti JE Purkyne*, 46(1), 30-33.
- Cissé, G. (2019). Food-borne and water-borne diseases under climate change in low-and middle-income countries: Further efforts needed for reducing environmental health exposure risks. *Acta tropica*, 194, 181-188.
- Civelek, İ. (2022). Biological activities of royal jelly: a mini-review. *Anatolian Journal of Biology*, 3(1), 1-8.
- Collins, W., Lowen, N., & Blake, D. J. (2019). Caffeic acid esters are effective bactericidal compounds against *Paenibacillus* larvae by altering intracellular oxidant and antioxidant levels. *Biomolecules*, 9(8), 312.
- Conteas, C., Berlin, O., Ash, L., & Pruthi, J. (2000). Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 63(3), 121-127.
- Conteas, C., Donovan, J., Berlin, O., Sowerby, T., & La Riviere, M. (1997). Comparison of fluorescence and standard light microscopy for diagnosis of microsporidia in stools of patients with AIDS and chronic diarrhoea. *AIDS*, 11(3), 386-387.
- Conteas, C. N., Sowerby, T., Berlin, G. W., & Dahlan, F. (1996). Fluorescence techniques for diagnosing intestinal microsporidiosis in stool, enteric fluid, and biopsy specimens from acquired immunodeficiency syndrome patients with chronic diarrhea. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 120(9), 847.

- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., & Burlando, B. (2017). Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in pharmacology*, 412.
- Cunha, B. C., Miranda, M. B. d., Afonso, L. C. C., Abreu, S. R. L., Testasicca, M. C. D. S., Silva, G. R. d., & Moura, S. A. L. d. (2020). Brazilian green propolis hydroalcoholic extract as a therapeutic adjuvant to treat cutaneous leishmaniasis.
- Çetinkaya, Ü., Kuk, S., SİVCAN, E., Kaynar, L., Arslan, D., & ŞAHİN, İ. (2016). The high prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* in patients receiving chemotherapy and children with growth retardation and the validity of real-time PCR in its diagnosis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(4), 1050-1058.
- da Silva Bortoleti, B. T., Tomiotto-Pellissier, F., Gonçalves, M. D., Miranda-Sapla, M. M., Assolini, J. P., Carlotto, A. C., Lima, D. M., Silveira, G. F., Almeida, R. S., & Costa, I. N. (2019). Caffeic acid has antipromastigote activity by apoptosis-like process; and anti-amastigote by TNF- α /ROS/NO production and decreased of iron availability. *Phytomedicine*, 57, 262-270.
- da Silveira Regueira-Neto, M., Tintino, S. R., Rolón, M., Coronal, C., Vega, M. C., de Queiroz Balbino, V., & de Melo Coutinho, H. D. (2018). Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 215-221.
- Dantas, A. P., Olivieri, B. P., Gomes, F. H., & De Castro, S. L. (2006). Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2), 187-193.
- Dantas Silva, R. P., Machado, B. A. S., Barreto, G. d. A., Costa, S. S., Andrade, L. N., Amaral, R. G., Carvalho, A. A., Padilha, F. F., Barbosa, J. D. V., & Umsza-Guez, M. A. (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PloS one*, 12(3), e0172585.
- Das, S., Sharma, S., Sahu, S. K., Nayak, S. S., & Kar, S. (2012). Diagnosis, clinical features and treatment outcome of microsporidial keratoconjunctivitis. *British journal of ophthalmology*, 96(6), 793-795.
- de L. Paula, L. A., Cândido, A. C., Santos, M. F., Caffrey, C. R., Bastos, J. K., Ambrósio, S. R., & Magalhães, L. G. (2021). Antiparasitic properties of propolis extracts and their compounds. *Chemistry & Biodiversity*, 18(9), e2100310.
- de Miranda, M. B., Lanna, M. F., Nascimento, A. L. B., de Paula, C. A., de Souza, M. E., Felipetto, M., da Silva Barcelos, L., & de Moura, S. A. L. (2019). Hydroalcoholic extract of Brazilian green propolis modulates inflammatory process in mice submitted to a low protein diet. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 610-620.
- Dean, P., Hirt, R. P., & Embley, T. M. (2016). Microsporidia: why make nucleotides if you can steal them? *PLoS pathogens*, 12(11), e1005870.
- DeGirolami, P., Ezratty, C., Desai, G., McCullough, A., Asmuth, D., Wanke, C., & Federman, M. (1995). Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B strains. *Journal of clinical microbiology*, 33(4), 805-810.
- Deisinger, P. J. (1996). Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 47(1), 31-46.
- Deplazes, P., Mathis, A., & Weber, R. (2000). Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contributions to microbiology*, 6, 236-260.
- Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., Barreto, G. d. A., Rebouças Silva, J., da Silva, D. F., da Rocha, J. L. C., Brandão, H. N., Borges, V. M., & Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PloS one*, 13(12), e0207676.
- Didier, E., Stovall, M., Green, L., Brindley, P., Sestak, K., & Didier, P. (2004). Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary parasitology*, 126(1-2), 145-166.
- Didier, E. S. (2005). Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta tropica*, 94(1), 61-76.
- Didier, E. S., Didier, P. J., Snowden, K. F., & Shadduck, J. A. (2000). Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection*, 2(6), 709-720.
- Didier, E. S., Snowden, K. F., & Shadduck, J. A. (1998). Biology of microsporidian species infecting mammals. *Advances in parasitology*, 40, 283-320.

- Didier, E. S., & Weiss, L. M. (2011). Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Current opinion in infectious diseases*, 24(5), 490-495.
- Dore, G. J., Marriott, D. J., Hing, M. C., Harkness, J. L., & Field, A. S. (1995). Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in nine patients infected with the human immunodeficiency virus: response to therapy with albendazole. *Clinical infectious diseases*, 21(1), 70-76.
- dos Santos Thomazelli, A. P. F., Tomiotto-Pellissier, F., da Silva, S. S., Panis, C., Orsini, T. M., Cataneo, A. H. D., Miranda-Sapla, M. M., Custódio, L. A., Tatakihara, V. L. H., & Bordignon, J. (2017). Brazilian propolis promotes immunomodulation on human cells from American Tegumentar Leishmaniasis patients and healthy donors infected with *L. braziliensis*. *Cellular Immunology*, 311, 22-27.
- Dowd, S. E., John, D., Eliopolus, J., Gerba, C. P., Naranjo, J., Klein, R., Lopez, B., de Mejía, M., Mendoza, C. E., & Pepper, I. L. (2003). Confirmed detection of *Cyclospora cayetanensis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used for drinking. *Journal of Water and Health*, 1(3), 117-123.
- Drosten, C., Laabs, J., Kuhn, E., & Schottelius, J. (2005). Interspecies transmission of *Enterocytozoon bieneusi* supported by observations in laboratory animals and phylogeny. *Medical microbiology and immunology*, 194(4), 207-209.
- Dunn, A. M., Terry, R. S., & Smith, J. E. (2001). Transovarial transmission in the microsporidia.
- Dutra, R. P., Bezerra, J. L., Silva, M. C. P. d., Batista, M. C. A., Patrício, F. J. B., Nascimento, F. R. F., Ribeiro, M. N. S., & Guerra, R. N. M. (2019). Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 287-293.
- El-Beih, M., Nasr, M., Abd, H., Khalil, A., Ahmed, F., & Abou, A. (2017). Effect of Egyptian propolis on cryptosporidiosis in immunosuppressed rats with special emphasis on oocysts shedding, leukogram, protein profile and ileum histopathology. *亚太热带医药杂志 英文版*(3), 240-248.
- El-Guendouz, S., Machado, A. M., Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M. G., Mateus, M. C., & Figueiredo, A. C. (2020). Chemical characterization and biological properties of royal jelly samples from the Mediterranean area. *Natural Product Communications*, 15(2), 1934578X20908080.
- El-Nekeety, A. A., El-Kholy, W., Abbas, N. F., Ebaid, A., Amra, H. A., & Abdel-Wahhab, M. A. (2007). Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon*, 50(2), 256-269.
- El Menyiy, N., Aboulaghras, S., Bakrim, S., Moubachir, R., Taha, D., Khalid, A., Abdalla, A. N., Algarni, A. S., Hermansyah, A., & Ming, L. C. (2023). Genkwanin: An emerging natural compound with multifaceted pharmacological effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115159.
- Emran, T., Ahmed, S., Zahan, S., Rakib, A., Hasan, M., Amin, M., Mow, T., & Uddin, M. (2018). Sedative, anxiolytic, antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of a chloroform extract from the leaves of *Urena sinuata* in rodents. *Journal of Applied Life Sciences International*, 16(3), 1-19.
- Engelkirk, P. G., & Duben-Engelkirk, J. L. (2008). *Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and chemical toxicology*, 46(12), 3774-3779.
- Fayer, R. (2004). Infectivity of microsporidia spores stored in seawater at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, 90(3), 654-657.
- Fedorko, D. P., & Hijazi, Y. M. (1996). Application of molecular techniques to the diagnosis of microsporidial infection. *Emerging infectious diseases*, 2(3), 183.
- Fonseca-Silva, F., Canto-Cavalheiro, M. M., Menna-Barreto, R. F., & Almeida-Amaral, E. E. (2015). Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* is associated with reactive oxygen species production followed by mitochondrial dysfunction. *Journal of natural products*, 78(4), 880-884.
- Franzen, C., Hartmann, P., & Salzberger, B. (2005). Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. *Experimental parasitology*, 109(1), 1-6.

- Franzen, C., & Müller, A. (1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 243-285.
- Freitas, S., Shinohara, L., Sforcin, J., & Guimarães, S. (2006). In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*, 13(3), 170-175.
- Frixione, E., Ruiz, L., Santillán, M., de Vargas, L. V., Tejero, J. M., & Undeen, A. H. (1992). Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell motility and the cytoskeleton*, 22(1), 38-50.
- García-Torres, I., De la Mora-De la Mora, I., Hernández-Alcántara, G., Molina-Ortiz, D., Caballero-Salazar, S., Olivos-García, A., Nava, G., López-Velázquez, G., & Enríquez-Flores, S. (2018). First characterization of a microsporidial triosephosphate isomerase and the biochemical mechanisms of its inactivation to propose a new druggable target. *Scientific reports*, 8(1), 8591.
- Garcia, L. S. (2002). Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 1892-1901.
- George, B., Coates, T., McDonald, S., Russ, G., Cherian, S., Nolan, J., & Brealey, J. (2012). Disseminated microsporidiosis with *Encephalitozoon* species in a renal transplant recipient. *Nephrology*, 17, 5-8.
- Gholizadeh, H., Ghaffarifar, F., Dalimi, A., & Dayer, M. S. (2022). In vitro and in vivo effects of natural honey on *Leishmania major*. *Annals of Parasitology*, 68(1), 71-76.
- Ghosh, K., & Weiss, L. M. (2009). Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.
- Goldberg, A. V., Molik, S., Tsaousis, A. D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C. P., Hirt, R. P., Lill, R., & Embley, T. M. (2008). Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature*, 452(7187), 624-628.
- Gomes, A. N. P., Camara, C. A., dos Santos Sousa, A., de Assis Ribeiro dos Santos, F., de Santana Filho, P. C., Dorneles, G. P., Romão, P. R. T., & Silva, T. M. S. (2021). Chemical composition of bee pollen and leishmanicidal activity of rhusflavone. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 31(2), 176-183.
- Gool, T., Vetter, J., Weinmayr, B., Dam, A. V., Derouin, F., & Dankert, J. (1997). High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *Journal of Infectious Diseases*, 175(4), 1020-1024.
- Górnaiak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry reviews*, 18, 241-272.
- Gransden, W. (1999). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, (CD-ROM). *Journal of Clinical Pathology*, 52(3), 237.
- Gündoğdu, E., Çakmakçı, S., & Şat, İ. G. (2019). An overview of honey: its composition, nutritional and functional properties. *J. Food Sci. Eng*, 9(1), 10-14.
- Han, B., Ma, Y., Tu, V., Tomita, T., Mayoral, J., Williams, T., Horta, A., Huang, H., & Weiss, L. M. (2019). Microsporidia interact with host cell mitochondria via voltage-dependent anion channels using sporoplasm surface protein 1. *MBio*, 10(4), 10.1128/mbio.01944-01919.
- Han, B., Pan, G., & Weiss, L. M. (2021). Microsporidiosis in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4), e00010-00020.
- Han, B., Polonais, V., Sugii, T., Yakubu, R., Takvorian, P. M., Cali, A., Maier, K., Long, M., Levy, M., & Tanowitz, H. B. (2017). The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLoS pathogens*, 13(4), e1006341.
- Han, B., Takvorian, P. M., & Weiss, L. M. (2020). Invasion of host cells by microsporidia. *Frontiers in microbiology*, 11, 172.
- Han, B., Takvorian, P. M., & Weiss, L. M. (2022). The function and structure of the microsporidia polar tube. In *Microsporidia: Current Advances in Biology* (pp. 179-213). Springer.
- Han, B., & Weiss, L. (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiol. Spectr.* 5: 10.1128/microbiolspec.
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiology spectrum*, 5(2), 5.2. 03.
- Han, B., & Weiss, L. M. (2018). Therapeutic targets for the treatment of microsporidiosis in humans. *Expert opinion on therapeutic targets*, 22(11), 903-915.
- Haro, M., Izquierdo, F., Henriques-Gil, N., Andrés, I., Alonso, F., Fenoy, S., & Del Aguila, C. (2005). First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3153-3157.

- Haroun, M. I. (2006). Türkiye'de üretilen bazı çiçek ve salgı ballarının fenolik asit ve flavonoid profilinin belirlenmesi.
- Hayman, J. R., Southern, T. R., & Nash, T. E. (2005). Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infection and immunity*, 73(2), 841-848.
- He, Q., Leitch, G. J., Visvesvara, G. S., & Wallace, S. (1996). Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(1), 179-185.
- He, Q., Vossbrinck, C. R., Yang, Q., Meng, X.-Z., Luo, J., Pan, G.-Q., Zhou, Z.-Y., & Li, T. (2019). Evolutionary and functional studies on microsporidian ATP-binding cassettes: Insights into the adaptation of microsporidia to obligated intracellular parasitism. *Infection, Genetics and Evolution*, 68, 136-144.
- Hegazi, A. G., Al Guthami, F. M., Al Gethami, A. F., & El Fadaly, H. A. (2017). Beneficial effects of capparid spinosa honey on the immune response of rats infected with toxoplasma gondii. *Journal of pharmacopuncture*, 20(2), 112.
- Hegazi, A. G., El-Fadaly, H. A., Barakat, A. M., & Abou-El-Doubal, S. K. (2014). In vitro effects of some bee products on *T. gondii* tachyzoites. *Glob. Vet*, 13(6), 1043-1050.
- Hester, J. D., Alan Lindquist, H., Bobst, A. M., & SCHAEFER III, F. W. (2000). Fluorescent in situ detection of *Encephalitozoon hellem* spores with a 6-carboxyfluorescein-labeled ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probe. *Journal of eukaryotic microbiology*, 47(3), 299-308.
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F.-L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
- Huger, A. (1960). Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. *J. Insect Pathol*, 2(84).
- Huibers, M. H., Moons, P., Maseko, N., Gushu, M. B., Iwajomo, O. H., Heyderman, R. S., van Hensbroek, M. B., Brienen, E. A., van Lieshout, L., & Calis, J. C. (2018). Multiplex Real-time PCR Detection of Intestinal Protozoa in HIV-infected Children in Malawi: *Enterocytozoon Bieneusi*: Is Common and Associated With Gastrointestinal Complaints and May Delay BMI (Nutritional Status) Recovery. *The Pediatric infectious disease journal*, 37(9), 910-915.
- Ijaz, S., Iqbal, J., Abbasi, B. A., Ullah, Z., Yaseen, T., Kanwal, S., Mahmood, T., Sydykbayeva, S., Ydyrys, A., & Almarhoon, Z. M. (2023). Rosmarinic acid and its derivatives: Current insights on anticancer potential and other biomedical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114687.
- Innes, E. F., & Stewart, C. (1991). The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 62(2), 51-54.
- Inoue, S.-i., Koya-Miyata, S., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2003). Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. *Experimental gerontology*, 38(9), 965-969.
- Izquierdo, F., Hermida, J. A. C., Fenoy, S., Mezo, M., González-Warleta, M., & del Aguila, C. (2011). Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water research*, 45(16), 4837-4843.
- Izquierdo, F., Moura, H., Bornay-Llinares, F. J., Sriram, R., Hurtado, C., Magnet, Á., Fenoy, S., Visvesvara, G., & Del Aguila, C. (2017). Production and characterization of monoclonal antibodies against *Encephalitozoon intestinalis* and *Encephalitozoon* sp. spores and their developmental stages. *Parasites & vectors*, 10, 1-12.
- Javanmard, E., Mirjalali, H., Niyyati, M., Jalilzadeh, E., Tabaei, S. J. S., Aghdaei, H. A., Nazemalhosseini-Mojarad, E., & Zali, M. R. (2018). Molecular and phylogenetic evidences of dispersion of human-infecting microsporidia to vegetable farms via irrigation with treated wastewater: one-year follow up. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(4), 642-651.
- Jiang, T., Xiao, Y., Zhou, J., Luo, Z., Yu, L., Liao, Q., Liu, S., Qi, X., Zhang, H., & Hou, M. (2023). Arbutin alleviates fatty liver by inhibiting ferroptosis via FTO/SLC7A11 pathway. *Redox Biology*, 68, 102963.

- Jiang, W., Roellig, D. M., Li, N., Wang, L., Guo, Y., Feng, Y., & Xiao, L. (2020). Contribution of hospitals to the occurrence of enteric protists in urban wastewater. *Parasitology research*, 119, 3033-3040.
- Jiao, Y., Liu, S., Zhou, Y., Yang, D., Li, J., & Cui, Z. (2022). The Effect of Supplemental Concentrate Feeding on the Morphological and Functional Development of the Pancreas in Early Weaned Yak Calves. *Animals*, 12(19), 2563.
- Jones, M. D., Forn, I., Gadelha, C., Egan, M. J., Bass, D., Massana, R., & Richards, T. A. (2011). Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature*, 474(7350), 200-203.
- Kadry, G. M., Ismail, M. A., El-Sayed, N. M., El-Kholy, H. S., & El-Akkad, D. M. H. (2021). In vitro amoebicidal effect of Aloe vera ethanol extract and honey against *Acanthamoeba* spp. cysts. *Journal of Parasitic Diseases*, 45, 159-168.
- Karaman, Ü. (2007). İnsanlarda microsporidiasların epidemiyolojisi (Malatya ili örneği).
- Kasiotis, K. M., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A., & Machera, K. (2017). Revisiting Greek propolis: chromatographic analysis and antioxidant activity study. *PloS one*, 12(1), e0170077.
- Kasote, D. M., Pawar, M. V., Bhatia, R. S., Nandre, V. S., Gundu, S. S., Jagtap, S. D., & Kulkarni, M. V. (2017). HPLC, NMR based chemical profiling and biological characterisation of Indian propolis. *Fitoterapia*, 122, 52-60.
- Keoghane, E. M., & Weiss, L. M. (1999). The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. *The microsporidia and microsporidiosis*, 196-224.
- Khac, H. V., Thanh, T. N. T., Thu, G. N. T., Le, C. H., & Nguyen, V. D. (2018). Vertical transmission and early diagnosis of the microsporidian *Enterocytozoon hepatonae* in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(3).
- Khan, I. A., & Didier, E. S. (2004). Insights into the immune responses to microsporidia. *Opportunistic infections: toxoplasma, sarcocystis, and microsporidia*, 135-157.
- Khanaliha, K., Mirjalali, H., Mohebbi, M., Tarighi, F., & Rezaei, M. (2014). Comparison of three staining methods for the detection of intestinal *Microspora* spp. *Iranian Journal of Parasitology*, 9(4), 445.
- Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., & Musik, I. (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Kotler, D. P., & Orenstein, J. M. (1999). Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *The microsporidia and microsporidiosis*, 258-292.
- Kramer, K. J., Childs, C. N., Spiers, R. D., & Jacobs, R. M. (1982). Purification of insulin-like peptides from insect haemolymph and royal jelly. *Insect biochemistry*, 12(1), 91-98.
- Leitch, G. J., & Ceballos, C. (2008). Effects of host temperature and gastric and duodenal environments on microsporidia spore germination and infectivity of intestinal epithelial cells. *Parasitology research*, 104, 35-42.
- Leonard, C. A., & Hayman, J. R. (2017). Role of host cell integrins in the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis* adherence and infection in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 364(17), fnx169.
- Li, W., Feng, Y., & Xiao, L. (2020). Diagnosis and molecular typing of *Enterocytozoon bienersi*: the significant role of domestic animals in transmission of human microsporidiosis. *Research in Veterinary Science*, 133, 251-261.
- Liu, H., Jiang, Z., Yuan, Z., Yin, J., Wang, Z., Yu, B., Zhou, D., Shen, Y., & Cao, J. (2017). Infection by and genotype characteristics of *Enterocytozoon bienersi* in HIV/AIDS patients from Guangxi Zhuang autonomous region, China. *BMC Infectious Diseases*, 17, 1-8.
- Lobo, M. L., Xiao, L., Antunes, F., & Matos, O. (2012). Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: a 10-year study on HIV-positive and-negative patients. *International journal for parasitology*, 42(2), 197-205.
- Luo, J., He, Q., Xu, J.-Z., Xu, C., Han, Y.-Z., Gao, H.-L., Meng, X.-Z., Pan, G.-Q., Li, T., & Zhou, Z.-Y. (2021). Microsporidia infection upregulates host energy metabolism but maintains ATP homeostasis. *Journal of invertebrate pathology*, 186, 107596.
- Maged, A. A., Metwally, K., El-Menawy, H., Hegab, F., & El-Wakil, E. (2023). Assessment of the potential prophylactic and therapeutic effects of kaempferol on experimental *Trichinella spiralis* infection. *Journal of Helminthology*, 97, e36.

- Maghsoudlou, A., Mahoonak, A. S., Mohebodini, H., & Toldra, F. (2019). Royal jelly: chemistry, storage and bioactivities. *Journal of apicultural Science*, 63(1), 17-40.
- Mahmoudi, M., Saberi, S., Manouchehri, P., Mohebal, M., Parsaeian, M., Hesari, Z., Seratnahaei, M., Behrouzfar, H., & Zahraei-Ramazani, A. (2022). Therapeutic effects of propolis, royal jelly, ostrich oil, and Aloe vera on cutaneous Leishmaniasis lesions in a laboratory model. *Microbiology, Metabolites and Biotechnology*, 5(1), 1-11.
- Mahmud, R., Lim, Y. A. L., & Amir, A. (2017). Medical parasitology. *Cham, Switzerland: Springer International Publishing*.
- Mathis, A., Weber, R., & Deplazes, P. (2005). Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 423-445.
- Matos, O., Lobo, M. L., & Xiao, L. (2012). Epidemiology of Enterocytozoon bienueusi infection in humans. *Journal of parasitology research*, 2012.
- Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, I., Takei, H., & Hagiwara, S. (1959). A case of Encephalitozoon-like body infection in man. *Arch. Pathol.*, 67(2), 181-187.
- Mead, J. R., & McNair, N. (2006). Antiparasitic activity of flavonoids and isoflavones against Cryptosporidium parvum and Encephalitozoon intestinalis. *FEMS Microbiology Letters*, 259(1), 153-157.
- Memariani, H., Memariani, M., & Ghasemian, A. (2024). Quercetin as a Promising Antiprotozoan Phytochemical: Current Knowledge and Future Research Avenues. *BioMed Research International*, 2024.
- Meng, X., Feng, Y., & Xiao, L. (2024). Biology and pathogenesis of Enterocytozoon spp. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 2813-2821). Elsevier.
- Menna-Barreto, R. F., Salomão, K., Dantas, A. P., Santa-Rita, R. M., Soares, M. J., Barbosa, H. S., & de Castro, S. L. (2009). Different cell death pathways induced by drugs in Trypanosoma cruzi: an ultrastructural study. *Micron*, 40(2), 157-168.
- Meo, S. A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L., & Ansari, M. J. (2017). Role of honey in modern medicine. *Saudi journal of biological sciences*, 24(5), 975-978.
- Mohammed, S. E. A., Kabbashi, A. S., Koko, W. S., Ansari, M. J., Adgaba, N., & Al-Ghamdi, A. (2019). In vitro activity of some natural honeys against Entamoeba histolytica and Giardia lamblia trophozoites. *Saudi journal of biological sciences*, 26(2), 238-243.
- Moretto, M., Weiss, L. M., & Khan, I. A. (2004). Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral Encephalitozoon cuniculi infection. *The Journal of Immunology*, 172(7), 4402-4409.
- Moss, J. A., & Snyder, R. A. (2017). Biofilms for monitoring presence of microsporidia in environmental water. *journal of eukaryotic microbiology*, 64(4), 533-538.
- Moura, H., Schwartz, D. A., Bornay-Llinares, F., & Sodre, F. C. (1997). A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 121(8), 888.
- Muchtar, N. H., Zin, N. N. I. N. M., Mohamad, F. S., & Abu-Bakar, N. (2022). Ellagic acid induces in vitro alkalisation of the digestive vacuole in drug-sensitive Plasmodium falciparum strain. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 29(4), 43.
- Mumcuoglu, I., Cetin, F., Dogruman Al, F., Oguz, I., & Aksu, N. (2016). Prevalence of microsporidia in healthy individuals and immunocompetent patients with acute and chronic diarrhea. *Infectious Diseases*, 48(2), 133-137.
- Mura, A., Pusceddu, M., Theodorou, P., Angioni, A., Floris, I., Paxton, R. J., & Satta, A. (2020). Propolis consumption reduces Nosema ceranae infection of European honey bees (Apis mellifera). *Insects*, 11(2), 124.
- Murat, E. (2024). *Bingöl yöresi bal örneklerinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu ve bazı biyolojik aktivitelerinin araştırılması* [Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Müller, A., Stellermann, K., Hartmann, P., Schrappe, M., Fätkenheuer, G., Salzberger, B., Diehl, V., & Franzen, C. (1999). A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(2), 243-246.
- Münstedt, K., Bargello, M., & Hauenschild, A. (2009). Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects. *Journal of Medicinal food*, 12(5), 1170-1172.

- Nageli, C. (1857). über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen.[Abstract of report before 33. Versamml. Deutsch. Naturf. u. Aerzte. Bonn, 21 Sept.]. *Bot. Ztg.*, 15, 760-761.
- Nainu, F., Masyita, A., Bahar, M. A., Raihan, M., Prova, S. R., Mitra, S., Emran, T. B., & Simal-Gandara, J. (2021). Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties. *Antibiotics (Basel)*, 10(7).
- Nilforoushzadeh, M. A., Jaffary, F., Moradi, S., Derakhshan, R., & Haftbaradaran, E. (2007). Effect of topical honey application along with intralesional injection of glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *BMC complementary and alternative medicine*, 7, 1-4.
- Ning, R., Chen, G., Fang, R., Zhang, Y., Zhao, W., & Qian, F. (2021). Diosmetin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis through STAT3/c-Myc signaling pathway in human osteosarcoma cells. *Biological Research*, 54(1), 40.
- Nsagha, D. S., Njunda, A. L., Assob, N. J. C., Ayima, C. W., Tanue, E. A., Kibu, O. D., & Kwenti, T. E. (2015). Intestinal parasitic infections in relation to CD4+ T cell counts and diarrhea in HIV/AIDS patients with or without antiretroviral therapy in Cameroon. *BMC Infectious Diseases*, 16, 1-10.
- Nunez, F., Escobedo, A., & Finlay, C. (2004). Efficacy of various drugs for treatment of Giardia lamblia infection in children. *Rev Panam Infectol*, 6, 1720.
- Organization, W. H. (1983). PARASITIC DISEASE SURVEILLANCE: Antibody to Encephalitozoon cuniculi in Man. *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 58(05), 30-32.
- Organization, W. H. (2020). Ethics and vector-borne diseases: WHO guidance.
- Orlandi, P. A., Chu, D.-M. T., Bier, J. W., & Jackson, G. J. (2002). Parasites and the food supply. *Food Technology-Champaign Then Chicago-*, 56(4), 72-79.
- ORUÇ, H. H., & ÇAYCI, M. (2021). Arı Ürünleri ve Biyolojik Etkileri. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 7(1), 84-89.
- Otoguro, K., Iwatsuki, M., Ishiyama, A., Namatame, M., Nishihara-Tsukashima, A., Kiyohara, H., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Ōmura, S., & Yamada, H. (2012). In vitro antitrypanosomal activity of some phenolic compounds from propolis and lactones from Fijian Kawa (Piper methysticum). *Journal of natural medicines*, 66, 558-561.
- Ozdal, T., Ceylan, F. D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E. O., & Capanoglu, E. (2019). Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International*, 122, 528-536.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Patel, S. (2016). Emerging adjuvant therapy for cancer: propolis and its constituents. *Journal of dietary supplements*, 13(3), 245-268.
- Pavel, C. I., Mărghițaș, L. A., Bobiș, O., Dezmirean, D. S., Șapcaliu, A., Radoi, I., & Mădaș, M. N. (2011). Biological activities of royal jelly-review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 108-108.
- Pavel, C. I., Mărghițaș, L. A., Dezmirean, D. S., Tomoș, L. I., Bonta, V., Șapcaliu, A., & Buttstedt, A. (2014). Comparison between local and commercial royal jelly—use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameter. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 116-123.
- Pavie, J., Menotti, J., Porcher, R., Donay, J. L., Gallien, S., Sarfati, C., Derouin, F., & Molina, J.-M. (2012). Prevalence of opportunistic intestinal parasitic infections among HIV-infected patients with low CD4 cells counts in France in the combination antiretroviral therapy era. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(9), e677-e679.
- Petelin, A., Kenig, S., Kopinč, R., Deželak, M., Černelič Bizjak, M., & Jenko Pražnikar, Z. (2019). Effects of royal jelly administration on lipid profile, satiety, inflammation, and antioxidant capacity in asymptomatic overweight adults. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Peterson, T. S., Spitsbergen, J. M., Feist, S. W., & Kent, M. L. (2011). Luna stain, an improved selective stain for detection of microsporidian spores in histologic sections. *Diseases of aquatic organisms*, 95(2), 175-180.
- Pink, R., Hudson, A., Mouriès, M.-A., & Bendig, M. (2005). Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 4(9), 727-740.

- Polley, S. D., Boadi, S., Watson, J., Curry, A., & Chiodini, P. L. (2011). Detection and species identification of microsporidial infections using SYBR Green real-time PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 60(4), 459-466.
- Pospisilova, Z., Ditrich, O., Stankova, M., & Kodym, P. (1997). Parasitic opportunistic infections in Czech HIV-infected patients—a prospective study. *Central european journal of public health*, 5(4), 208-213.
- Pourmoradian, S., Mahdavi, R., Mobasser, M., Faramarzi, E., & Mobasser, M. (2014). Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial. *Chinese journal of integrative medicine*, 20, 347-352.
- Ramadan, M. F., & Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of functional foods*, 4(1), 39-52.
- Ramanan, P., & Pritt, B. S. (2014). Extraintestinal microsporidiosis. *Journal of clinical microbiology*, 52(11), 3839-3844.
- Ryan, E. T., Hill, D. R., Solomon, T., Aronson, N., & Endy, T. P. (2019). *Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases*. Elsevier Health Sciences.
- Saffo, Z., & Mirza, N. (2019). Successful treatment of Enterocytozoon bienersi gastrointestinal infection with nitazoxanide in a immunocompetent patient. *IDCases*, 18, e00586.
- Sak, B., Kváč, M., Kučerová, Z., Květoňová, D., & Saková, K. (2011). Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals—a longitudinal study. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(5), e1162.
- Sak, B., Salat, J., Horka, H., Saková, K., & Ditrich, O. (2006). Antibodies enhance the protective effect of CD4⁺ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with Encephalitozoon cuniculi. *Parasite immunology*, 28(3), 95-99.
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T., & Samini, F. (2017). Honey and health: A review of recent clinical research. *Pharmacognosy research*, 9(2), 121.
- Seatamanoch, N., Kongdachalert, S., Sunantaraporn, S., Siriyasatien, P., & Brownell, N. (2022). Microsporidia, a highly adaptive organism and its host expansion to humans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 924007.
- Sen, G., Mukhopadhyay, S., Ray, M., & Biswas, T. (2008). Quercetin interferes with iron metabolism in Leishmania donovani and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 1066-1075.
- Sforzin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253-260.
- SHADDUCK, J. A., & POLLEY, M. B. (1978). Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of Encephalitozoon cuniculi. *The Journal of protozoology*, 25(4), 491-496.
- Shahrul Anuar, T., M. Al-Mekhlafi, H., Md Salleh, F., & Moktar, N. (2013). New insights of microsporidial infection among asymptomatic aboriginal population in Malaysia. *PloS one*, 8(8), e71870.
- Sharma, S., Das, S., Joseph, J., Vemuganti, G. K., & Murthy, S. (2011). Microsporidial keratitis: need for increased awareness. *Survey of ophthalmology*, 56(1), 1-22.
- Sherafati, J., Dayer, M. S., Ghaffarifar, F., Akbarzadeh, K., & Pirestani, M. (2023). Evaluating leishmanicidal effects of Lucilia sericata products in combination with Apis mellifera honey using an in vitro model. *PloS one*, 18(8), e0283355.
- Shi, H., Yang, H., Zhang, X., & Yu, L. (2012). Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory and radical scavenging properties of methanolic extracts of Chinese propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(50), 12403-12410.
- Shirzad, M., Kordyazdi, R., Shahinfard, N., & Nikokar, M. (2013). Does Royal jelly affect tumor cells? *Journal of HerbMed Pharmacology*, 2(2), 45-48.
- Siheri, W., Alenezi, S., Tusiimire, J., & Watson, D. G. (2017). The chemical and biological properties of propolis. *Bee products-chemical and biological properties*, 137-178.
- Siheri, W., Ebiloma, G. U., Igoli, J. O., Gray, A. I., Biddau, M., Akrachalanont, P., Alenezi, S., Alwashih, M. A., Edrada-Ebel, R., & Muller, S. (2019). Isolation of a novel flavanone and an alkylresorcinol with highly potent anti-trypanosomal activity from Libyan propolis. *Molecules*, 24(6), 1041.
- Siheri, W., Zhang, T., Ebiloma, G. U., Biddau, M., Woods, N., Hussain, M. Y., Clements, C. J., Fearnley, J., Ebel, R. E., & Paget, T. (2016). Chemical and antimicrobial profiling of propolis from different regions within Libya. *PloS one*, 11(5), e0155355.

- Silva, M. P., Silva, T. M., Mengarda, A. C., Salvadori, M. C., Teixeira, F. S., Alencar, S. M., Luz Filho, G. C., Bueno-Silva, B., & de Moraes, J. (2021). Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden and egg production in an mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Ethnopharmacology*, 264, 113387.
- Simões-Pires, C. A., Vargas, S., Marston, A., Ioset, J.-R., Paulo, M. Q., Matheeußen, A., & Maes, L. (2009). Ellagic acid derivatives from *Syzygium cumini* stem bark: investigation of their antiplasmodial activity. *Natural product communications*, 4(10), 1934578X0900401012.
- Singh, M., Kane, G., & Mackinlay, L. (1982). Detection of antibodies to *Nosema cuniculi* (Protozoa: Microsporidia) in human and animal sera by the indirect fluorescent antibody technique. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.*, 13(1), 110-113.
- Sinha, S., Prakash, A., Sehgal, R., & Medhi, B. (2018). Comparative effect of manuka honey on anaerobic parasitic protozoans with standard drug therapy under in vitro conditions: A preliminary study. *Indian Journal of Pharmacology*, 50(4), 197.
- Ślodka-Kowalska, A., Graczyk, T. K., Tamang, L., Jedrzejewski, S., Nowosad, A., Zduniak, P., Solarczyk, P., Girouard, A. S., & Majewska, A. C. (2006). Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 4540-4544.
- Soule, J. B., Halverson, A. L., Becker, R. B., Pistole, M. C., & Orenstein, J. M. (1997). A patient with acquired immunodeficiency syndrome and untreated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* microsporidiosis leading to small bowel perforation. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 121(8), 880.
- Southern, T. R., Jolly, C. E., Lester, M. E., & Hayman, J. R. (2007). EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro. *Eukaryotic cell*, 6(8), 1354-1362.
- Sunyoto, T., Verdonck, K., El Safi, S., Potet, J., Picado, A., & Boelaert, M. (2018). Uncharted territory of the epidemiological burden of cutaneous leishmaniasis in sub-Saharan Africa—A systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(10), e0006914.
- Tachezy, J. (2019). *Hydrogenosomes and mitosomes: mitochondria of anaerobic eukaryotes* (Vol. 9). Springer.
- Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., & Menotti, J. (2010). Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *Journal of clinical microbiology*, 48(7), 2651-2653.
- Tanveer, N., & Barman, S. (2015). Microsporidium infection and perforation peritonitis: A rare association. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS*, 36(2), 188-191.
- Thellier, M., & Breton, J. (2008). Enterocytozoon bienersi in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite*, 15(3), 349-358.
- Thelohan, P. (1894). Sur la presence d'une capsule a filament dans les spores des microsporidies. *CR Acad Sci*, 118, 1425-1427.
- Topalkara, A., Vural, A., Polat, Z., Toker, M. I., Arici, M. K., Ozan, F., & Cetin, A. (2007). In vitro amoebicidal activity of propolis on *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, 23(1), 40-45.
- Torres, C. M. (1927). A New Disease Parasite of Man, *Encephalitozoon chagasi*, found in Muscle and Nervous Tissue. *Compte rendu des seances de la Societe de biologie*, 97(36).
- Van Gool, T., Canning, E., Gilis, H., Weerman, M. V. D. B., Schattenkerk, J. E., & Dankert, J. (1994). *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology*, 109(3), 281-289.
- Van Gool, T., Snijders, F., Reiss, P., Schattenkerk, J. E., Van den Bergh Weerman, M., Bartelsman, J., Bruins, J., Canning, E., & Dankert, J. (1993). Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *Journal of Clinical Pathology*, 46(8), 694-699.
- Vávra, J., & Ronny Larsson, J. (2014). Structure of microsporidia. *Microsporidia: pathogens of opportunity*, 1-70.
- Velásquez, J. N., di Risio, C., Etchart, C., Chertcoff, A. V., Astudillo, O. G., & Carnevale, S. (2019). Multimethodological approach to gastrointestinal microsporidiosis in HIV-infected patients. *Acta parasitologica*, 64, 658-669.

- Wang, Y., Ma, L., Zhang, W., Cui, X., Wang, H., & Xu, B. (2016). Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 47, 48-56.
- Wang, Z.-D., Liu, Q., Liu, H.-H., Li, S., Zhang, L., Zhao, Y.-K., & Zhu, X.-Q. (2018). Prevalence of *Cryptosporidium*, microsporidia and *Isospora* infection in HIV-infected people: a global systematic review and meta-analysis. *Parasites & vectors*, 11, 1-19.
- Weber, R., Bryan, R. T., Owen, R. L., Wilcox, C. M., Gorelkin, L., Visvesvara, G. S., & Group*, E. O. I. W. (1992). Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *New England Journal of Medicine*, 326(3), 161-166.
- Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A., & Owen, R. L. (1994). Human microsporidial infections. *Clinical microbiology reviews*, 7(4), 426-461.
- Weiss, L. M., & Becnel, J. J. (2014). *Microsporidia*. Springer.
- Wichro, E., Hoelzl, D., Krause, R., Bertha, G., Reinhaller, F., & Wenisch, C. (2005). Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73(2), 285-287.
- Willson, R., Harrington, R., Stewart, B., & Fritsche, T. (1995). Human immunodeficiency virus 1—associated necrotizing cholangitis caused by infection with *Septata intestinalis*. *Gastroenterology*, 108(1), 247-251.
- Wittner, M. (1999). The microsporidia and microsporidiosis. (No Title).
- Wolf, A. (1937). Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull. Neurol. Inst. NY*, 6, 306-371.
- Xu, Y., Takvorian, P. M., Cali, A., Orr, G., & Weiss, L. M. (2004). Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infection and immunity*, 72(11), 6341-6350.
- YAMAN, M., ALGI, G., & GÜNER, B. G. (2015). Microsporidia Karakterizasyonunda Morfolojik ve Ultrastrüktürel Özellikler. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39(1), 52-59.
- Yang, D., Pan, L., Chen, Z., Du, H., Luo, B., Luo, J., & Pan, G. (2018). The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes. *Experimental parasitology*, 187, 93-100.
- Yesmin, S., Paul, A., Naz, T., Rahman, A., Akhter, S. F., Wahed, M. I. I., Emran, T. B., & Siddiqui, S. A. (2020). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). *Clinical Phytoscience*, 6(1), 1-10.
- Yousuf, F. A., Mehmood, M. H., Malik, A., Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2016). Antiacanthamoebic properties of natural and marketed honey in Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 967-972.
- Zhang, S., Shao, Q., Shen, Z., & Su, S. (2017). Immunomodulatory response of 4T1 murine breast cancer model to camellia royal jelly. *Biomed Res*, 28(3), 1223-1230.
- Zhao, L., Jin, L., & Yang, B. (2023). Diosmetin alleviates *S. aureus*-induced mastitis by inhibiting SIRT1/GPX4 mediated ferroptosis. *Life Sciences*, 331, 122060.
- Zulhendri, F., Chandrasekaran, K., Kowacz, M., Ravalia, M., Kripal, K., Fearnley, J., & Perera, C. O. (2021). Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis: A review. *Foods*, 10(6), 1360.