

Apis mellifera Türü Arı Zehrinin Enzimatik Aktivitelerinin Araştırılması

Hilal Erdoğan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2024

Investigation of Enzymatic Activities of *Apis mellifera* Species Bee Venom

Hilal Erdoğan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

December 2024

Apis mellifera Türü Arı Zehrinin Enzimatik Aktivitelerinin Araştırılması

Hilal Erdoğan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Figen Çalışkan

Aralık 2024

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi **Hilal Erdoğan**'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Apis mellifera* Türü Arı Zehrinin Enzimatik Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

İkinci Danışman :

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

Üye: Prof. Dr. İlknur DAĞ

Üye: Doç. Dr. Emel ERGENE

Üye:

Üye:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Figen Çalışkan danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Apis mellifera* Türü Arı Zehrinin Enzimatik Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 17/12/2024

Hilal Erdoğan

İmza

ÖZET

Ülkemiz sahip olduğu ekolojik zenginlik ile 5 saf bal arısı ırkına (Anadolu arısı, Kafkas arısı, Karniyol arısı, İran arısı ve Suriye arısı) ve bir çok farklı ekotipe (Gökçeada arısı, Muğla arısı, Yığılca arısı, Efe arısı vb.) ev sahipliği yapmaktadır. Bal arısı ırk ve ekotipleri farklı fizyolojik, morfolojik ve davranışsal özellikler taşır. Arı zehri, bal arılarının zehir bezlerinden ürettikleri; enzimler, düşük moleküllü bileşikler ve peptidlerden oluşan kompleks bir karışımdır. İçeriğinde fosfolipaz A2, fosfolipaz B, hyaluronidaz, fosfataz ve α -glukosidaz aktiviteli peptidler bulunur. Ayrıca melittin, apamin, mast hücre degranüle edici peptid, adolapin, tertiapin, secapin ve kardiyopep gibi biyoaktif bileşenler içerir.

Bu çalışmada Ankara, İzmir ve Mersin olmak üzere üç farklı bölgeden elektriksel stimülasyon yöntemi ile toplanan *Apis mellifera* L. ham zehrinin bileşenleri kromatografik ve elektroforetik yöntemler ile ayrıştırılmış ve karışımların peptid profilleri ortaya çıkarılmıştır. Ham zehrin proteolitik aktivitesi jelatin ve kazein substratları varlığında zimogram çalışması ile belirlenmiştir. Ayrıca ham zehrin hyaluronidaz ve fosfolipaz aktiviteleri araştırılmıştır. Ankara, İzmir ve Mersin zehrinin HPLC sonuçlarına göre fraksiyon sayıları sırasıyla en az 30, 52 ve 40'tır. SDS-PAGE analizlerinde üç lokalite de benzer protein bantları göstermiştir. Zimogram analizinde pH 7,4'te 37-52 kDa aralığında kazeinolitik aktivite gözlenmiştir, İzmir zehrinde ek olarak 30-37 kDa aralığında da kazeinolitik aktivite tespit edilmiştir. Jelatinolitik etki yalnızca İzmir zehrinde 95-130 kDa ve 270 kDa civarında belirlenmiştir. Fosfolipaz testinde 16 saat inkübasyonda her üç zehirde 1 cm zon çapı ile PLA2 aktivitesi, 6,5-16 kDa aralığında ise hyaluronidaz aktivitesi gözlenmiştir.

Çalışma sonuçları ile bal arısı zehirlerinde varlığı gösterilen proteolitik, lipolitik ve hyaluronidaz etkili peptidlerin arı zehirlerinin tıbbi ve ticari kullanımının potansiyelini göstermektedir. Her lokalitede bulunan aynı tür arı ırklarında dahi intraspesifik varyasyonlar ile yapısal farklılıklar gösterme potansiyeli içeren zehirlerin, enzimatik etkili bileşenlerinin zehir aktivasyon mekanizmasını anlamak içinde yararlı araçlar olacağı öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Apis mellifera*, bal arısı zehri, proteolitik, fosfolipaz, hyaluronidaz

SUMMARY

Our country, with its ecological richness, hosts 5 pure honey bee races (Anatolian bee, Caucasian bee, Carniolan bee, Iranian bee and Syrian bee) and many different ecotypes (Gökçeada bee, Muğla bee, Yığılca bee, Efe bee etc.). Honey bee races and ecotypes have different physiological, morphological and behavioral characteristics. Bee venom is a complex mixture of enzymes, low-molecular compounds and peptides produced by honey bees from their venom glands. It contains phospholipase A₂, phospholipase B, hyaluronidase, phosphatase and α -glucosidase peptides. It also contains bioactive components such as melittin, apamin, mast cell degranulating peptide, adolapin, tertiapin, secapin and cardiopep.

In this study, the raw of *Apis mellifera* L. was collected from three different regions (Ankara, İzmir, and Mersin) using the electrical stimulation method. The components were separated using chromatographic and electrophoretic methods, and the peptide profiles of the mixtures were analyzed. The proteolytic activity of the raw was determined using zymogram analysis with gelatin and casein substrates. Furthermore, the hyaluronidase and phospholipase activities of the raw were investigated. According to HPLC results of Ankara, İzmir and Mersin venoms, the fraction numbers are at least 30, 52 and 40, respectively. In SDS-PAGE analysis, all three localities showed similar protein bands. In zymogram analysis, caseinolytic activity was observed in the range of 37-52 kDa at pH 7.4, and in addition, caseinolytic activity was detected in the range of 30-37 kDa in İzmir venom. Gelatinolytic effect was determined only in İzmir venom at around 95-130 kDa and 270 kDa. In the phospholipase test, PLA₂ activity with a zone diameter of 1 cm and hyaluronidase activity in the range of 6.5-16 kDa were observed in all three venoms after 16 hours of incubation.

The findings of this study highlight the proteolytic, lipolytic, and hyaluronidase-active peptides present in honeybee venom, demonstrating its potential for medical and commercial applications. The venom, even within the same bee species across different localities, shows potential for structural variations due to intraspecific differences. These enzymatically active components may serve as valuable tools for understanding activation mechanisms

Keywords: *Apis mellifera*, honey bee venom, proteolytic, phospholipase, hyaluronidase

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecime başlama sürecimden itibaren yardımlarını esirgemeyen, bütün çalışmalarımda ışığıyla yolumu aydınlatan ve her an yanımda olarak beni destekleyen sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışma sırasında İzmir ve Mersin illerinden olan materyallerinin toplanması ulaştırılmasında ve uygun koşullarda saklanmasında büyük emeği olan Sayın Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY, Sayın Prof. Dr. Banu YÜCEL, Sayın Arş. Gör. Ekin VAROL'a ve Ankara ilinden toplanan örnekler için Ar-Sum Apimak firmasından Sayın Hakan ŞEN'e teşekkür ederim.

Yükseklisansa adım atmamı sağlayan, iş kapılarını bana açarak bilgi ve tecrübeleri ışığında beni aydınlatan ve her daim ileri götüren Sayın Bülent KOCAMAN, Sayın Enver SEÇER ve MSTLAB ailesine teşekkürü borç bilirim.

Tüm süreçlerde olduğu gibi lisans hayatımda da önemli rolü olan, yüksek lisansım sürecinde uzakta olsa da manevi olarak her zaman motivasyon veren çok sevgili, canım dostum Biyolog Betül TİMUÇİN'e teşekkür ederim.

Labaratuvar çalışmalarım boyunca kromatografi, jel dökme ve görüntüleme yanımda olan desteğini esirgemeyen Biyolog İrem ATAL'a teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde sevgileriyle arkamda duran, her zaman destekleyen, başarılarımın en büyük sahipleri sevgili eşim ve aileme tüm kalbim ile teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Türkiye’de Arıcılık	3
2.2. Propolis	5
2.3. Arı Sütü	5
2.4 Arı Zehri	5
2.4.1. Arı zehrinin kimyasal yapısı ve fizikokimyasal özellikleri	6
2.4.2. Melittin, fosfolipaz ve apamin	7
2.5. Arı Zehrinin Kullanım Alanları	10
2.6. Apiterapi	12
2.7. Proteolitik Enzimlerin Yapısı Ve Fonksiyonu	13
2.8. Proteolitik Enzimlerin Sınıflandırılması.....	13
2.9. Zehirler ve Enzimatik Aktiviteleri.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Ham Zehir Eldesi.....	15
3.2. Zehir Protein Miktarının Belirlenmesi	15
3.3. Ham Zehrin Sıvı Kromatografisinde Saflaştırılması	15
3.4. Ham Zehir Örneklerinin Elektroforetik Profiline Belirlenmesi	16
3.4.1. Poliakrilamid jel elektroforezi	16
3.4.2 Elektroforez sonrası jelin görüntülenmesi	18
3.5. SDS-PAGE’de Zimogram Yöntemi ile Proteolitik Aktivite Belirlenmesi.....	18
3.5.1. Proteolitik aktivitenin SDS-PAGE-kazein ve jelatin ile belirlenmesi.....	18
3.5.2. SDS-PAGE’de zimogram yöntemi ile hyaluronidaz aktivite belirlenmesi	19
3.5.3 SDS-PAGE’de zimogram yöntemi ile fosfolipaz aktivite belirlenmesi.....	19
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	21
4.1. Ham Zehir Eldesi Bulguları ve Tartışması	21
4.2. Ham Zehirlerin Sıvı Kromatografisi Profil Sonuçları ve Tartışması	22

İÇİNDEKİLER

4.3. <i>Apis mellifera</i> L. Ham Zehirlerinin Elektroforetik Profil Sonuçları Ve Tartışması	27
4.4. Ham Zehirlerin Fosfolipaz Aktivitesi Sonuçları Ve Tartışması.....	30
4.5. Ham Zehirlerinin Hyalüronidaz Aktivitesi Sonuçları Ve Tartışması.....	32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	36



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Avrupa bal arısı <i>Apis mellifera</i> (A) ve liyofilize arı zehri (B).....	6
2.2. Melittin'in moleküler yapısı.....	8
2.3. Apamin moleküler yapısı.....	9
4.1. Ankara lokalitesinin ham zehrinin 0-60 % B metodu ile ayrıştırılmış RP-HPLC kromotogramı.....	23
4.2. İzmir lokalitesinin. ham zehrinin 0-60 % B metodu ile ayrıştırılmış RP-HPLC kromotogramı.....	24
4.3. Mersin lokalitesinin ham zehrinin 0-60 % B metodu ile ayrıştırılmış RP-HPLC kromotogramı.....	25
4.4. <i>Apis mellifera</i> L. ham zehirlerinin Tris-Trisin SDS-PAGE profili.....	27
4.5. <i>Apis mellifera</i> L. ham zehirlerinin Tris-Glisin SDS-PAGE profili	29
4.6. A: <i>Apis mellifera</i> L. ham zehir örneklerinin kazeinolitik aktivitesi, B: <i>Apis mellifera</i> L. ham zehir örneklerinin jelatinolitik aktivitesi.....	30
4.7. <i>Apis mellifera</i> ham zehirlerinin fosfolipaz A2 aktivitesi.....	30
4.8. <i>Apis mellifera</i> L. ham zehirlerinin hyalüronidaz aktivitesi.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

2.1. Arı zehrinin kuru madde bileşenleri.....	7
2.2. Deney hayvanları ve hücre kültürü deneylerinde arı zehrinin etkileri.....	11
4.1. Ham zehir örneklerinin protein ölçüm sonuçları.....	21



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler****Açıklama**

Da	Dalton (gr/mol)
kDA	Kilodalton
°C	Santigrat Derece
%	Yüzelik
µg	Mikrogram

Kısaltmalar**Açıklama**

APS	Amonyum Persülfat
cm	Santimetre
dk	Dakika
DTT	Dikloro Difenil Trikloroetan
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
vd.	Ve diğerleri
HA	Hyalünorik Asit
HCL	Hidroklorik Asit
M	Molar
mAU	Mili Absorbans Ünitesi
mg	Miligram

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
PLA2	Fosfolipaz A2
R _T	Alıkonma Zamanı
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TFA	Trifloro Asetik Asit
V	Volt
vb.	Ve benzeri

Amino asit kısaltmaları

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
A	Alanin
C	Sistein
D	Aspartik asit
E	Glutamik asit
F	Fenilalanin
G	Glisin
H	Histidin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
I	İzolösin
K	Lizin
L	Lösin
M	Metiyonin
N	Asparagin
P	Prolin
R	Arginin
S	Serin
T	Treonin
V	Valin
W	Triptofan
Q	Glutamin
Y	Tirozin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bal arıları (*Apis mellifera* L.), küresel ekosistemlerin tozlaşmasında ve sürdürülebilirliği bakımından önemli bir rol oynar. Bu nedenle, sağlıkları ve hayatta kalmaları tarım ve biyolojik çeşitlilik için hayati önem taşır (Klein vd., 2007). Arı zehri, aktif enzimler, peptidler ve proteinler içeren farmakolojik olarak karmaşık bir karışımdır. Arı zehri, arının sokma aparatının bir salgısıdır ve arıları düşmanlardan korumak için kullanılır. Arı zehrinin antibakteriyel, antiinflamatuvar, radyoprotektif, antimutajenik, bağışıklık artırıcı, antinosiseptif, antikanser ve hepatosit koruyucu aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur, bu nedenle halk sağlığında birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Abdel vd., 2023).

Arı zehri üzerine yapılan birçok araştırma, bu doğal bileşiğin çeşitli insan kanser hücre hatları üzerinde dikkat çekici anti-kanser etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu etkiler arasında hepatoselüler karsinom, servikal karsinom kolon, meme, ovaryum, mesane, lösemi gibi farklı kanser türleri bulunmaktadır. Araştırmalar, arı zehrinin anti-kanser etkilerinin, apoptozun tetiklenmesi, nekrozun indüklenmesi, hücre toksisitesinin artırılması ve hücre çoğalmasının engellenmesi gibi çeşitli mekanizmalarla ilişkili olduğunu göstermektedir. *In vitro* çalışmaların yanı sıra, *in vivo* deneyler de katı tümörlerin büyümesinin ve metastazının engellenebileceğini doğrulamıştır. Bal arısı zehirleri genelde kanser tedavisi için doğal kaynak olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, arı zehrinin anti-kanser etkisinin büyük ölçüde melittin adlı peptidin sinerjik etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, melittin, ham arı zehrine kıyasla daha etkili bir tedavi seçeneği olarak öne çıkmaktadır (Oršolić, 2012).

Arı zehrinin güçlü antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Arı zehri ve temel bileşenleri olan PLA2 ile melittin, dış çürüğüne yol açan oral patojenler üzerinde etkili bir şekilde test edilmiştir. Arı zehrinin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), *S. Sobrinus*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *L. casei*, *S. sanguinis* ve *E. faecalis* gibi bakteriler için 20 ila 40 µg/mL arasında değişmektedir. Melittin, 4 ila 40 µg/mL aralığında MİK değerlerine sahipken, PLA2'nin MİK değeri 400 µg/mL'nin üzerindedir. Ayrıca arı zehrinin, belirli bakterilere karşı bazı geleneksel ilaçlarla birlikte kullanıldığında etkili, güvenli ve sinerjik bir etki oluşturduğu gösterilmiştir.

Arı zehri ve bileşenlerinin, zarflı ve zarfsız birçok virüse karşı etkili antiviral özellikler sergilediği bilinmektedir. Özellikle papilloma virüsleri (HPV), serviks kanserinin başlıca nedenlerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Araştırmalar, arı zehrinin HPV'nin E6/E7 proteinlerini baskılayarak serviks kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyebildiğini göstermektedir. Ayrıca, arı zehri ve onun temel bileşenlerinden biri olan melittin, Th1 sitokinleri (IFN- γ ve IL-12) ile CD3+ CD8+, CD4+ CD8+ ve $\gamma\delta$ T hücreleri gibi bağışıklık hücrelerinin etkinliğini artırarak domuz üreme ve solunum sendromu virüsüne (PRRSV) karşı bağışıklık tepkisi oluşturabilir. Bu bağışıklık tepkisi, PRRSV ile enfekte domuzlarda viral yükün azalmasına ve interstisyel pnömoninin şiddetinin hafiflemesine katkı sağlayabilir (El-Seedi vd., 2020).

Bal arısı zehirleri kompleks biyoaktif karışımlardır ve ana bileşen, kuru ağırlığın yaklaşık % 50'si kadar olan melittindir . 26 amino asitli aktif peptid, biyosentez sırasında öncüsü promelittinden salınır ve arı zehrindeki birincil alerjen olmasının yanı sıra hemolitik bir aktivite gösterir. Baskın olarak hidrofobik bir N-terminal bölgesi ve hidrofilik bir C-terminal bölgesi olan, zarla bağlı sitolitik, kanal oluşturan peptidlerin ve trans-membran protein helikslerinin karakteristik yapısına sahip amfifilik bir peptiddir. Fosfolipaz A2 (PLA2) ile sinerjik olarak etki eder, bu enzim zehrin kuru ağırlığının yaklaşık % 11'ine karşılık gelir. Histamin, hiyaluronidaz, dopamin ve noradrenalin , 5-hidroksitriptamin (5-HT) ve fosfolipaz A2 gibi farklı bal arısı zehri bileşenlerinin seviyelerinin bireylerin yaşına veya yılın mevsimine göre değişebileceği gösterilmiştir (Sciani vd., 2010).

Apis mellifera L. zehir örneklerinin enzimatik aktivitelerinin araştırılması bu tezin ana amacını oluşturmaktadır. Ana amaç kapsamında ilk olarak Ankara, İzmir ve Mersin illerinden toplanan arıların ham zehirleri elektrostimülasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiş ve Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi tekniği ile ham zehirdeki peptid profilleri ve moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Proteolitik aktivite jelatin ve kazein substratlarda zimogram yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca ham zehir örneklerinin hiyaluronidaz ve fosfolipaz aktiviteleri de araştırılmıştır.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bulguların, ülkemizin arıcılık sektörüne ve ekonomisine, arı zehirlerinin tıbbi ve ticari kullanım potansiyeli açısından önemli katkılar sağlaması beklenmektedir.

2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Türkiye’de Arıcılık

Son yıllarda olduğu gibi ülkemizde de geleneksel ve alternatif tedavi yöntemleri modern tıp ile birlikte kullanılmaya başlanmıştır. İlaçların olası yan etkileri nedeni ile yerine bitkisel ve doğal ürünlerin kullanımına yönelim bir çok ülkede gözlenen bir toplumsal tercih olmuştur. Bu söz konusu doğal ürünlerin içerisinde arı ürünleri de yer almaktadır. Sağlık için kullanılan ürünler, doğal olsalar da her zaman kontrollü bir şekilde kullanılmalıdır. Son yıllarda doğal ürünlerin etki mekanizmasıyla ilgili bilimsel çalışmalar ve sağlık problemleri araştırılmaya başlanmıştır.

Her ülkede, o ülkedeki ekolojik koşullara uyum sağlayan yerel ekotiplere sahip bal arısı ırkları vardır. Türkiye, Kafkas, Suriye, Kıbrıs, İtalya, Anadolu ve Camiolan bal arısı ırklarıyla çevrili ve ülkemiz bu ırkların doğal üreme alanlarına sahip bir coğrafi bölgede yer almaktadır. Doğu Anadolu’da Kafkas arıları, Ege Bölgesi’nde İtalyan arıları ve Güney Anadolu’da, Kıbrıs bal arılarının ekotiplerini, bölgenin ekolojisine uyum sağlayan, değişen oranlarda saf veya melez ırklar olarak görmek mümkündür. Bal arıları, her ırkta birbirinden farklı belirli özelliklere sahiptir. Propolis toplanması açısından bakıldığında farklı bal arısı ırkları arasında farklılık gösterir. Karniyolların en önemli özelliği propolisin minimum düzeyde kullanılmasıdır; Kafkas bal arısı ırkları ise tarak-tarak yapımında ve propolis kullanımında aşırıya kaçarlar. Propolisin ve destek tarağının bu anormal kullanımı, modern kovanlarda arıların manipülasyonunu çok zorlaştırmakta ve dolayısıyla birçok iyi niteliğine rağmen bu ırkın daha geniş bir dağılıma sahip olması kısıtlamaktadır. Anadolu arı çeşitleri başka hiçbir ırkta pek bulunmayan iyi faktörlerin sentezine sahiptir. Çok fazla dış teli tarağı inşa etmekte ve propolisi aşırı derecede kullanmaktadırlar. Ancak propolis toplama kapasiteleri değişen miktarlarda olmasına karşın her ırk için propolisin toplandığı ve bunun bir bal arısı kovanının vazgeçilmez maddesi olduğu bildirilmektedir (Silici ve Kutluca, 2005).

Apis mellifera anatoliaca olarak da bilinen Anadolu bal arısı, Türkiye’nin kuzey ve güneydoğusu dışında, Orta Anadolu bölgesinde yayılım göstermektedir. Eskişehir’den Sivas’a, Çankırı’dan Niğde ve Nevşehir’e kadar uzanan İç Anadolu Bölgesi’nde bulunan

Anadolu arısı, sadece bu bölgede değil, Akdeniz, Ege ve Karadeniz'in büyük bir kısmında görülmektedir (Koca ve Kandemir, 2013). Ayrıca Anadolu arılarının coğrafi dağılımlarındaki değişiklikler nedeniyle ekotipler (Muğla ekotipi ve Orta Anadolu ekotipi) bal verimi, görünüm, fiziksel ve davranış özellikleri açısından farklılık göstermektedir (Sıralı, 2017).

Türkiye'de son 20-30 yıllık arıcılık uygulamaları, kışlık kolonilerin yaz ve sonbaharda, Akdeniz ve Ege bölgelerinden Orta ve Doğu Anadolu'ya taşınmasını içeren göçü de içermektedir (Özkırım, 2018). Bu çalışmanın türler arası gen akışını teşvik ederek Türkiye coğrafyasına yayılabileceği ve Anadolu bal arılarının gen havuzunu homojenleştirebileceği düşünülmektedir (Kandemir vd., 2000). Ticari olarak yürütülen bazı arıcılık uygulamalarının genetik kontaminasyona yol açabileceği düşünülerek, ülkemizdeki arı çeşit ve ekotip çeşitliliğinin korunmasının günümüzde ve gelecekte önemli olduğu vurgulanmıştır (Kence, 2006).

Arılar yerli veya işlenmiş kovan ürünlerini farmakofaji ve farmakofori olarak tanımlanan iki alternatif farmakolojik yolla kullanırlar. Farmakofaj, hastalığı azaltmak veya bal arısı sağlığını artırmak için doğrudan tüketimden (örneğin bal, polen, arı sütü) kaynaklanan tüm savunma mekanizmalarıyla ilgilidir; farmakofori ise yenmeyen kovan ürünlerini (örneğin propolis, reçine) ifade eder (König, 1988). Bununla birlikte, bitkilerin polen taşıyıcılarına ihtiyaç duyduğu gerçeği, onları arıları çeşitli ödüllerle çekmeye yönlendirir. Bal arıları da dahil olmak üzere birçok tozlaşma taşıyıcısı için çiçeklerin sunduğu nektar, bitkilerin sunduğu en önemli ödüldür. Nektar, temel olarak şekerlerden oluşan bir karışımdır. Bitki türlerine bağlı olarak, en yaygın üç nektar şekeri; disakkarit olan sükroz ve iki heksoz olan glikoz ile fruktozdur (Chalcoff vd., 2006).

Arılar, nektardan su buharlaştırırken invertaz ve glikoz oksidaz enzimlerini salgırlar. Arının invertaz enzimi, nektardaki sakkarozu glikoz ve fruktoza çevirir. Bal, glikoz oksidazın da etkisiyle suyun buharlaşması ve hidrojen peroksit oluşumu yoluyla korunur. Arılar için polen en önemli protein kaynağıdır, ancak bal sadece karbonhidrat sağlar (Ilie vd., 2022).

Bal arıları usta kimyager ve kimya mühendisleridir. Hayvanlar alemindeki başarıları büyük ölçüde ürünlerinin kimyasına ve uygulanmasına bağlıdır: bal, balmumu, zehir, propolis, polen ve arı sütü. İnsan sağlığı için önemli diğer besinlerdir. Bu ürünlerden üçü

(bal, zehir ve arı sütü) arılar tarafından sentezlenir. Diğer üçü ise bitkilerden elde edilir ve arıların kendi kullanımları için özelleştirilir (Schmidt, 2000).

2.2. Propolis

Propolis, bal arılarının farklı bitki sızıntılarından topladığı ve boşlukları doldurmak ve kovanın bazı kısımlarını kapatmak için kullandıkları reçineli bir maddedir. Pek çok biyolojik aktiviteye sahiptir: antibakteriyel, antiviral, fungisidal, antitümöral vb. (Marcucci vd., 2001). Polifenoller de dahil olmak üzere 180' den fazla bileşik propolisin bileşenidir. Fenolik bileşiklerin konsantrasyon ve kökenleri değişkenlik gösterebilir. Bu değişkenlikler biyolojik aktiviteleri ve klinik özelliklerini etkileyebilir. Bu sebeple propolis bileşenlerinin analizi önem taşır (Gómez vd., 2006). Propolisin farmakolojik özelliklerindeki görüş, flavonoidlerin geniş biyolojik aktivitelerinin, en azından kısmen, serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruma yetenekleriyle ilişkili olduğu yönündedir (Russo vd., 2002).

2.3. Arı Sütü

Arı sütü sağlıklı gıdalar arasında yer alır. Kraliçe bal arısı larvalarının özel besinidir ve işçi bal arılarının esas olarak yaşamlarının altıncı ve on ikinci günleri arasında hipofaringeal ve mandibular bezlerinden salgılanır (Nagai ve Inoue, 2004). Proteinler, serbest amino asitler, şekerler, yağ asitleri, mineraller ve vitaminler gibi önemli biyolojik aktiviteye sahip birçok bileşiği içerir (Vucevic vd., 2007).

2.4 Arı Zehri

Arı zehri çok çeşitli küçük proteinler ve peptid toksinleri içerir. Toksinlerin bazıları spesifik membran reseptörlerine karşı yüksek afiniteye sahiptir. Renksiz bir sıvıdır. İşçi arıların zehir bezlerinde üretilerek zehir keselerinde depolanır. Hücrelerinden yeni çıkan arıların zehir üretim yetenekleri oldukça azdır. 12 günlük olan arılar en yüksek zehir üretim kapasitelerine ulaşırlar. 20 günlük olan arılar ise zehir üretim yeteneklerini kaybetmiş olur. Bir işçi arının zehir üretimi yaklaşık 0,3 mg dır. Arılar sokma sırasında iğnesini sokulan canlıda bırakır ve ölür (Hider, 1988).



Şekil 2.1. Avrupa bal arısı *Apis mellifera* (A) ve liyofilize arı zehri (B) (Gajski vd., 2024)

2.4.1. Arı zehrinin kimyasal yapısı ve fizikokimyasal özellikleri

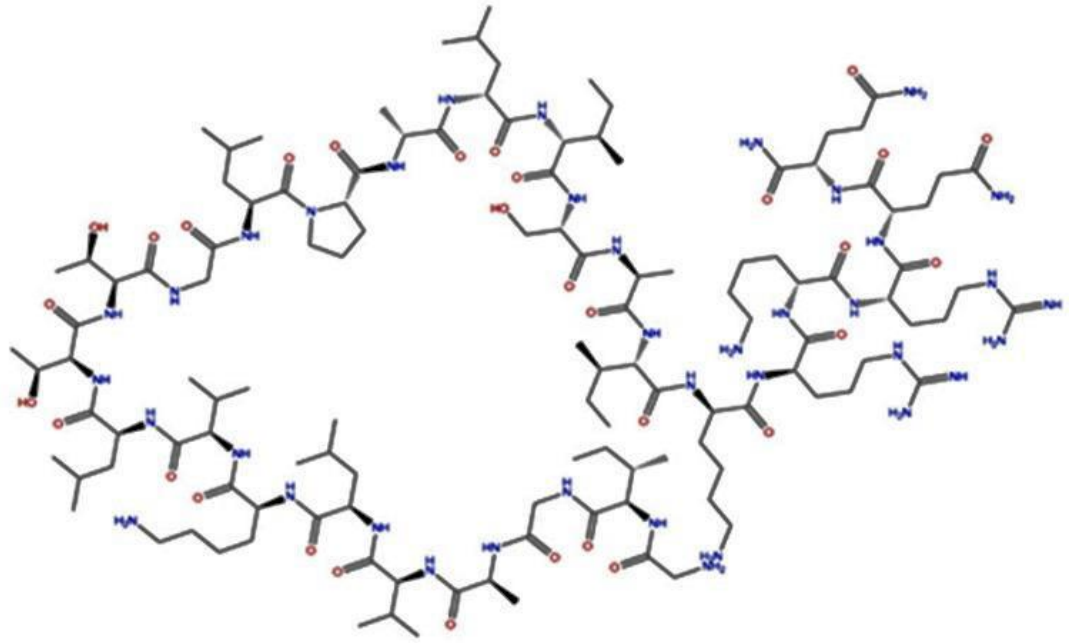
Arı zehri, bir dizi önemli aktif bileşenler içerir. Enzimler, düşük moleküllü bileşikler ve peptidlerin karışımından oluşur. Arı zehrindeki enzimler arasında fosfolipaz A2, fosfolipaz B, hiyaluronidaz, fosfataz ve α -glukosidaz bulunur. Ayrıca arı zehri melittin, apamin, mast hücre degranüle edici peptid, adolapin, tertiapin, secapin, melittin F ve kardiyopep gibi peptidleri de içerir (S.C.Pak, 2017). Arı zehrindeki kuru madde bileşimleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Arı zehrinin kuru madde bileşenleri (Hider, 1988).

Kimyasal Madde	Bileşen	Kuru Ağırlık (%)
Peptidler	Melittin	50 - 60
	Apamin	2 - 3
	Adolapin	1 - 3
	MCD Peptidi	2 - 3
	Peptid K	0.1 - 0.5
Enzimler	Fosfolipaz A2	10 -12
	Hiyaluronidaz	1- 2
	Asit Fosfataz	0,5 - 1
Biyojenik Aminler	Histamin	0,5 - 2
	Dopamin	0,5 - 1
Diğer Bileşikler	Aminoasitler	1 - 2
	Şekerler	1 - 2
	Lipidler	3 - 4

2.4.2. Melittin, fosfolipaz ve apamin

Arı zehrindeki en önemli kimyasal bileşiklerden biri Melittin'dir. Zehir içerisindeki toplam kuru ağırlığının % 40-50'sini oluşturur. Toplam 26 amino asit kalıntısı içeren ve amino terminal bölgesinin ağırlıklı olarak hidrofobik ve karboksil terminal bölgesinin hidrofilik olduğu bir amfifilik peptiddir. En bilinen melittine ait peptid amino asit dizisi Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln'dir (Terwilliger ve Eisenberg, 1982).

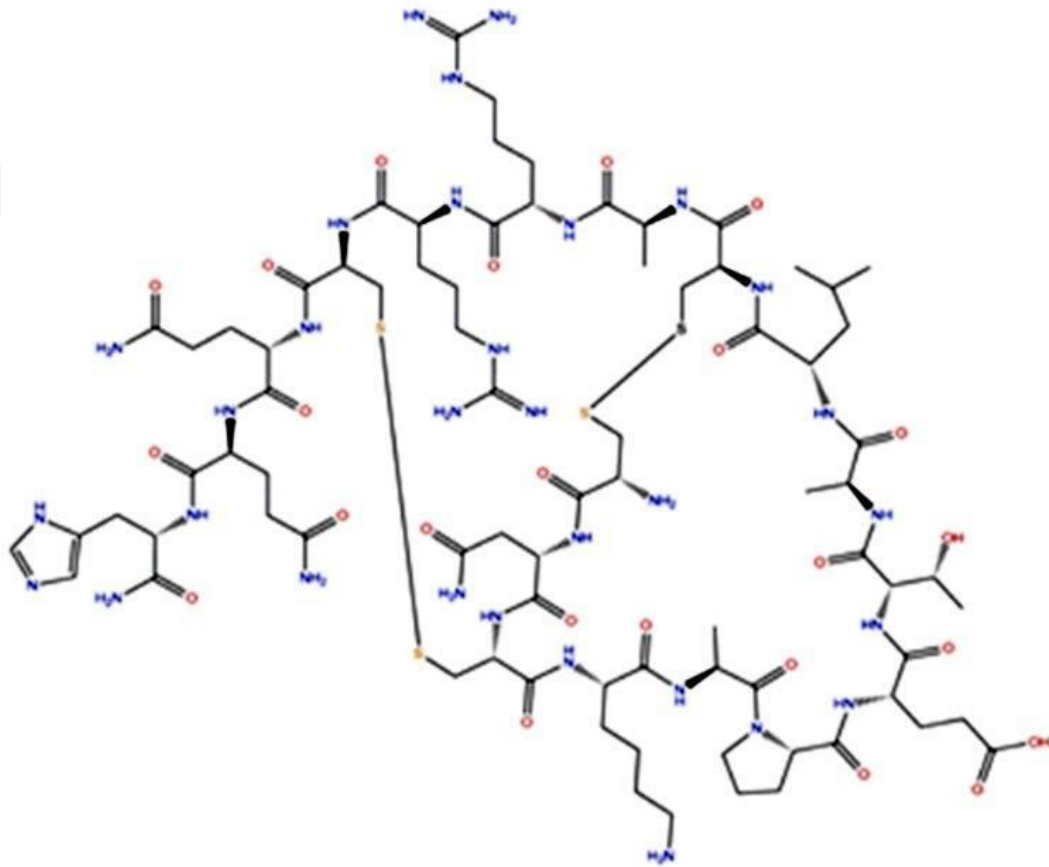


Şekil 2.2. Melittin'in moleküler yapısı (Silva vd., 2015).

Melittin, apitoksinin ana aktif bileşenidir ve hücrelerin parçalanmasından ve öldürülmesinden sorumludur. Melittinin moleküler yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Hücre zarında birkaç melittin peptidi biriktiğinde, fosfolipid paketleme ciddi şekilde bozulur ve böylece hücre lizisine yol açar (Raghuraman ve Chattopadhyay, 2007). Melittin, yalnızca çok çeşitli plazmatik membranların parçalanmasını değil, aynı zamanda mitokondride bulunanlar gibi hücre içi membranların da parçalanmasını tetikler. PLA 2 ve melittin sinerjistik etki göstererek duyarlı hücrelerin zarlarını parçalar ve sitotoksik etkilerini artırır. Bu hücre hasarı, lökositlerden lizozomal enzimler, trombositlerden serotonin ve mast hücrelerinden histamin gibi diğer zararlı bileşiklerin salınmasına yol açabilir ve bunların hepsi ağrıya yol açabilir (Moreno ve Giralt, 2015). Her bir melittin zincirinde bükülmüş bir çubuk oluşturan iki α -heliks segment bulunur. Melittin yapısal olarak zehir bezinde mevcut bir konsantrasyonda bir tetramer olarak bulunan ve hücre lizisi için gerekli olan bir peptiddir. (Terwilliger vd., 1982). Bu yapısal özellikler, sitotoksik özellikler açısından önemli bir rol oynamasına neden olmaktadır.

Bal arıları nörotoksini olarak apamin, iki disülfür köprüsüne sahip 18 amino asitten oluşan oldukça küçük bazik bir peptiddir ve bu da yapıyı 2027,3 Da'lık bir moleküler

ağırlıkla son derece sağlam hale getirir. Apamin amino asit dizisi Cys-Tyr-Cys-Lys-Ala-Pro-Glu-Thr-Ala-Leu-Cys-Ala-Arg-Arg-Cys-Gln-Gln-His'tir. Peptid, memelilerin omuriliğinde nörotoksik etkilere neden olur ve bu da kas spazmlarına yol açar. Dahası, apamin kalsiyum bağımlı potasyum kanalları üzerinde seçici bir inhibitör etkiye sahiptir (Gajski vd., 2024).



Şekil 2.3. Apamin moleküler yapısı (Silva vd., 2015).

Fosfolipazlar, fosfolipitleri yağ asitlerine ve diğer lipofilik maddelere hidrolize eden enzimlerdir. Katalize ettikleri reaksiyon türlerine göre ayırt edilirler ve esas olarak dört ana sınıfa (A, B, C ve D) ayrılırlar. İki tip PLA vardır: PLA1 ve PLA2. PLA2 yapı homologisi, kaynak ve lokalizasyona göre 16 gruba ayrılabilir (Murakami vd. 2015). PLA 2'ler genel olarak, yağ asidi ve lizofosfolipidi serbest bırakmak için membran fosfolipidlerinin sn -2 pozisyonundaki ester bağımlı kesen enzimlerdir. Çoğu organizmada bulunurlar ve fosfolipid

sindirimi, metabolizma, konak savunması, sinyal iletimi, hücre zarlarının bileşiminin modülasyonu ve dokulardaki inflamatuvar yanıt gibi hücrel süreçlerde merkezi bir rol oynarlar (Welker vd., 2011). Öte yandan, kalsiyum iyonu aktiviteleri için gereklidir. Aktif durumda, α -amino grubu, iki muhafaza edilmiş kalıntının yan zincirleri olan His ve Asp'nin katalitik ağı katıldığı aktif bölgeye N-terminal bölgesini bağlayan muhafaza edilmiş bir hidrojen bağlama ağında yer alır (Gomaz vd., 1989).

Arı zehirlerinde son yıllarda keşfedilen bir çok yeni peptid ve proteinlerin detaylı yapı bilgisi henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Zehirde mikromoleküller halinde az miktarda bulunan bu proteinlerden biri de C1q benzeri proteindir (De Graaf vd., 2010). Yüksek organizmalarda kompleman sisteminin aktive olmasını tetikleyen C1q kompleksi, bir C1q bölgesi içerir. Bu organizmalarda, antikor-antijen kompleksleri tarafından aktive edilen C1q, klasik kompleman yolunu tetikler ve bu sayede edinsel ile doğal bağışıklık sistemleri arasında önemli bir köprü kurar. Henüz karakterize edilmesi gereken bir diğer bileşen ise, vasküler endotelial büyüme faktörünü içeren trombosit türevli bir proteindir (Russkamp vd., 2018).

2.5. Arı Zehrinin Kullanım Alanları

Birçok araştırmacı tarafından gerçekleştirilen uluslararası bilimsel raporlar, arı zehrinin birçok hastalıkta tedavi edici olarak kullanılabileceğini bildirmektedir. Bu çalışmalar aşağıda iki başlık altında toplanmış ve alt başlıklar altında açıklanmıştır. Ayrıca literatürlerde belirtilen *in vitro* ve *in vivo* gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 2.2'de sunulmaktadır.

Arı zehrinin sadece hastalıkların tedavisinde değil aynı zamanda radyasyon gibi kalıcı veya geçici biyolojik ve kimyasal etkilere neden olabilecek enerji emisyonlarına karşı da koruyucu etkiye sahip olduğu literatürde belirtilmektedir. *Apis mellifera* L. arı zehri, X-ışınlarından önce 850 rad'de test hayvanlarına enjekte edilerek, öldürücü bir doz olarak kabul edilmiş ve 30 günde % 64 hayatta kalma oranıyla sonuçlanmıştır (Varanda vd., 1998).

Çizelge 2.2. Deney hayvanları ve hücre kültürü deneylerinde arı zehrinin etkileri (Bogdanov, 2015).

Genel Etki	Belirli Etkiler
Merkezi ve periferik sinir sistemi etkiler (CNS,PNS)	Ağrı yatıştırıcı, aspirin benzeri etkiler gösteren bileşiklerin, kronik inflamasyon kaynaklı ağrının yönetiminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, sıçan modellerinde bu bileşiklerin anti-multiple skleroz (MS) etkiler. Bu bileşikler, merkezi sinir sistemi (CNS) üzerinde etkili olabilmek için periferik kemoreseptörleri uyararak CNS'ye akışını etkileyebilir.
Anti İnflamatuvar ve anti artrit	İnflamasyonu ve eklem ağrılarını azaltarak, glukokortikoid ve aspirin benzeri etkiler gösterir.
Kanser karşıtı etkiler	Over, prostat, mesane, melanoma, renal kanser hücrelerinde farklı etki mekanizmaları ile anti-tümoral etki gösterir.
Anti bağımlılık etkileri	Metanfetamin kaynaklı hiperaktiviteyi düzenlemede potansiyel bir rol oynar
Radyasyondan korunma	Lökosit ve eritrositlerin rejenerasyonunu geliştirerek, bağışıklık sistemini güçlendirir ve vücudun yenilenme kapasitesini artırır.
Bağışıklık sistemi üzerinde eylem	İmmünsüpresif ve immunoaktivasyon süreçlerinin dengede tutulmasıyla vücuda hem koruyucu hem de denetleyici bir fonksiyon kazandırır.
Antibiyotik fungusit ve antiviral eylem	Farklı patojenlere karşı güçlü bakterisit etkiler göstererek, enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde kapsamlı bir koruma sağlar.
Safra kesesi bağırsak sistemi	Safra kesesi, bağırsak sistemindeki yağların sindirimine yardımcı olurken, aynı zamanda safra sıvısının düşme akışını düzenler ve kolesterol ile bilirubin konsantrasyonlarının artmasına neden olur.
Metabolik etkileri	Vücutta protein ve nükleotid metabolizmasını artırarak hücresel yenilenme ve enerji üretimini destekler, böylece genel metabolik dengeyi iyileştirir
Endokrinolojik sistem	Tiroid, hipofiz ve hipotalamus hormonlarının salgılanmasını artırarak endokrin sistemi harekete geçirir.
Yara iyileşmesi	Cilt hücrelerinin yenilenme sürecini destekler.

2.6. Apiterapi

Apiterapi, bal, polen, propolis, arı sütü ve arı zehri gibi arı ürünlerini tıbbi amaçlarla kullanan eski bir iyileşim şeklidir. Apiterapi uygulamalarının Amerika Birleşik Devletleri'nde 100 yıllık bir geçmişi vardır. Arı zehri akupunktur iğneleri ile gerekli noktalara enjekte edilerek apiterapi adı altında da kullanılabilir. Arı zehri tedavisi, aslında bir immünoterapidir. Bu tedavi, hipotalamus, hipofiz bezi ve adrenal bezler aracılığıyla bağışıklık sistemini harekete geçirerek iyileşme tepkisi oluşturur. Bağışıklık sistemi, virüsler ve bakteriler gibi yabancı istilacıları tanıma, onlarla savaşma ve kanserleşmiş hücreleri ortadan kaldırma sorumluluğuna sahip kompleks bir mekanizmadır.

İnsan vücudu sürekli değişim ve mutasyonlara maruz kalır. Bağışıklık sisteminin sağlıklı olması, bu değişimleri kontrol altında tutarak vücudun kontrollü bir şekilde işlev görmesini sağlar. Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir biçimde bölünüp büyümesi ve çevre dokulara yayılmasıyla gelişir. Zayıflamış bir bağışıklık sistemi, kanser hücrelerinin hem kan dolaşımına hem de lenf düğümlerine yayılmasına olanak tanır. Arı zehri, kanser hücrelerini yok etme yeteneğine sahip Melittin ve Apamin gibi peptidleri barındırır. Bunun yanı sıra, arı zehri artrit ve multipl skleroz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Soman vd., 2009; Oršolić, 2012).

GETAT (Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp), modern tıbbın yanında alternatif tedavi yöntemlerini kapsayan bir alan olarak, çeşitli bitkisel, fiziksel ve zihinsel terapilerle sağlığı iyileştirmeyi amaçlar. Apiterapi, GETAT'ın önemli bir bileşeni olarak, arı ürünleri (bal, propolis, arı zehri ve arı sütü gibi) kullanarak sağlık sorunlarını tedavi etmeyi amaçlayan bir yaklaşımdır. Ancak, apiterapinin arı ve arı ürünlerine alerjisi veya aşırı hassasiyeti olan bireylerde uygulanmaması gerekir. Ayrıca, bal ve polen gibi ürünler 1 yaş altındaki çocuklara önerilmezken, arı zehri uygulaması 18 yaş altındaki çocuklar için risk taşıyabilir; bunun yanında ciddi organ yetmezliği, karaciğer fonksiyon bozukluğu, ağır enfeksiyonlar veya beta bloker grubu ilaç kullanan bireyler için de sakıncalıdır. Gebelik ve emzirme dönemindeki kadınlar için de arı zehri uygulaması önerilmez. Apiterapi uygulamaları, yalnızca Sağlık Bakanlığı tarafından yetkilendirilmiş Apiterapi Üniteleri veya Uygulama Merkezlerinde, bu alanda sertifikalı hekimler tarafından gerçekleştirilmelidir. Konuyla ilgili en güncel bilgiler, Apiterapi Derneği'nin internet sitesinden edinilebilir.

2.7. Proteolitik Enzimlerin Yapısı Ve Fonksiyonu

Proteazlar, proteinazlar veya proteolitik enzimler olarak da bilinirler, peptid bağlarının kopmasını katalize ederek peptidler ve/veya amino asitler üreten büyük bir hidrolaz grubudur. Proteolitik enzimlerin sınıflandırılması üç ana kritere dayanır: katalize edilen reaksiyon türü, aktif bölgenin fonksiyonel grubu ve çeşitli enzimler arasındaki moleküler yapı ve evrimsel ilişki türü. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesi'ne göre, proteolitik enzimler doğalarına göre proteazlar ve peptidazlar olarak gruplandırılabilir (Landi vd., 2011).

Proteolitik enzimler, proteinlerin peptid bağlarını hidrolize eden enzimlerdir ve genellikle proteazlar veya peptidazlar olarak adlandırılmaktadır. Bu enzimler, toplum sağlığı ve günlük yaşamda uzun bir süre boyunca kullanılmaktadır. 1700'lü yıllarda ilk olarak gübre, peynir yapımı, deri tabaklama işlemleri ve etlerin yumuşatılmasında kullanılan proteolitik enzimlerin tarihi oldukça eskidir. Spallanzani, 1783 yılında mide sıvısının proteinleri parçalama yeteneğini keşfettikten sonra proteazlar üzerinde kapsamlı araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu dönemde mide sıvısından elde edilen pepsin, pankreas tarafından salgılanan tripsin ve bağırsak mukozasından elde edilen erepsin, farklı yöntemlerle elde edilen önemli proteolitik enzimler arasında yer almıştır. Proteazlar, peptid bağlarının su etkisiyle parçalanmasını katalize eden enzimlerdir ve hidrolazlar adı verilen altı ana sınıftan birinin üyesidir. Genellikle peptidaz, proteinaz ve amidaz olarak bilinen bu enzimler, önemli biyokimyasal işlevlere sahiptir (Buchholz vd., 2005).

2.8. Proteolitik Enzimlerin Sınıflandırılması

Proteazlar, yapısal çeşitlilikleri ve geniş etki mekanizmaları nedeniyle, genel enzim sınıflandırmasında farklı enzim gruplarıyla benzer şekilde dahil edilemezler. Bugüne kadar, proteazlar üç ana kriter temel alınarak sınıflandırılmıştır: Katalizledikleri reaksiyon türü, katalitik bölgenin kimyasal yapısı ve yapılarının evrimsel ilişkileri.

Proteazlar, katalitik bölgelerinin özelliklerine dayanarak iki ana grupta sınıflandırılır: ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar. Ayrıca, aktif bölgelerinde bulunan fonksiyonel gruplara göre dört farklı türe ayrılırlar: serin proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar ve

metalloproteazlar. Bununla birlikte, proteolitik enzimler, amino asit dizilimlerine ve evrimsel akrabalıklarına göre farklı familyalara ve gruplara da ayrılabilir (Taşdelen, 2006).

2.9. Zehirler ve Enzimatik Aktiviteleri

Farklı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, hayvan zehirlerinden çeşitli enzim ve toksik bileşenler ortaya konmuştur (Boilard vd., 2010). Zehirlerin içeriğinde, asetilkolinesteraz, fosfolipaz A2, alkalın fosfataz, hiyaluronidaz gibi enzimlerin yanı sıra jelatinolitik ve kazeinolitik aktiviteleri olan proteolitik enzimler de yer almaktadır (Incesu vd., 2005).

Hyaluronidazlar, çeşitli canlı türlerinde bulunan enzimlerdir. Bu enzimler, dermatoloji, jinekoloji, cerrahi, oftalmoloji, onkoloji ve ortapedi gibi birçok tıbbi alanda sıkça kullanılmaktadır. Hyalüronidazlar, toksik etki göstermemelerine rağmen, dokularda bulunan zehirlerin daha hızlı yayılmasını sağlayarak bu zehirlerin emilimini ve difüzyonunu artıran özelliklere sahiptir (Kemparaju ve Girish, 2006).

Bal arısı zehri, insanlarda yaşamı tehdit eden alerjik reaksiyonlara neden olabilen proteinler içerir. Hyalüronidaz ve fosfolipaz A2'nin, arı zehrine alerjisi olan hastaların çoğunda patojenik reaksiyonlara neden olabildikleri için başlıca alerjenler olduğu gösterilmiştir. Markovic ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada hastaların % 71'inin rekombinant Hya'ya ve % 78'inin rekombinant fosfolipaz A2'ye karşı spesifik serum IgE'si olduğu gösterilmiştir. Bu enzimler, tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşan yüksek moleküler ağırlıklı sülfatlanmamış doğrusal bir glikozaminoglikan olan hiyaluronik asidi (HA), D-glukuronik asidi (GlcA) ve N -asetil glukozamini (GlcNAc) hidrolize eder. Ayrıca kondroitin sülfatları ve küçük bir ölçüde dermatan sülfatı hidrolize ettiği bilinmektedir (Marković vd., 2000).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Ham Zehir Eldesi

Tez çalışma süresince kullanılan bal arısı ham örnekleri Ar-Sum Apimak firması (<https://www.arsumapimak.com>) kovan üzeri arı zehri toplama cihazı kullanılarak elektriksel stimülasyon yolu ile elde edilmiştir. Cam plakalar üzerinde toplanan arı zehri bir cam kazıyıcı yardımı ile toplanarak renkli bir şişe içerisinde +4 °C de saklanmıştır.

3.2. Zehir Protein Miktarının Belirlenmesi

Bal arısının ham zehir örnekleri, +4 °C'de saklanan stoklardan alındıktan sonra, distile su ile çözülmüş ve 15 dakika 4 °C'de 14,000 rpm hızında santrifüj edilmiştir (Hettich, Micro 200R). Peptid bileşenlerinin bulunduğu süpernatant alınarak, vakum konsantratöründe (Labconco, Centri Vap Concentrator) kurutulmuş ve sonraki çalışmalar için -20 °C'de saklanmıştır. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ayırma işlemlerinde, cihaza yüklenecek miktarlar hassas bir terazi (SHIMADZU AU X 220) kullanılarak ham zehir stoğundan tartılmıştır. HPLC ile ayrılma sonrası, terazi ile ölçülemeyecek kadar küçük miktarlardaki peptidlerin belirlenmesinde ise ultraviyole absorpsiyon metodu kullanılmıştır. Bu yöntemde, proteinlerin 280 nm dalga boyunda 1 mm'lik yol uzunluğunda 1 absorbans biriminin 1 mg/cm³'e eşit olduğu kabul edilmiştir. Bu doğrultuda spektrofotometrik ölçümler (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) ve HPLC kromatogramında elde edilen pik alanları kullanılarak ihtiyaç duyulan peptid miktarları hesaplanmıştır (Caliskan vd., 2006).

3.3. Ham Zehrin Sıvı Kromatografisinde Saflaştırılması

Peptid eldesi sırasında uygulanan saflaştırma işlemleri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, C18 ters faz analitik kolonu (Welchrom, 4. 6 x 250 mm, 5 µm) tercih edilmiştir. Hareketli fazın akış hızı dakikada 1 ml olarak ayarlanmış ve 60 dakika süresince, 230 ve 280 nm'deki absorbans değerleri izlenerek

bileşiklerin ayrımı sağlanmıştır. Ayrım işlemleri sırasında hareketli faz, doğrusal bir gradyan şeklinde uygulanmıştır. Hareketli fazda iki tampon çözelti kullanılmıştır: Tampon A, % 0. 12 derişimindeki trifloroasetik asidin (TFA) su içerisindeki çözeltisi, Tampon B ise % 0. 10 derişimindeki trifloroasetik asidin asetonitril içindeki çözeltisi olarak hazırlanmıştır. HPLC ile yapılan ayırım sonucunda elde edilen bileşikler, kolonda gözlemlenen alıkonma sürelerine dayanarak ayrı tüplerde toplanmış ve liyofilizatör yardımıyla kurutulmuştur. Örnekler, etiketlenerek -20 °C'de eppendorf tüplerinde saklanmıştır, böylece ihtiyaç duyuldukça kullanılmak üzere korunmuştur (Caliskan vd., 2012).

3.4. Ham Zehir Örneklerinin Elektforetik Profilinin Belirlenmesi

Proteinlerin tek boyutlu jel elektroforezi, karmaşık protein ve peptid karışımlarının saflığını incelemek ve moleköl ağırlıklarını ile alt ünitelerini belirlemek amacıyla kullanılan etkili bir analiz yöntemidir. Elektforetik teknikler, genellikle geleneksel kolon kromatografisi veya HPLC yöntemleri sonrasında, ham protein karışımlarından belirli bir proteinin ayrılması için tercih edilir. Bu çalışmalarda, ham zehir ve HPLC ile ayrıştırılan peptid fraksiyonlarının saflık ve moleköl ağırlığı analizi, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat PoliAkrilamid) jel elektroforez yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Peptidlerin moleköl ağırlıkları göz önünde bulundurularak iki farklı yöntem uygulanmıştır.

3.4.1. Poliakrilamid jel elektroforezi

SDS-PAGE yöntemi, ilk kez Laemmli tarafından önerilen bir sistem olup (LAEMMLI, 1970), günümüzde protein ve peptid karışımlarının ayrılması için en temel araçlardan biridir. Bu yöntem, poliakrilamid jelin iki ayrı bölüm olarak hazırlanmasını gerektirir: bir ayırma jeli ve bir yükleme jeli. Ayırma jeli, % 12 akrilamid/bisakrilamid karışımı, 0,375 M Tris (pH: 8. 8), % 0,1 APS, % 0,1 SDS ve % 0,04 TEMED kullanılarak oluşturulur ve cam plakalar arasında polimerizasyon işlemi gerçekleştirilir. Yükleme jeli ise % 5 akrilamid/bisakrilamid karışımı, 0,127 M Tris (pH: 6. 8), % 0,1 SDS, % 0,1 APS ve % 0,1 TEMED ile hazırlanır ve ayırma jelinin üzerine dökülerek polimerize edilir.

Örnekler, yüklenmeden önce 0,25 M glisin, 0,025 M Tris ve % 2 SDS içeren 1X yürütme tamponunda bekletilir. Ardından, 100 mM Tris, % 4 SDS, % 0,04 bromofenol mavisi, % 20 gliserol ve 200 mM DTT içeren 2X örnek yükleme tamponu (pH: 6. 8) ile karıştırılarak 3 dakika boyunca kaynar su içinde inkübe edilir. Ayrıca, protein marker (Broad Range, 2-212 kDa, NEB P7702) de üreticinin önerilerine uygun bir şekilde jel üzerine yüklenir. Örnekler, yükleme jelinden ayırma jeline geçene dek 80 V'da çalıştırılır; ayırma jeline geçen örnekler ise oda sıcaklığında 120 V ile işlemi sürdürülür.

Moleküler ağırlığı 20 kDa'nın altında olan proteinler ve peptidlerin ayrılması, geleneksel Laemmli sistemi olarak bilinen tris-glisin sistemi ile yeterince etkili bir şekilde gerçekleştirilememektedir. Bu boyutlardaki protein ve peptidler, SDS ile ayrıldıklarında jel üzerinde aynı hızda hareket ederler ve bu durum çözeltilerin çözünürlüğünü önemli ölçüde azaltır. Bu sorunu aşmak ve peptidlerin SDS ile ayrımını sağlamak amacıyla Tris-Trisin elektroforez sistemi kullanılmakta, modifiye edilmiş tampon çözeltiler tercih edilmektedir. Trisin-SDS-PAGE, özellikle 20 kDa'nın altında bulunan proteinlerin yüksek çözünürlükle ayrılması için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir ve 1-100 kDa arasındaki proteinler için idealdir.

Tez çalışması sürecinde, düşük moleküler ağırlıklı peptidlerin içerdiği fraksiyonların elektroforetik analizi için klasik Laemmli Tris-glisin sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda çözünürlüğü artırmak amacıyla alternatif bir tris-glisin sistemi uygulanmıştır (Schägger, 2006). Ayırım jeli, % 10 akrilamid/bisakrilamid karışımı, % 0,1 SDS, 1 M Tris (pH: 8,45), % 0,05 APS ve % 0,05 TEMED kullanılarak hazırlanmış ve cam levhalar arasında polimerizasyona tabi tutulmuştur. İzleme jeli ise %4 akrilamid/bisakrilamid karışımı, %0,1 SDS, 1 M Tris (pH: 8,45), % 0,075 APS ve % 0,075 TEMED ile oluşturulmuştur.

Örnekler, % 3 SDS, % 1,25 beta-merkaptotanol, % 7,5 gliserol, % 0,0125 Coomassie Blue G-250 ve 150 mM Tris-HCl (pH: 7,0) içeren örnek yükleme tamponuna eklenmiş ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemlerin ardından, 0,1 M Tris-HCl (pH: 8,9) içeren anot tamponu ve 0,1 M Tris, 0,1 M Tris-HCl, % 0,1 SDS (pH: 8,25) içeren katot tamponu, dikey jel ünitesinin ilgili bölümlerine yerleştirilmiştir. Sonrasında, katot tamponunda bulunan jele örnekler yüklenmiş ve yükleme jelinden ayırım jeline geçene kadar 50 V gücünde, ayırım jeline geçtikten sonra ise 200 V ile, oda sıcaklığında çalıştırılmıştır.

3.4.2 Elektroforez sonrası jelin görüntülenmesi

Elektroforez işleminin ardından, protein ve peptid bantlarının görüntülenmesi amacıyla Coomassie Brilliant Blue R-250 ile jelin boyama süreci gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, elektroforez sonrası cam plakalar arasından çıkarılan jel, belirli çözeltilerle sırasıyla inkübe edilmiştir. İlk olarak, jel % 25 isopropanol, % 10 asetik asit ve % 0.05 Coomassie Brilliant Blue içeren Çözelti A'da 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından, % 25 isopropanol, % 10 asetik asit ve % 0.02 Coomassie Brilliant Blue içeren Çözelti B'ye, ve son olarak da % 10 isopropanol, % 10 asetik asit ve % 0.002 Coomassie Brilliant Blue içeren Çözelti C'ye 15'er dakika süre ile, oda ısısında orbital çalkalayıcıda bekletilmiştir. Boyama işleminin ardından, jel % 5 metadan ve % 7.5 buzlu asetik asit içeren Destain Tamponu'na alınarak, arka planın temizlenmesine kadar oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Tüm bu işlemler tamamlandığında, jel % 7 buzlu asetik asit içeren 2X Clear Tamponu'na alınıp görüntüleme işlemine kadar saklanmıştır (Incesu vd., 2005).

3.5. SDS-PAGE'de Zimogram Yöntemi ile Proteolitik Aktivite Belirlenmesi

Ham zehir örnekleri, proteolitik aktivite analizleri için SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat PoliAkrilamid) jel elektroforezi yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Peptidlerin molekül ağırlıkları dikkate alınarak, analiz dört farklı başlık altında gerçekleştirilmiştir: kazeinolitik, jelatinolitik, hyaluronidaz ve fosfolipaz.

3.5.1. Proteolitik aktivitenin SDS-PAGE-kazein ve jelatin ile belirlenmesi

Çalışmalarda iki farklı substrat olarak jelatin ve kazein kullanılmıştır. Ayırma jeli, % 12 monomer çözeltisi (akrilamid/bis) ve % 0,1 oranında kazein veya jelatin içeren, % 10 SDS ile hazırlanmış 1,5 M Tris-HCl tamponuyla (pH 8.8) oluşturulmuştur. Yükleme jeli ise % 5 monomer çözeltisi (akrilamid/bis) ve 0,5 M Tris HCl tamponu (pH 6.8) kullanılarak hazırlanmıştır. Kazeinolitik ve jelatinolitik aktivite tespiti sırasında, ham zehir örneğinden 100 µg, 4'er dakikalık fraksiyonlar halinde 50 µg'lık miktar kuyucuklara yüklenmiştir.

Örneklerin aktivitelerini korumak amacıyla herhangi bir indirgeyici ajan (DTT, 2-merkaptoetanol vb.) veya ısıdan kaçınılmıştır.

Örnekler, elektroforez işlemi sırasında +4 °C'de 80 V akımda 1 saat boyunca bantlar yükleme jelini aşmıca kadar yürütülmüş, ardından akım 120 V'ye çıkarılarak 1 saat daha devam ettirilmiştir. Yürütme tamamlandıktan sonra, jel SDS'in uzaklaştırılması için % 2,5 Triton X-100 içeren bir çözelti içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Deiyonize su ile yıkanan jel, pH 7,4 olan Tris HCl tamponunda 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Son olarak, Coomassie Blue R-250 ile boyanmış ve renksiz bantların belirginleşmesi için jel, yıkama tamponu içinde bekletilmiştir.

3.5.2. SDS-PAGE'de zimogram yöntemi ile hyaluronidaz aktivite belirlenmesi

Ham zehir ve HPLC'den elde edilen bileşenlerin hyaluronidaz aktivitesinin belirlenmesi, Barbaro (2005) yöntemine dayalı olarak modifiye edilmiştir. Ayrıştırma jeli, % 12 monomer çözeltisi (akrilamid/bis) ile 170 µg/ml hyaluronik asit substratı eklenerek hazırlanmıştır. Elektroforez, +4 °C'de 20 mA/jel akımı altında gerçekleştirilmiş ve ardından jel, 30 dakika boyunca % 2,5'lik Triton X-100 içeren bir çözelti ile yıkanarak SDS'in uzaklaştırılması sağlanmıştır. Jel, 37°C'de 16 saat boyunca 20 mM Tris ve 0,5 mM kalsiyum klorür (pH: 7,4) çözeltisinde inkübe edilmiştir. Boyama sürecinde, gereksiz proteinlerin jelden uzaklaştırılması için, jel 0,2 mg/ml Streptomyces Griseus proteaz içeren bir çözelti ile 37°C'de 2,5 saat çalkalanarak yıkanmış ve ardından % 25 metanol ve % 10 asetik asit içeren bir çözelti ile 20 dakikaya kadar yıkanmıştır. Renksiz bantların ortaya çıkması, hyaluronidaz aktivitesinin bir belirteci olarak değerlendirilmiştir.

3.5.3 SDS-PAGE'de zimogram yöntemi ile fosfolipaz aktivite belirlenmesi

Bal arısı zehrinde bulunan PLA2, Grup III sPLA2 enzimlerine ait olup, aynı anda birden fazla reseptör için ligand görevi görebilir. Bu enzim, gliserofosfolipitlerin sn-2 ester bağını hidroliz ederek yağ asitleri ve lizofosfolipitleri serbest bırakır. Fosfolipaz aktivite testleri, Haberman (1972) yönteminin modifikasyonu ile zimogram yöntemi kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. % 0,8 oranında 30 ml agaroz, 0,05 M sodyum asetat tamponu (pH: 7. 5) içinde çözülmüştür. Mikrodalgada, agar tanecikleri tamamen eriyene kadar kaynatılmıştır. Elde edilen çözelti 26 ml alınıp 50 °C’de soğutulmuştur. Üzerine 0,25 ml yumurta sarısı süspansiyonu ve 0,25 ml 0,01 M CaCl çözeltisi eklenip karıştırıldıktan sonra, cam petri kabına aktarılmıştır. Petri kabındaki jel katmanı katılaştıktan sonra, bir jel delme aparatı ile 5 mm çapında delikler açılmıştır. % 0,1 sığır serum albumini içeren serum fizyolojik içinde ham zehir örnekleri çözülmüştür ve her delik içerisine örneklerden 20 µl yüklenmiştir. Cam petri kabının dış kısımları parafin ile sarılarak 37 °C’de 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Jel üzerindeki deliklerde oluşan ve çevresinde gözlemlenen berraklaşma, fosfolipaz etkili peptidlerin varlığını göstermektedir (Habermann, 1972).



4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ham Zehir Eldesi Bulguları ve Tartışması

Tez çalışma süresince kullanılan bal arısı ham zehir örnekleri Ar-Sum Apimak firması (<https://www.arsumapimak.com>) Kovan üzeri arı zehri toplama cihazı kullanılarak elektriksel stimülasyon yolu ile elde edilmiştir. Cam plakalar üzerinde toplanan arı zehri bir cam kazıyıcı yardımı ile toplanarak renkli bir şişe içerisinde +4 °C de saklanmıştır. Protein miktar tayini nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) kullanılarak üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ham örneklerinin protein ölçüm sonuçları

Örnek Lokaliteleri	1.Ölçüm (mg/ml)	2.Ölçüm (mg/ml)	3.Ölçüm (mg/ml)
1-Ankara	2,385	2,395	2,443
2-İzmir	3,143	3,237	3,274
3-Mersin	2,141	2,139	2,156

Çizelge 4.1 incelendiğinde her üç lokalitede ham zehir örneklerinin protein seviyeleri benzerdir. Üç ayrı ölçüm alınarak değerlerin ortalaması kullanılmıştır. Her 500 µl için 1 mg zehir örneği olacak şekilde ependorflara paylaştırılmıştır. 1 mg zehir örneği HPLC analizi için, 1 mg zehir örneği ise enzimatik aktivite testleri için ayrılmıştır. Enzimatik aktivite testleri için ayrılan kısım kendi arasında her 50 µl’ de 100 µg zehir olacak şekilde alikotlanarak -20 dereceye kaldırılmıştır.

Elektrostimülasyon yöntemiyle arıların zehir sağımı, literatürde ilk kez rapor edildiğinden bu yana en güvenli zehir elde etme yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bu teknik, arıların canlı kalmasını, iğnelerini kaybetmemesini ve normal aktivitelerine devam edebilmesini sağladığı için büyük bir avantaj sunmaktadır (Markovic vd., 1954; Graaf vd., 2014).

Arıların sokma, sokmaya çalışma veya kovanların uyarılması nedeniyle belirli bir miktarda zehir kaybettikleri bilinmektedir. Bu nedenle, kaybedilen zehrin yeniden sağlanması gerekmektedir. Owen (1978) tarafından yapılan bir çalışmada, arı zehri

yenilenmesi üzerine yapılan ilk örnekler literatürde yer almaktadır. Çalışmada, farklı yaşlardaki işçi arıların elektrostimülasyon yoluyla tek tek salınması gerçekleşmiş ve sağımdan sonra çeşitli sürelerde zehir bezlerindeki histamin miktarları değerlendirilmiştir. Bulgular, arıların yenileme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Deney koşulları altında, zehrin en yüksek oranda tekrar sentezlenmesi için iki güne ihtiyaç duyulduğu, ancak 15 günlük işçilerde ve 40 günlük işçilerde bu sürecin hiç gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, zehrin yenilenmesinin kontrol gruplarındaki seviyeye asla ulaşmadığı, yani tamamen gerçekleşmediği de belirtilmiştir. Bununla birlikte, arıların yenilenme süreçlerinin, kafeslerde su, polen ve bal ile beslenerek bakıldıkları deneysel koşullarda elde edildiği vurgulanmıştır. Doğal ortamda, bu kaynakların az olması veya arıların çeşitli nedenlerle stres altında bulunması nedeniyle, miktar, kalite ve hız açısından farklı sonuçların elde edileceği ifade edilmiştir. Daha kapsamlı bir çalışmada, 7, 14, 21, 28, 35 ve 40 günlük işçi arılar, elektrik şokunun ardından 0, 24, 48 ve 96 saatlik sürelerle örneklenmiştir (Abreu vd., 2000).

Yukarıda belirtilen diğer çalışmaların sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, bu dönemlerin gelişen yavru popülasyonundan yeni işçi arılar eklendiğinde zehir verimindeki değişiklikleri önlemek için optimal olduğu tespit edilmiştir.

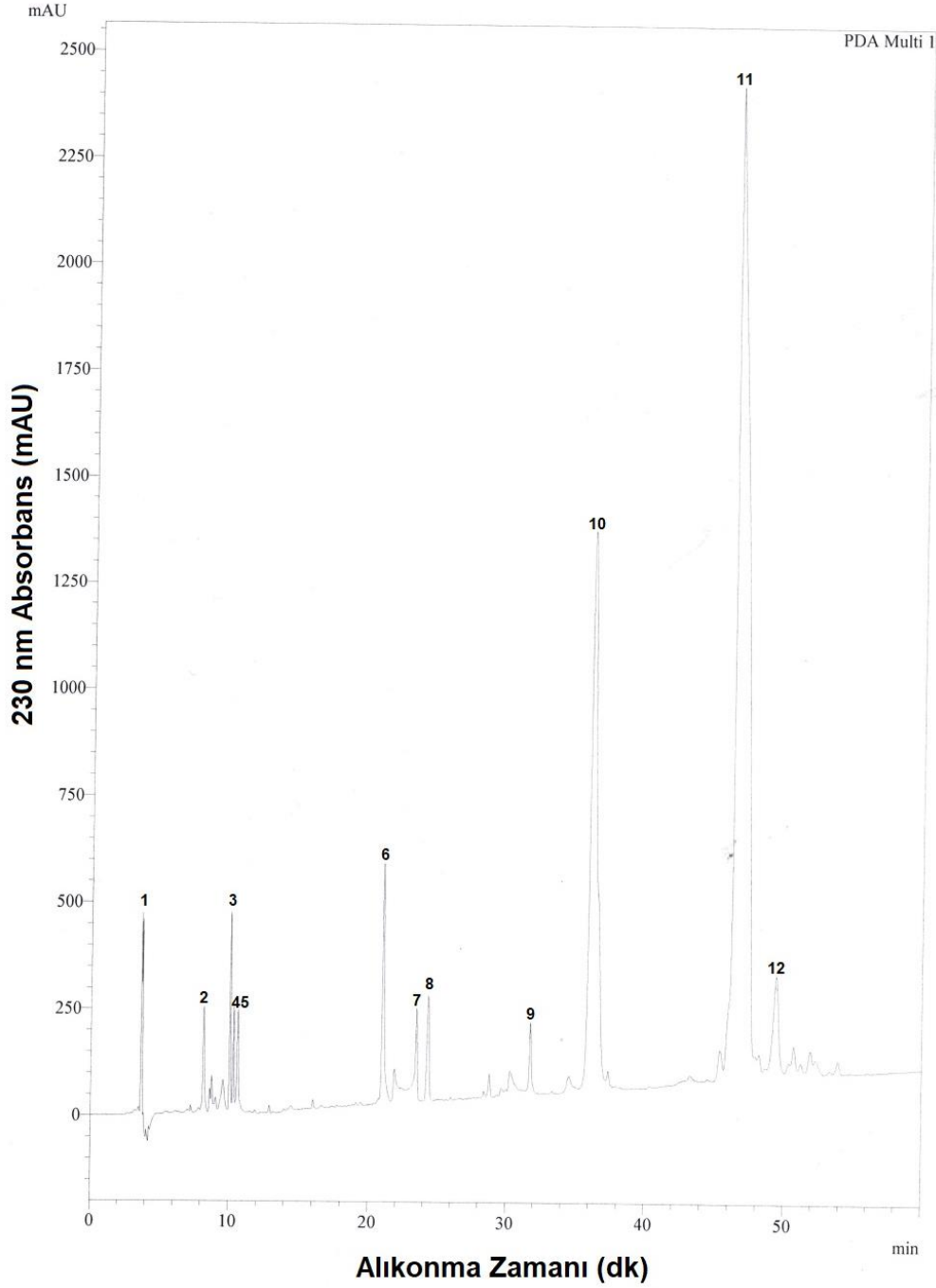
4.2. Ham Zehirlerin Sıvı Kromatografisi Profil Sonuçları ve Tartışması

Bu çalışma kapsamında elde edilen ham zehirlerin yöntemi, ilgili bölümde (Bkz.3.3) detaylıca anlatılmıştır. Ham zehirler ters faz HPLC (RP-HPLC) yöntemi kullanılarak bileşenlerine ayrılmıştır. Üç farklı lokalite de aynı saflaştırma methodu kullanılmıştır. Birbirleri arasında kromatografik olarak alıkonma zamanlarında gözlenen küçük bazı farklılıklar gözlenmiştir. Kromatogramda farklı alıkonma zamanlarına (RT) sahip olan her bir pik, bir fraksiyonu temsil etmektedir. Ayrıca, her fraksiyonun 230 nm'de kaydedilen absorbans değeri ile yoğunluğu arasında doğru orantı bulunmaktadır.

Kromatografik ayırım işlemi sırasında, kolona en az 1 mg ham zehir eklendiğinde, 230 nm'deki absorbans değeri 200 mAU'nun üzerinde olan fraksiyonlar majör fraksiyon olarak, 230 nm'nin altında kalan fraksiyonlar ise minör fraksiyon olarak değerlendirilmiştir.

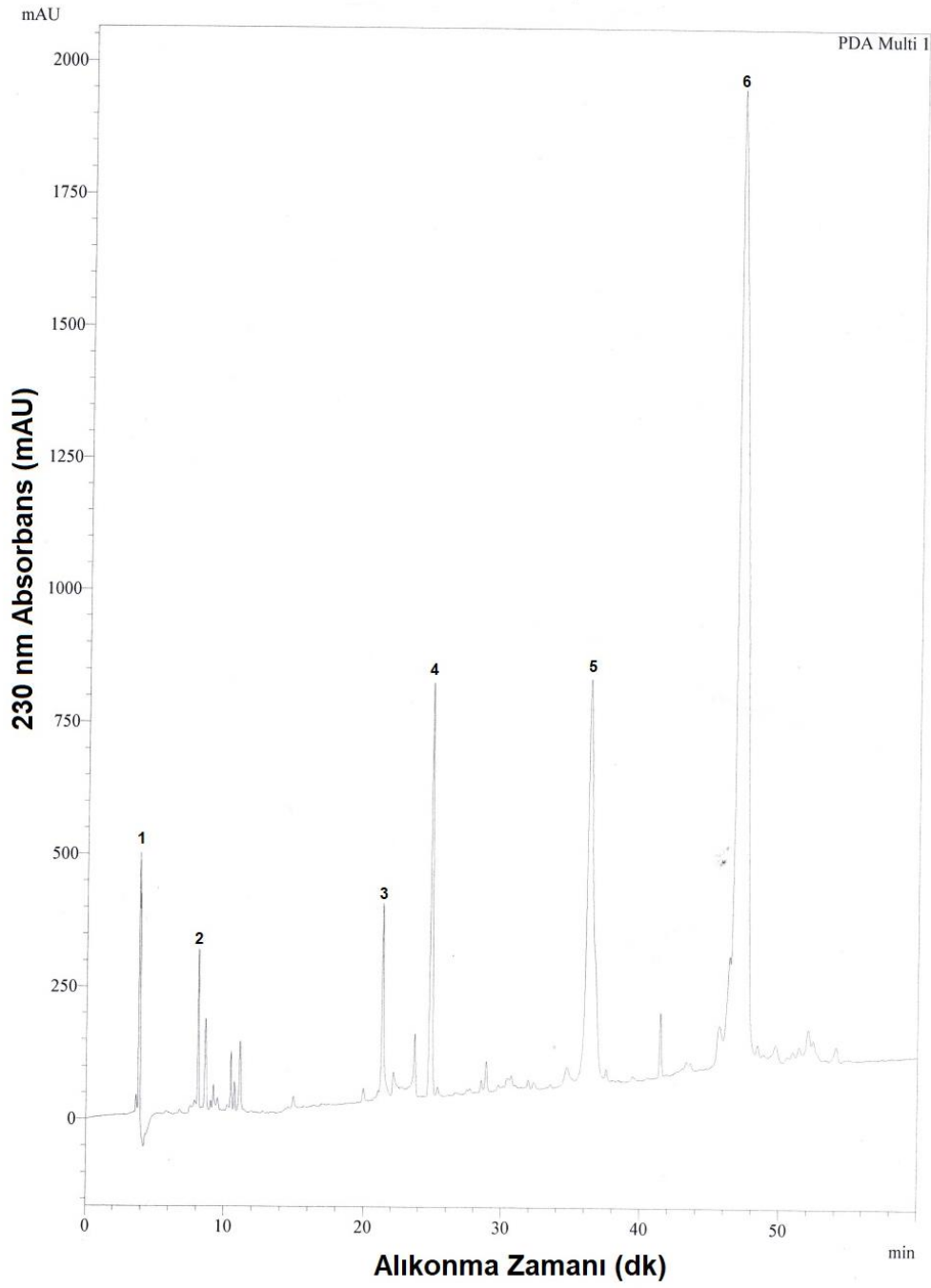
Çalışmada yer alan üç farklı lokasyondan elde edilen ham zehir örneklerinde; Ankara'dan 12, Mersin'den 9 ve İzmir'den ise 6 adet majör fraksiyon belirlenmiştir. Bu majör fraksiyonlar, *Apis mellifera* L. türünü temsil edecek şekilde 'Ana' olarak adlandırılmasına

karar verilmiştir. Bunun yanı sıra, tüm kromatogramlar incelendiğinde, birbirinden farklı en az 17 fraksiyonun tespit edildiği görülmüştür.



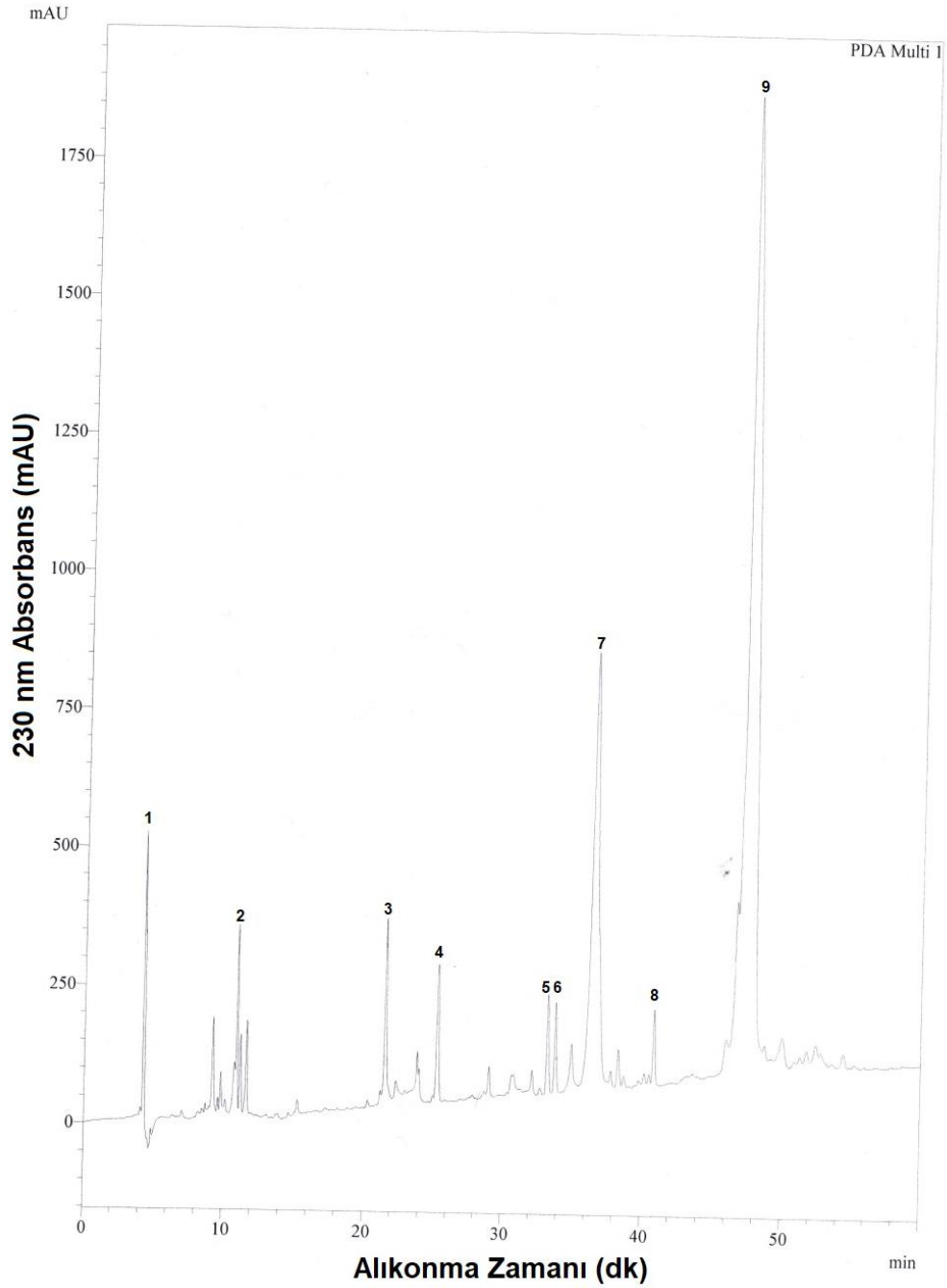
Şekil 4.1. Ankara lokalitesinin ham zehrinin 0-60 % B metodu ile ayrıştırılmış RP-HPLC kromatogramı.

'Ana' olarak belirtilen majör fraksiyonlar kromatogram üzerinde 1'den 12' e kadar numaralandırılarak gösterilmiştir.



Şekil 4.2 İzmir lokalitesinin ham zehrinin 0-60 % B metodu ile ayrıştırılmış RP-HPLC kromotogramı.

‘Ana’ olarak belirtilen majör fraksiyonlar kromotogram üzerinde 1’den 6’ ya kadar numaralandırılarak gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Mersin lokalitesinin ham zehrinin 0-60 % B metodu ile ayrıştırılmış RP-HPLC kromatogramı.

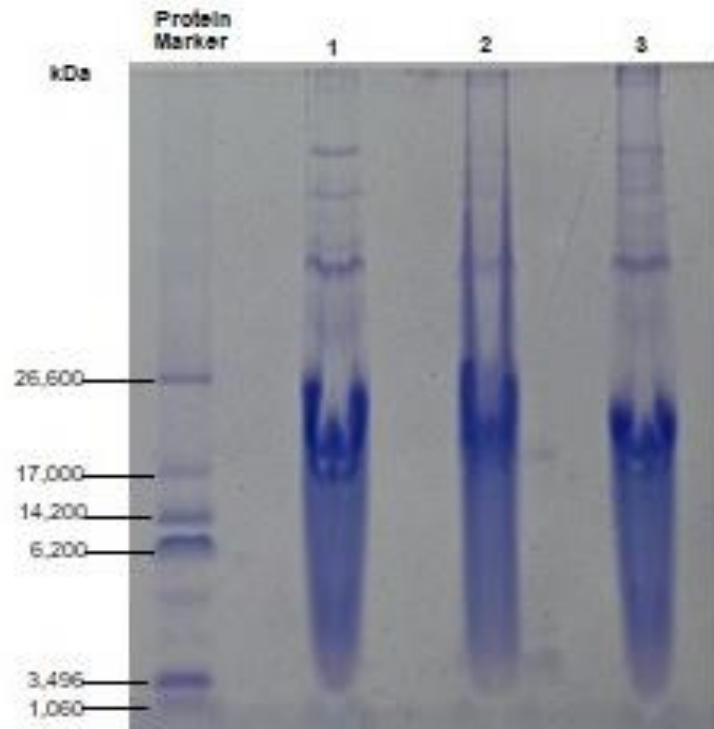
‘Ana’ olarak belirtilen majör fraksiyonlar kromatogram üzerinde 1’den 9’ a kadar numaralandırılarak gösterilmiştir.

HPLC ayrımı sırasında, majör fraksiyonların 230 nm'deki absorbansının 10 mAU'yu aşmasıyla birlikte, fraksiyonlar eppendorf tüplerine toplanmaya başlanmıştır. Maksimum absorbansın elde edildiği süre belirlendikten sonra, absorbans değeri 10 mAU'nun altına

düştüğünde fraksiyonların toplanması durdurulmuş ve HPLC kolonundan geri alınmıştır. Bu süreç sayesinde, her fraksiyon peptid karışımından ayrılmıştır. Toplanan fraksiyonların çözücüsü, vakum konsantratörü (Labconco Centri Vap Concentrator) kullanılarak uzaklaştırılmış ve kurutulmuştur. Fraksiyonlardaki protein miktarı, kolona yüklenen peptid karışımının miktarı dikkate alınarak, HPLC kromatogramındaki % pik alanı üzerinden hesaplanmıştır.

Apis mellifera ham zehrinin RP-HPLC ile bileşenlerine ayrıldığına dair literatür incelemesi yapıldığında, arı ırkı, hareketli faz gradienti, kolonların özellikleri, kolona yüklenen miktar, ayırım süresi ve akış hızı gibi değişkenlerin farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Ancak, % 0,1 TFA içeren su ve % 0,1 TFA asetonitril çözeltileri ile C18 (Welchrom, 4.6x 250mm) kolon kullanılarak yapılan ayrımlarda, alıkonma sürelerine bağlı olarak apamin, fosfolipaz A2 ve melittine karşılık gelen üç belirgin pik gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen kromatogramda, kromatogram profiline dayanarak bu üç pik ile ilgili fraksiyonların sırasıyla Ana1, Ana7 ve Ana9 olarak tanımlanabileceği düşünülmekte ve bu sonuçların literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu çalışmada uygulanan yöntemle, 0-60 % B doğrusal gradient altında, 1 ml/dk akış hızı ve C18 kolon kullanılarak elde edilen *Apis mellifera* ham RP-HPLC kromatogram profilleri, özellikle 15. dakikadan itibaren piklerin alıkonma süreleri ve rölatif absorbanları açısından belirgin bir benzerlik sergilemektedir (Şekil 4. 1, 4. 2, 4. 3) (Mahmoodzadeh vd., 2015; Zarrinnahad vd., 2018).

4.3. *Apis mellifera* L. Ham Zehirlerinin Elektroforetik Profil Sonuçları Ve Tartışması



Şekil 4.4. *Apis mellifera* L. Ham Zehirlerinin Tris-Trisin SDS-PAGE Profili

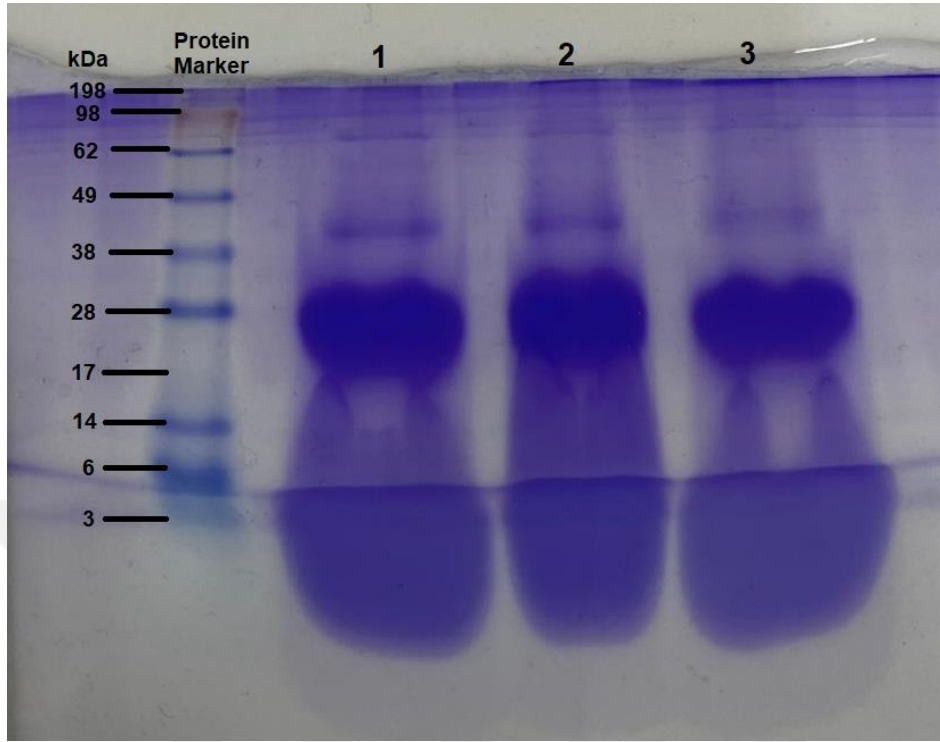
Apis mellifera L. ham zehirlerinin elektroforetik profili, Tris-Trisin SDS-PAGE yöntemi kullanılarak incelenmiştir. SDS-PAGE ile ayrıştırılan ham profil incelendiğinde, 26 kDa üzerindeki bölgedeki en az beş bant, 26-17 kDa arasında ise en az iki bant gözlemlenmiştir. 17 kDa'nın altındaki bileşenler ise belirgin bantlar oluşturmak yerine, bir smear görüntüsü oluşturmuştur (Şekil 4. 4). *A. m. carnica* ve *A. m. lamarcki* zehirlerinin SDS-PAGE profilleri incelendiğinde ise, 66. 4 kDa'dan büyük proteinlerin her iki türde de ortak olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Bu proteinlerin, muhtemelen tüm *Apis mellifera* ırklarında bulunan asit fosfataz ve asit fosfomonoesteraz enzimlerine ait olduğu düşünülmektedir (Zalat, 2002). *A.m. ligustica* ham zehri üzerine yapılan bir diğer proteomik çalışmada, tespit edilen toksinlerinin dipeptidilpeptidaz ve karboksilesteraz gibi enzimlerin 158 – 66,4 kDa aralığında yer aldığı belirlenmiştir (Li vd., 2013). 66,4 – 27 kDa aralığında gözlemlenen iki bantın, içerdiği karbonhidrat gruplarına bağlı olarak molekül ağırlığınının 35 – 53 kDa arasında değişen hyaluronidaz ve asit fosfataz enzimlerine ait olabileceği öne sürülmektedir (Zalat, 2002; Li vd., 2013; Moreno ve Giralt, 2015; Zolfagharian vd., 2015; Teoh vd., 2017).

27-6,5 kDa aralığında gözlemlenen yoğun bantların, literatürde molekül ağırlığı 14-20 kDa olarak tanımlanan fosfolipaz A2 enzimiyle, 8-10 kDa aralığındaki proteaz inhibitörü ve icarapin peptidi veya onun prekürsörüne ait olabileceği öne sürülmektedir. Şekil 4. 5 incelendiğinde, ham zehrin büyük bir kısmının 6,5 kDa'dan daha küçük protein bileşenleri tarafından oluşturulduğu görülmektedir. Bu aralıkta, melittin (2,8 kDa), apamin (5,5 kDa) ve mast hücresi degranüle edici peptidin (6 kDa) yüksek oranlarda bulunduğu düşünülmektedir.

Proteomik analiz tekniklerindeki gelişmeler sayesinde, gerçekleştirilen bir araştırmada bal arısı ham zehrinde 102 farklı protein ve peptid bileşeninin varlığı tespit edilmiştir (Van Vaerenbergh vd., 2014). SDS-PAGE analizinin çözünürlüğü, kütle spektroskopisi ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Bu nedenle, elektroforetik profilde ham zehirde yalnızca belirli bir yüzde üzerindeki peptid ve proteinlerin analizi mümkün olmaktadır (Carpena vd., 2020).

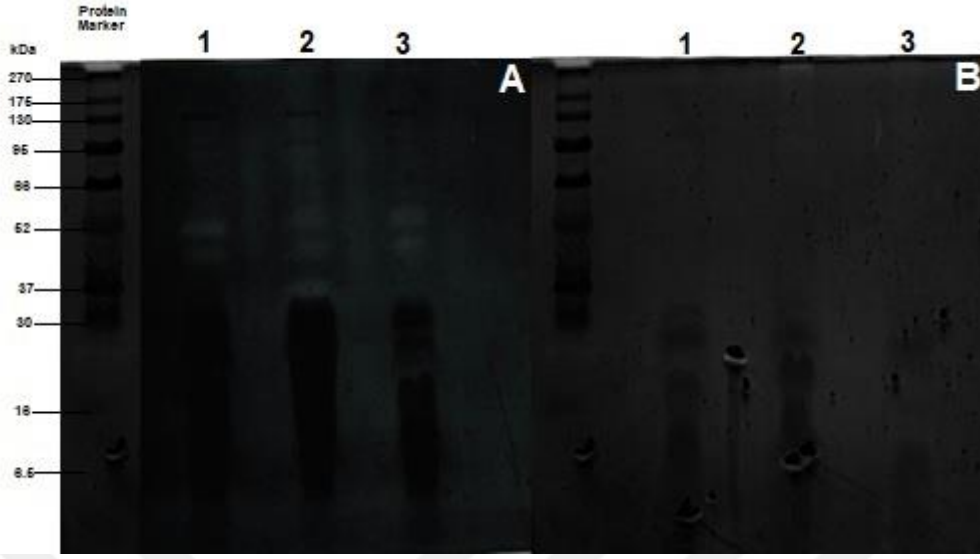
Sonuç olarak, bal arısı zehrinin önemli toksik etkilerinin küçük moleküler ağırlıklı peptidlerden kaynaklandığı göz önüne alındığında, bu peptidlerin içindeki miktarının bir kalite göstergesi olduğu düşünülmektedir. Elde edilen verilerin ise literatürdeki *Apis mellifera* ham zehri protein jel elektroforez analizleriyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Gajski vd., 2013; Danneels vd., 2015; Sobral vd., 2016; Abrantes vd., 2017).

Apis mellifera L. ham zehirlerin elektroforetik profilini kontrol etmek ve molekül ağırlıklarını yaklaşık olarak belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizleri yapılmıştır. İlk olarak, klasik Tris-Glisin SDS-PAGE yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4.5). Ancak bu yöntemle ham ayrıştırıldıktan sonra yapılan incelemelerde 3-38 kDa bölgesindeki bantlanmanın yoğun olduğu gözlenerek özellikle 3-17 kDa bölgesindeki peptidlerin smear bir görüntü oluşturarak bant oluşumları gözlenememiştir. Bu durum, fraksiyonları oluşturan proteinlerin oldukça küçük bir moleküler ağırlığa sahip olduğu sonucunu çıkarmamıza olanak tanımıştır. Öte yandan, ham analiz için jel üzerine 100 µg madde yüklenebilirken, fraksiyonlar üzerinde çalışıldığında bu miktarın (5 µg) oldukça düşük olması nedeniyle, jel ve boyama yönteminin çözünürlüğünün görünür bantların elde edilmesi için yetersiz olabileceği düşünülmektedir. Küçük moleküler ağırlıklı proteinler ve peptidleri içeren ham zehirlerin elektroforetik analizi için, daha düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin analizi amacıyla Tris-Trisin SDS-PAGE yönteminin tercih edilmesine karar verilmiştir.



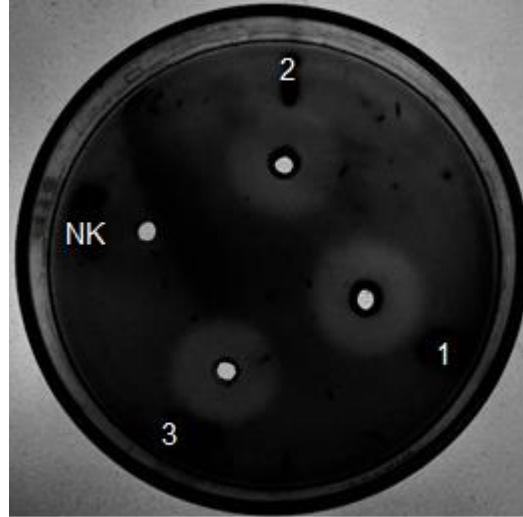
Şekil 4.5. *Apis mellifera L.* ham zehirlerinin Tris-Glisin SDS-PAGE profili

Tris-Trisin SDS-PAGE kullanılarak pH:7.4 Tris-HCL'de 37°C 16 saat inkübasyon sonucunda kazeinolitik aktivite araştırılmış (Şekil 4.6) , Ankara, İzmir, Mersin lokaliteleri olarak 3 örneğinde de 37-62 kDa arasında, Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyama sonrasında mavi bir arka plan üzerinde beyaz bantlar veya noktalar olarak görünmüştür. Farklı olarak 30-37 kDa arasında sadece izmir örneğinde aktivite gözlenmiştir. Ankara(1), İzmir(2), Mersin(3) örnekleri için 37-62 kDa bölgesinde gözlenen enzimatik aktivitenin ana olarak isimlendirilen majör fraksiyonlara ait olduğu düşünülmektedir. Jelatinolitik aktivite için ise yine pH:7.4 Tris-HCL içerisinde 37°C 16 saat inkübasyon sonucunda beyaz bantlanma gözlenemeyip yalnız İzmir ham örneklerinde 95-130 kDa arasında hafif miktarda ayırmakta güçlük çekilen bir bant olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak jelatinolitik jel subsrata spesifik olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.6. A:*Apis mellifera L.* ham örneklerinin kazeinolitik aktivitesi, B: *Apis mellifera L.* ham örneklerinin jelatinolitik aktivitesi

4.4. Ham Zehirlerin Fosfolipaz Aktivitesi Sonuçları Ve Tartışması



Şekil 4.7. *Apis mellifera* ham zehirlerinin fosfolipaz A2 aktivitesi
NK: Negatif kontrol, 1:Ankara, 2: İzmir, 3: Mersin olarak kodlanmıştır.

Şekil 4.7. incelendiğinde 1,2,3 olarak kodlanan sırası ile Ankara, İzmir, Mersin ham zehirlerine ait örneklerin 20 saat inkübasyon sonucu gösterilmiştir. 20 saat boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edilen örnekler, inkübasyon sonucunda 1 cm çapında zon oluşturarak PLA2 aktivitesini göstermiştir.

Ankara, İzmir ve Mersin ham zehirlerinin tümünde çap genişliği aynı ölçülmüştür. Ayrıca negatif kontrol olarak sığır serum albumin eklenerek inkübasyon sonucunda herhangi bir zon oluşumu gözlenmemiştir. Lesitin, yumurtanın sarısında bulunan fosfolipitler arasında yer alır. Bal arısı zehirlerindeki melittin, yumurta fosfatidil kolinin sonikasyonuna tabi tutulmamış lipozomlarının arı zehri fosfolipaz A2 katalizli hidrolizi için güçlü bir aktivatördür. Yunes ve arkadaşları yapmış olduğu bir çalışmada yumurta lesitini lipozomlarıyla elde edilen sonuçların aksine, melittin sulu çözeltilerinin PLA2 aktivitesine duyarlılığı üzerinde çok az bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Yunes vd., 1977).

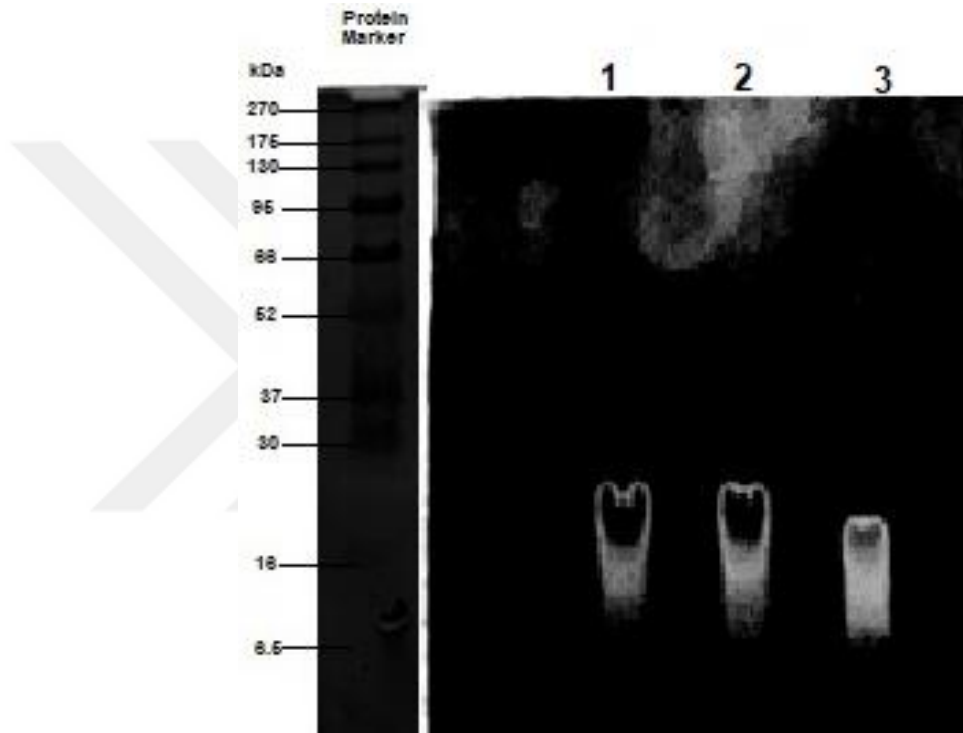
Arı zehrindeki PLA 2, grup III sPLA 2 enzimlerine aittir ve aynı anda belirli reseptörler için bir ligand görevi görebilir. PLA 2 , gliserofosfolipitlerin sn-2 ester bağının hidrolizini katalize ederek serbest yağ asitlerini ve lizofosfolipitleri serbest bırakır (Boillard vd., 2010). Katalize ettikleri reaksiyon türlerine göre ayırt edilirler ve esas olarak dört ana sınıfa (A, B, C ve D) ayrılırlar. İki tip PLA vardır: PLA1 ve PLA2 (Hossen vd., 2017).

Fosfolipazlar (PLA2s), çeşitli memeli dokularında, eklembacaklılarda ve yılan, akrep ve arı zehirlerinde bulunan büyük bir protein ailesidir. Fosfolipaz A2 düşük moleküler ağırlığa, büyük immünojenik potansiyele ve yüksek katalitik aktiviteye sahiptir. Bu enzim antibakteriyel ve antikoagülan etkiler gösterir ve kimyasal medyatörlerin, hücre çoğalmasının, kas kasılmasının ve anti-inflamatuar süreçlerin oluşumunda aktif rol oynar (Leandro vd., 2015). Dahası, PLA 2 konak savunmasında, farklılaşmada ve membran yeniden şekillenmesinde merkezi bir rol oynar (Murakami vd., 2014).

Fosfolipaz A2, çıkış sırasında zehir sisteminde düşük seviyelerde bulunur. Fosfolipaz A2 aktivitesi, çıkıştan sonraki 10 gün boyunca zehirde düzenli olarak artar. Maksimum fosfolipaz A2 seviyeleri (yaklaşık 40 µg fosfolipaz A2 / zehir kesesi) yazın bir işçi arının hayatının geri kalanında korunur. *Apis mellifera* L. Arı zehirlerinin fosfolipaz A2 aktivitesi çeşitli yöntemler ile ölçülmektedir. Genel olarak en çok kullanılan yöntemler kimyasal (titrimetrik) ve radyoalergosobent yöntemleri kullanılır. Owen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada iki tekniğin de aynı sonuç verdiği gözlenmiştir (Owen vd., 1990).

4.5. Ham Zehirlerinin Hyalüronidaz Aktivitesi Sonuçları Ve Tartışması

Hyalüronidaz çalışmaları bölüm 3.7.2.' de belirtilen yöntem ile 100 µg ham örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aktivitesi gözlenen jel görüntüsünde (Şekil 4.8.) 6,5-16 kDa bölgesinde boyama sonrası beyaz bantlar ile aktivitesi gösterilmiştir. Lokaliteler numaralar ile kodlandığından 1(Ankara), 2 (İzmir), 3 (Mersin) olmak üzere üç lokalitede de aktivite gözlenmiştir.



Şekil 4.8. *Apis mellifera* L. ham zehirlerinin hyalüronidaz aktivitesi

Bal arısı zehri hyalüronidazı (Api m2), glikozil hidrolazlar (EC 3.2.1.35) ailesine aittir. Hialüronidaz (HYASE), interstisyel dokunun doğal bir yapıştırıcısı olan ve böylece hücrelerin yapışkan özelliklerini kompakt bir yapıda tutmayı mümkün kılan hialüronik asidin (HA) hidrolizini yapabilen bir enzimdir. HA'nın sindirimi, doku ve damar duvarlarının geçirgenliğinin artmasına neden olur ve bu da diğer alerjenlerin ve zehrin toksik bileşenlerinin serbestçe yayılmasına yol açar (Vetter vd., 1999).

Literatürler, HYASE aktivitesini belirlemek için kullanılan türbidimetrik ve viskozimetrik yöntemlerin, yayılma faktörü olarak uygulandığında enzimlerin farmakolojik

aktivitesiyle iyi bir korelasyona sahip olduğunu göstermektedir (Humphrey ve Jaques, 1953). Bal arısı zehri hyaluronidazının ana rollerinden biridir. Hem türbidimetrik hem de viskozimetrik analizler farmakope yöntemleridir.

Diğer zehir bileşenlerinin dokular arasında yayılmasını kolaylaştıran faktörler hyaluronidazlar olarak adlandırılmaktadır. Bu özellik, zehirli hayvanların avlarını yakalayıp felç etmeleri için son derece etkili ve hızlı bir silah sunar (Bordon vd., 2015; Biner vd., 2015). *P. regalis* zehrinin elektroforetik profilinde hyaluronidaz aktiviteli peptidin yaklaşık 42 kDa molekül ağırlığında bulunduğu bildirilmiştir. Bu değer 37 ile 50 kDa arasında değişmektedir. Genel olarak, hyaluronidazların moleküler ağırlığı 33-47 kDa'dır (Rash ve Hodgson, 2002; Bordon vd., 2015). *Hemiscorpius lepturus* türüne ait akrep zehirleri üzerinde gerçekleştirilen araştırmalarda, 40 kDa molekül ağırlığına sahip hyaluronidaz aktiviteli peptidler tespit edilmiştir. Ancak, yapılan çalışmaların sonuçları akrep zehirlerinde bulunan bu aktörlerin kDa cinsinden belirlenmesine odaklanmıştır. Ayrıca, arı ve akrep ham zehirleri arasındaki farklılıklar da dikkate alınmıştır. Bu çalışmanın bulgularına göre, hyaluronidaz aktivitesine sahip olduğu belirlenen peptidin SDS-PAGE analizleri sonucunda moleküler ağırlığı yaklaşık 6,5-16 kDa olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Arı zehri, arıların sokma aygıtı tarafından üretilen bir salgıdır. Biyolojik amacı, arıları düşmanlarından korumaktır. Anti-inflamatuar, anti-bakteriyel, antimutajenik, radyoprotektif, anti-nosiseptif bağışıklık arttırıcı, hepatosit koruyucu ve antikanser özellikleri nedeniyle çeşitli hastalıkları tedavi etmek için halk hekimliğinde uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Geleneksel olarak, etkilenen bölgedeki akupunktur noktalarını sokmak için canlı arılar kullanılır. BV, arıların polen kaynaklarına iyi erişebildiği ve güçlü zehir üretebildiği ilkbahar sonu ile sonbahar başında doğrudan canlı bir arı tarafından üretildiğinde en etkilidir; kışın salgılanan zehrin daha az güçlü olduğu bildirilmektedir (Hossen vd., 2017).

Hymenoptera zehirlerinin toksik aktivitesi yalnızca büyük sokma olaylarında tıbbi önem taşırken, alerjenik özellikleri insan sağlığı için daha önemli bir endişe kaynağıdır. İnsanlarda, arı zehrine erken maruz kalma IgG1, IgG2 ve daha az ölçüde IgG4 antikor tepkilerini harekete geçirirken, arıcılarda sıklıkla bulunan uzun süreli maruz kalma IgG4 tipi bir humoral tepkiye karşı bağışıklığı harekete geçirir.

Proteazlar veya proteolitik enzimler, daha geniş ve önemli enzim gruplarından biridir. Proteazlar, hidrolazlar sınıfının bir alt sınıfıdır ve proteinlerden ve peptidlerden peptid bağlarını hidrolize edebilirler. Polipeptid zincirine ayrılacak peptid bağı pozisyonuna göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar veya proteinazlar olarak ayrılan büyük bir aileyi oluştururlar. Serin proteazlar iki ayrı aileyi içerir: memeli serin proteazları (kimotripsin, tripsin ve elastaz) gibi olanlar ve bakteriyel subtilisin proteazı gibi olanlar. Aktif bir bölgeye ve ortak bir enzim mekanizmasına sahip olmalarına rağmen, amino asit dizisi ve üç boyutlu yapı bakımından farklılık gösterirler. Hymenoptera zehrinde bu enzimler, alerjen olarak önemli etkileri nedeniyle giderek daha fazla incelenmekte ve karakterize edilmektedir (De Graaf vd., 2021).

Bu çalışma kapsamında, ülkemizin doğal zenginliklerinden biri olan *Apis mellifera* bileşenleri elektroforetik ve kromatografik yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Ham RP-HPLC analizine göre Ankara 12, İzmir 6, Mersin 9 majör fraksiyona ayrılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda, bal arısı ham zehrinde bulunan bileşenlerin apamin, Fosfolipaz A2, hyaluronidaz ve MCD-peptid gibi potansiyel terapötik etkileri olan moleküllerle ilişkilendirilebileceği değerlendirilmiştir. Ham örneklerinin elektroforetik analizi, pH 7.4 ve Tris-HCL tamponunda 37°C'de 16 saat inkübasyon sonucunda kazeinolitik aktivitenin incelenmesini sağlamıştır (Şekil 4.6). Ankara, İzmir ve Mersin örneklerinde, Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyama sonrası 37-62 kDa aralığında beyaz bantlar veya noktalar, mavi bir arka plan üzerinde gözlemlenmiştir. Ancak, sadece İzmir örneğinde 30-37 kDa aralığında aktivite tespit edilmiştir. Bu bölgede gözlenen enzimatik aktivite, her üç lokalite örneği için de ana majör fraksiyonlara ait olduğu düşünülmektedir. Jelatinolitik aktivite için ise aynı inkübasyon koşulları altında, sadece İzmir örneklerinde 95-130 kDa aralığında, net bir şekilde ayrılmayan bant gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, jelatinolitik aktivite jel substratına özgü olarak değerlendirilmiştir.

Fosfolipaz A2 (PLA2) aktivitesi, 1, 2 ve 3 numaralı kodlarla sırasıyla Ankara, İzmir ve Mersin ham zehirlerine ait örneklerin 37°C sıcaklıkta 20 saat süreyle inkübe edilmesiyle incelenmiştir. Inkübasyon sonucunda her üç örnek de 1 cm çapında bir zon oluşturarak PLA2 aktivitesini göstermiştir. 100 µg ham örneği kullanılarak gerçekleştirilen hyaluronidaz aktivite çalışmasında, aktivite gözlenen jel görüntüsü (Şekil 4.8.) incelendiğinde, 6,5-16 kDa bölgesinde beyaz bantlar ile aktivite tespit edilmiştir. Lokaliteler numaralarla kodlanmış olup, 1 (Ankara), 2 (İzmir) ve 3 (Mersin) olarak belirlenen üç farklı lokasyonda da hyaluronidaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen bulgular ile ham zehirlerin enzimatik aktiviteleri gösterilmiştir.

Bal arısı zehri ve bileşenlerinin, hem tek başına terapötik ajanlar olarak hem de modern tıp tedavi yöntemleriyle birlikte sinerjik bir etki sağlamak amacıyla kullanılabilceği çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, bal arısı zehrinin sahip olduğu enzimatik özellikleri ortaya koymaktadır. Bulgular, hayvansal toksinlerden elde edilen doğal bileşenlerin yeni nesil terapötik ajanların geliştirilmesinde önemli bir kaynak olabileceğini desteklemektedir. Bu bağlamda, bal arısı zehri bileşenlerinin ilaç geliştirme süreçlerinde potansiyel adaylar olarak değerlendirilmesi beklenmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- A. Ö. Koca, İ. K. (2013). Comparison of two morphometric methods for discriminating honey bee (*Apis mellifera* L.) populations in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 37(2), 205–210. <https://doi.org/10.3906/zoo-1104-10>
- Abdel-Monsef, M. M., Darwish, D. A., Zidan, H. A., Hamed, A. A., & Ibrahim, M. A. (2023). Characterization, antimicrobial and antitumor activity of superoxide dismutase extracted from Egyptian honeybee (*Apis mellifera lamarckii*). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00470-4>
- Abrantes, A. F., Da Rocha, T. C., De Lima, A. B. S., & Cavalcanti, M. T. (2017). Veneno de abelha: Influência da coleta em qualidade e citotoxicidade. *Ciencia Rural*, 47(10), 8–11. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160486>
- Abreu, R., Moraes, R. and Malaspina, O. (2000). Histological aspects and protein content of *Apis mellifera* L. Worker glands: The effect of electrical shocks in summer and winter. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 87–98.
- Biner, O., Trachsel, C., Moser, A., Kopp, L., Langenegger, N., Kämpfer, U., ... Kuhn-Nentwig, L. (2015). Isolation, N-glycosylations and Function of a Hyaluronidase-Like Enzyme from the Spider *Cupiennius salei*. *PLOS ONE*, 10(12), e0143963. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143963>
- Bogdanov, S. (2015). Bee venom: composition, health, medicine: a review. *Peptides*, 1, 1–20.
- Boilard, E., Lai, Y., Larabee, K., Balestrieri, B., Ghomashchi, F., Fujioka, D., ... Lee, D. M. (2010). A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A₂ in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Molecular Medicine*, 2(5), 172–187. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000072>
- Bordon, K. C. F., Wiezel, G. A., Amorim, F. G., & Arantes, E. C. (2015). Arthropod Hyaluronidases: Biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0042-7>

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Bucholz, K., Kasche, V. (2005). *Biocatalysts and Enzyme Technology Carbohydrate Polymers*.
- Caliskan, F, Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Batista, C. V. F., Zamudio, F. Z., Coronas, F. I., & Possani, L. D. (2012). Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: General characterization of the and description of Bu1, a potent mammalian Na⁺-channel α -toxin. *Toxicon*, 59(3), 408–415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.12.013>
- Caliskan, F, García, B. I., Coronas, F. I. V, Batista, C. V. F., Zamudio, F. Z., & Possani, L. D. (2006). Characterization of components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: Peptides and genes. *Toxicon*, 48(1), 12–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.04.003>
- Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez, A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu12113360>
- Chalcoff, V. R., Aizen, M. A., & Galetto, L. (2006). Nectar concentration and composition of 26 species from the temperate forest of South America. *Annals of Botany*, 97(3), 413–421. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj043>
- Danneels, E. L., Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B., & De Graaf, D. C. (2015). Honeybee Proteome Profile of Queens and Winter Bees as Determined by a Mass Spectrometric Approach. *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins7114468>
- De Graaf, D. C., Brunain, M., Scharlaken, B., Peiren, N., Devreese, B., Ebo, D. G., ... Jacobs, F. J. (2010). Two novel proteins expressed by the glands of *Apis mellifera* and *Nasonia vitripennis* share an ancient C1q-like domain. *Insect Molecular Biology*, 19(SUPPL. 1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00913.x>
- De Graaf, Dirk C., Brochetto Braga, M. R., de Abreu, R. M. M., Blank, S., Bridts, C. H., De Clerck, L. S., ... Van Vaerenbergh, M. (2021). Standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 60(4), 1–31.

KAYNAKLAR DİZİNİ

<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1801073>

- El-Seedi, H., El-Wahed, A. A., Yosri, N., Musharraf, S. G., Chen, L., Moustafa, M., ... Khalifa, S. (2020). Antimicrobial properties of *apis mellifera*'s bee venom. *Toxins*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/toxins12070451>
- Gajski, G., & Garaj-Vrhovac, V. (2013). Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *36*(2), 697–705. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.009>
- Gajski, G., Leonova, E., & Sjakste, N. (2024). Bee Venom: Composition and Anticancer Properties. *Toxins*, *16*(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/toxins16030117>
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*(4), 1220–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>
- Habermann, E. (1972). Bee and Wasp Venoms. *Science*, *177*(4046), 314–322. <https://doi.org/10.1126/science.177.4046.314>
- Hider, R. C. (1988). Honeybee venom: A rich source of pharmacologically active peptides. *Endeavour*, *12*(2), 60–65. [https://doi.org/10.1016/0160-9327\(88\)90082-8](https://doi.org/10.1016/0160-9327(88)90082-8)
- Hossen, M. S., Shapla, U. M., Gan, S. H., & Khalil, M. I. (2017). Impact of Bee Enzymes on Diseases and Immune Responses. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules22010025>
- Humphrey, J. H., & Jaques, R. (1953). Hyaluronidase: correlation between biological assay and other methods of assay. *Biochemical Journal*, *53*(1), 59–62. <https://doi.org/10.1042/bj0530059>
- Ilie, C. I., Oprea, E., Geana, E. I., Spoiala, A., Buleandra, M., Pircalabioru, G. G., ... Ditu, L. M. (2022). Bee Pollen Extracts: Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Effect on the Growth of Selected Probiotic and Pathogenic Bacteria. *Antioxidants*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/antiox11050959>

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Incesu, Z., Caliskan, F., & Zeytinoglu, H. (2005). CYTOTOXIC and GELATINOLYTIC ACTIVITIES of *Mesobuthus Gibbosus* (Brullé , 1832) ., 36.
- Kandemir, I., Kence, M., & Kence, A. (2000). Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. *Apidologie*, 31(3), 343–356. Retrieved from <https://doi.org/10.1051/apido:2000126>
- Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2006). Snake hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochemistry and Function*, 24(1), 7–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbf.1261>
- Kence, A. (2006). Genetic diversity of honey bees in Turkey and the importance of its conservation. *Bee J*, 6, 25–32.
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- König, B. (1988). The Honeybee as Pharmacophorus Insect. *Entomologia Generalis*, 14(2), 145–148. <https://doi.org/10.1127/entom.gen/14/1988/145>
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Landi, L., Renella, G., Giagnoni, L., & Nannipieri, P. (2011). Activities of Proteolytic Enzymes. In *Methods of Soil Enzymology* (pp. 247–260). <https://doi.org/https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c11>
- Leandro, L. F., Mendes, C. A., Casemiro, L. A., Vinholis, A. H. C., Cunha, W. R., De Almeida, R., & Martins, C. H. G. (2015). Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) against oral pathogens. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 87(1), 147–155. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520130511>

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Li, R., Zhang, L., Fang, Y., Han, B., Lu, X., Zhou, T., ... Li, J. (2013). Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (*Apis mellifera*) collected from electrical stimulation and manual extraction of the gland. *BMC Genomics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-766>
- Mahmoodzadeh, A., Zarrinnahad, H., Bagheri, K. P., Moradia, A., & Shahbazzadeh, D. (2015). First report on the isolation of melittin from Iranian honey bee and evaluation of its toxicity on gastric cancer AGS cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, *78*(10). Retrieved from https://journals.lww.com/jcma/fulltext/2015/10000/first_report_on_the_isolation_of_melittin_from.3.aspx
- Marcucci, M. C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., ... Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, *74*(2), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00326-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00326-3)
- Marković-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P. J., Müller, U., & Schirmer, T. (2000). Crystal Structure of Hyaluronidase, a Major Allergen of Bee Venom. *Structure*, *8*(10), 1025–1035. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00511-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00511-6)
- Markovic, O. and Mollnar, L. (1954). *Isolation of and determination of bee venom*.
- Moreno, M., & Giralt, E. (2015). Three Valuable Peptides from Bee and Wasp Venoms for Therapeutic and Biotechnological Use: Melittin, Apamin and Mastoparan. *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins7041126>
- Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Yamamoto, K., & Lambeau, G. (2014). Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: The 3rd edition. *Biochimie*, *107*, 105–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.003>
- Nagai, T., & Inoue, R. (2004). Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*, *84*(2), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00198-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00198-5)

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Oršolić, N. (2012). Bee in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1–2), 173–194. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9339-3>
- Owen, M. D., Pfaff, L. A., Reisman, R. E., & Wypych, J. (1990). Phospholipase A2 in extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicon*, 28(7), 813–820. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(09\)80004-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101(09)80004-4)
- Özkırım, A. (2018). Beekeeping in Turkey: Bridging Asia and Europe BT - Asian Beekeeping in the 21st Century. In P. Chantawannakul, G. Williams, & P. Neumann (Eds.) (pp. 41–69). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8222-1_2
- Raghuraman, H., & Chattopadhyay, A. (2007). Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. *Bioscience Reports*, 27(4–5), 189–223. <https://doi.org/10.1007/s10540-006-9030-z>
- Rash, L. D., & Hodgson, W. C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, 40(3), 225–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00199-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00199-4)
- Russkamp, D., Van Vaerenbergh, M., Etzold, S., Eberlein, B., Darsow, U., Schiener, M., ... Blank, S. (2018). Characterization of the honeybee proteins C1q-like protein and PVF1 and their allergenic potential. *Toxicon*, 150(April), 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.017>
- Russo, A., Longo, R., & Vanella, A. (2002). Antioxidant activity of propolis: Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73(SUPPL. 1), 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00187-9)
- S.C.Pak. (2017). *No Title. Chemical Composition of Bee Venom, in Bee Products - Chemical and Biological Properties, " Cham: Springer International Publishing.*
- Samy Zalut, M. A. E.-A. (2002). Protein pattern of the honeybee venoms of Egypt. *Egyptian Journal of Biology*, 4, 142–146.
- Schmidt, J. O. (2000). Chemical Composition and Application, 15–26.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Sciani, J. M., Marques-Porto, R., Lourenço, A., De Oliveira Orsic, R., Ferreira Junior, R. S., Barraviera, B., & Pimenta, D. C. (2010). Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. *Peptides*, *31*(8), 1473–1479. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.05.001>
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, *99*(1), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>
- Silva, J., Monge-Fuentes, V., Gomes, F., Lopes, K., dos Anjos, L., Campos, G., ... Mortari, M. (2015). Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins*, *7*(8), 3179–3209. <https://doi.org/10.3390/toxins7083179>
- Sıralı, R. (2017). Anadolu Arısı (*Apis mellifera anatoliaca*)’nın Bazı Önemli Özellikleri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, *17*(2), 82–92.
- Sobral, F., Sampaio, A., Falcão, S., Queiroz, M. J. R. P., Calhelha, R. C., Vilas-Boas, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, *94*, 172–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.008>
- Soman, N. R., Baldwin, S. L., Hu, G., Marsh, J. N., Lanza, G. M., Heuser, J. E., ... Schlesinger, P. H. (2009). Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(9), 2830–2842. <https://doi.org/10.1172/JCI38842>
- Taşdelen, Ç. (2006). *Proteaz Enziminin Fiziksel Adsorpsiyon, Kovalent ve İyonik Bağlanma Metotları ile İmmobilizasyonu*.
- Teoh, A. C. L., Ryu, K. H., & Lee, E. G. (2017). One-step purification of melittin derived from *Apis mellifera* bee venom. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(1), 84–91. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08042>
- Terwilliger, T. C., & Eisenberg, D. (1982). The structure of melittin. I. Structure

KAYNAKLAR DİZİNİ

- determination and partial refinement. *Journal of Biological Chemistry*, 257(11), 6010–6015.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)65097-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)65097-9)
- Terwilliger, T. C., Weissman, L., & Eisenberg, D. (1982). The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophysical Journal*, 37(1), 353–361. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(82\)84683-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(82)84683-3)
- Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B. and de G. (2014). Exploring the hidden honeybee (*apis mellifera*) proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with ftms. *Journal of Proteomics*, 169–178.
- VARANDA, E. A., & TAVARES, D. C. (1998). RADIOPROTECTION: MECHANISMS AND RADIOPROTECTIVE AGENTS INCLUDING HONEYBEE VENOM. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. scielo .
- Vetter, R. S., Visscher, P. K., & Camazine, S. (1999). Mass envenomations by honey bees and wasps. *Western Journal of Medicine*, 170(4), 223–227.
- Vucevic, D., Melliou, E., Vasilijic, S., Gasic, S., Ivanovski, P., Chinou, I., & Colic, M. (2007). Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *International Immunopharmacology*, 7(9), 1211–1220.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.05.005>
- Yunes, R., Goldhammer, A. R., Garner, W. K., & Cordes, E. H. (1977). Phospholipases: Melittin facilitation of bee phospholipase A2-catalyzed hydrolysis of unsonicated lecithin liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183(1), 105–112.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90424-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90424-6)
- Zarrinnahad, H., Mahmoodzadeh, A., Hamidi, M. P., Mahdavi, M., Moradi, A., Bagheri, K. P., & Shahbazzadeh, D. (2018). Apoptotic Effect of Melittin Purified from Iranian Honey Bee on Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24(4), 563–570. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9641-1>
- Zolfagharian, H., Mohajeri, M., & Babaie, M. (2015). Honey Bee (*Apis mellifera*) Contains Anticoagulation Factors and Increases the Blood-clotting Time. *Journal of*

KAYNAKLAR DİZİNİ

Pharmacopuncture, 18(4), 7–11. <https://doi.org/10.3831/kpi.2015.18.031>

