



**T.C.**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

**GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANILAN BAZI APİTERAPİK  
ÜRÜNLERİN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE HATLARINDA  
ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AYBÜKE AFRA KESKİNER**

**TEZ DANIŞMANI  
DOÇ. DR. ARİF AYAR**

**AMASYA  
AĞUSTOS 2021**

**T.C.  
AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

**GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANILAN BAZI APİTERAPİK  
ÜRÜNLERİN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE HATLARINDA  
ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

**Aybüke Afra KESKİNER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Arif AYAR**

**AMASYA  
AĞUSTOS 2021**

AYBÜKE AFRA KESKİNER tarafından hazırlanan “**GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANILAN BAZI APİTERAPİK ÜRÜNLERİN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE HATLARINDA ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Tıp** Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Arif AYAR

Sabuncuoğlu Şerefeddin SHMYO, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. ....

Başkan: Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. ....

Üye: Dr. Öğrt. Üyesi Burak YAZGAN

Sabuncuoğlu Şerefeddin SHMYO, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. ....

Tez Savunma Tarihi: 18/08/2021

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....  
Prof. Dr. Tuba YILDIRIM  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



**Çekirdek aileme**

## ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Aybüke Afra KESKİNER

18/08/2021



## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince her zaman bana destek olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak çalışmamı özenli bir şekilde yönlendiren tez danışmanım Doç. Dr. Arif Ayar'a, lisansüstü eğitimim süresince çalışmalarımın her aşamasında laboratuvar bilgilerini paylaşan ve öğrenmemi sağlayan Prof. Dr. Tuba Yılmaz'a, Öğr. Gör. Dr. Seda Mesci'ye, Mehmet Fidan'a ve Öğr. Gör. Ersin Demir'e, Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarının tüm akademik ve idari personeline, apılarnil ve ana arı larvası liyofilizatını temin etmem için yardımcı olan Harşena Bal ve Apiterapi Ürünleri'ne, lisansüstü eğitimim boyunca desteklerinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sevinç Kurt Konakoğlu'na ve Dr. Öğr. Üyesi Berkant Konakoğlu'na, çalışmam boyunca beni yalnız bırakmayan, azmiyle bana ilham olan arkadaşım Berna Kocaman'a ve hayatımın her anına güzellikleri dokunan çekirdek aileme; annem Ayla Keskiner'e, babam Adnan Keskiner'e ve ağabeyim Mustafa Taha Keskiner'e teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>i</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>ii</b>
<b>TABLOLAR DİZİNİ.....</b>	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>v</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ.....</b>	<b>vi</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
2.1. Gıda Takviyeleri ve Tarihçesi.....	2
2.2. Apiterapi .....	3
2.2.1. Arı ürünleri .....	4
2.2.1.1. Bal .....	4
2.2.1.2. Propolis .....	5
2.2.1.3. Arı poleni .....	6
2.2.1.4. Arı ekmeği (Perga).....	7
2.2.1.5. Arı sütü .....	7
2.2.1.6. Arı zehri .....	8
2.2.1.7. Apilarnil ve ana arı larvası .....	9
2.3. Kanser .....	13
2.3.1. Meme kanseri .....	15
2.3.2. Kolon kanseri .....	16
2.3.3. Kanser ve sitotoksosite .....	18
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>19</b>
3.1. Materyal .....	19
3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar .....	19
3.1.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler .....	19
3.1.3. Test maddeleri.....	20
3.1.4. Kanser hücre hatları .....	20



3.2. Metod .....	22
3.2.1. Hücre besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması.....	22
3.2.2. Hücre kültür ortamı.....	23
3.2.3. Hücrelerin dondurulması .....	23
3.2.4. Hücrelerin çözülmesi .....	23
3.2.5. Hücrelerin pasajlanması .....	24
3.2.6. Hücrelerin sayımı .....	24
3.2.7. Hücrelerin plakelere ekimi.....	25
3.2.8. Test maddelerinin plate içerisine ekimi.....	27
3.2.9. MTT solüsyonunun hazırlanması ve plate içerisine ekim .....	27
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>31</b>
4.1. Hücre anti-proliferasyon analizleri .....	31
4.2. Liyofilize apilarnilin ve ana arı larvasının etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi..	31
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>52</b>

**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo 2.1.</b> Apilarnil ve Ana Arı Larvasının Kimyasal Bileşimi.....	11
<b>Tablo 2.2.</b> Arı Ürünlerinin Biyolojik Özellikleri.....	13
<b>Tablo 3.1.</b> Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler .....	20
<b>Tablo 3.2.</b> Hücre Besiyerleri.....	22
<b>Tablo 4.1.</b> Apilarnilin ve Ana Arı Larvasının MCF-7 Hücre Hattında MTT Absorbans Ölçümleri.....	32
<b>Tablo 4.2.</b> Apilarnilin ve Ana Arı Larvasının HT-29 Hücre Hattında MTT Absorbans Ölçümleri.....	34
<b>Tablo 4.3.</b> Apilarnilin ve Ana Arı Larvasının DLD-1 Hücre Hattında MTT Absorbans Ölçümleri.....	36

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.2.1. Apilarnilin (Erkek Arı Larvasının) Gelişim Evreleri.....	10
Şekil 2.2. Yüzde Pay Olarak Liyofilize Apilarnilin Şeker Profili.....	10
Şekil 2.3. Arı Sütüne Kıyasla Yedi Günlük Erkek Arı Kuluçkasında Hormon Seviyeleri (nmol/ml).....	11
Şekil.2.4. Metastaz Oluşum Evreleri.....	14
Şekil.2.5. Dünyada Kadınlara ve Erkelere Ait 2020 Yılı Kanser İstatistikleri.....	15
Şekil.2.6. Meme Kanserinin Belirtileri.....	16
Şekil.2.7. Kolon Kanseri Oluşumu.....	17
Şekil 4.1. Apilarnilin MCF-7 Kanser Hücre Hattında MTT Analizi.....	32
Şekil 4.2. Ana Arı Larvasının MCF-7 Kanser Hücre Hattında MTT Analizi.....	33
Şekil 4.3. Apilarnil ve Ana Arı Larvasının MCF-7 Hücre Hattında MTT Analizleri.....	34
Şekil 4.4. Apilarnilin HT-29 Kanser Hücre Hattında MTT Analizi.....	35
Şekil 4.5. Ana Arı Larvasının HT-29 Kanser Hücre Hattında MTT Analizi.....	35
Şekil 4.6. Apilarnilin DLD-1 Kanser Hücre Hattında MTT Analizi.....	37
Şekil 4.7. Ana Arı Larvasının DLD-1 Kanser Hücre Hattında MTT Analizi.....	37
Şekil 4.8. Apilarnil ve Ana Arı Larvasının DLD-1 Hücre Hattında MTT Analizleri.....	38

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 3.1.</b> Tez Çalışmasında Kullanılan Liyofilize Apilarnil ve Ana Arı Larvası.....	20
<b>Resim 3.2.</b> Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Hatlarının Görüntüleri.....	21
<b>Resim 3.3.</b> Thoma Lamı.....	25
<b>Resim 3.4.</b> Thoma Lamından Hücre Sayımı.....	25
<b>Resim 3.5.</b> MCF-7, HT-29 ve DLD-1 Kanser Hücre Hatlarının 96'lı Plate İçine Ekimi...	26
<b>Resim 3.6.</b> 96'lı Plate Kuyusuna Ait HT-29 Kanser Hücre Hattının Görüntüsü.....	27
<b>Resim 3.7.</b> Reaksiyonu Durdurmak İçin DMSO Eklenmesi.....	28
<b>Resim 3.8.</b> Plate'nin Spektrofotometrede Okutulması.....	28
<b>Resim 3.9.</b> Test Maddelerinin Tek Tekrarlı MTT Çalışması.....	29
<b>Resim 3.10.</b> MCF-7, HT-29 VE DLD-1 Tek Tekrarlı MTT Çalışması.....	30

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Tez çalışmasında kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
g	Gram
IU	İnternational Unit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm <sup>3</sup>	Milimetreküp
ppm	Parts Per Million
rpm	Dakikadaki dDevir Sayısı
V	Hacim
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
AMP	Adenozin Monofosfat
DLD-1	İnsan Kolon Adenokarsinom
DMSO	<i>Dimetil sülfoksit</i>
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
HAD	10-hidroksi-2-dekenoik asit
HT-29	İnsan Kolorektal Adenokarsinom
IC <sub>50</sub>	% 50 İnhibitör Konsantrasyonu
MCF-7	İnsan Meme Adenokarsinom
P53	Tümör Protein 53
PBS	Phosohate Buffer Saline
Ph	Power of Hydrogen
TAT	Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi

## ÖZET

### GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANILAN BAZI APİTERAPİK ÜRÜNLERİN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE HATLARINDA ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Aybüke Afra KESKİNER

Amasya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Ağustos/2021  
Danışman: Doç. Dr. Arif AYAR

Gıdaların doğal yollardan hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin bilimsel olarak ortaya konulması sağlığımızın korunmasında beslenme desteğinin önemini arttırmaktadır. Bu sebeple gıda takviyeleri daha fazla tüketilir hale gelmiştir. Bu tez çalışmasında; MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) kanser hücre hatlarında antikanserojenik etki göstereceği düşünülen gıda takviyesi olarak kullanılan liyofilize apilarnilin ve ana arı larvasının sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle hücre proliferasyonunu engelleyici olduğu düşünülen gıda takviyesi olarak kullanımı artıran apilarnil ve ana arı larvasının *in vitro* çalışılması planlanmıştır. MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) kanser hücre hatlarında, apilarnilin ve ana arı larvasının sitotoksik dozu ve IC<sub>50</sub> değeri MTT yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulguların değerlendirilmesi ile kanserli hastaların tedavi sürecinde yaşadığı olumsuzluklar ve ilaçların yarattığı güçlü yan etkiler düşünüldüğünde, antioksidan ve antikanserojen etkisi olan gıda takviyelerinin geliştirilmesi ve kullanılması önem arz etmektedir. Bu çalışmamız literatüre, kanser hastaları arasında gıda takviyelerinin kullanımındaki artış nedeniyle, apilarnil ve ana arı larvası gibi son zamanlardaki popüler arı ürünlerinin geniş çaplı çalışmalarla insan sağlığı üzerine etkisi ve sağlık profesyonellerinin bu konuda hastalarını bilinçlendirmesi için önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Ana arı larvası, Apilarnil, IC<sub>50</sub>, MTT yöntemi, Sitotoksitite

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF THE EFFECTIVENESS OF SOME APITHERAPIC PRODUCTS USED AS FOOD SUPPLEMENT IN VARIOUS CANCER CELL LINES

Aybüke Afra KESKİNER

Amasya University, Institute of Health Sciences  
Department of Molecular Medicine, MSc, August / 2021  
Advisor: Assoc. Prof. Arif AYAR

Scientifically demonstrating the effectiveness of foods in the prevention and treatment of diseases in natural ways increases the importance of nutritional support in the protection of our health. For this reason, food supplements have become more consumed. In this study; It was aimed to investigate the cytotoxic effects of lyophilized apilarnil and queen bee larvae, which are used as food supplements and also thought to have anticarcinogenic effects on MCF-7 (human breast adenocarcinoma), HT-29 (human colorectal adenocarcinoma) and DLD-1 (human colon adenocarcinoma) cancer cell lines. Moreover, apilarnil and queen bee larvae are thought to inhibit cell proliferation. Therefore, in vitro study of apilarnil and queen bee larvae were chosen among the food supplements. In MCF-7 (human breast adenocarcinoma), HT-29 (human colorectal adenocarcinoma) and DLD-1 (human colon adenocarcinoma) cancer cell lines, the cytotoxic dose and IC<sub>50</sub> value of apilarnil and queen bee larvae were determined by MTT method. Considering the findings obtained from the study and the negative effects experienced by cancer patients during the treatment process and the strong side effects caused by drugs, it is important to develop and use food supplements with antioxidant and anticarcinogenic effects. It's thought that this study will contribute to the literature, due to the increase in the use of food supplements among cancer patients, the effect of recently popular bee products such as apilarnil and queen bee larvae on human health with large-scale studies and health professionals to raise awareness of their patients on this issue.

**Key Words:** Queen bee larvae, Drone bee larvae, IC<sub>50</sub>, MTT assay, Cytotoxicity

## 1. GİRİŞ

Günümüzde gelişmekte olan ‘gıda’ terimi yaklaşımı eski zamanlarda yaşamsal değeri, açlık giderme ve besin öğelerinin yetersizliği gibi sorunların haricinde; kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve obezite gibi kronik hastalıkların riskini azaltan, ruhsal ve bedensel tam anlamıyla bir iyilik hali için gerekli olan potansiyel faydalı etkileriyle değerlendirilmektedir [1]. Dünyada yaşlı nüfusun artması, fiziksel aktivite oranının azalması, sigara ve alkol gibi zararlı alışkanlıkların yaygınlaşması ve yaşam tarzlarının değişmesi gibi birçok neden kanser başta olmak üzere küresel hastalıkların oranını giderek artırmaktadır [2]. Özellikle kanser tedavileri yan etkiler oluşturabilmekte ve bu yan etkiler hastaların yaşam kalitesinde, günlük fonksiyonlarında ve tedaviye uyumlarında bazı güçlükleri de beraberinde getirebilmektedir. Tanıdan sonra tedavilerin başlaması ile birlikte birçok hasta, kanser tedavilerinin yan etkilerine karşı yaşam süresini ve kalitesini artırmak için farklı arayışlar içerisine girmektedir [3]. Bireyler; sağlık hizmetlerine erişimin kolaylaşması beslenme ve sağlıklı yaşam tarzları ile ilgili artan farkındalık düzeyi, özellikle sosyal medyada sağlıklı beslenmenin oldukça ön planda olması gibi nedenler dolayısıyla kendi sağlıkları ile ilgili kararları verme yetkisini ellerine almışlardır [4]. Bu etmenlerle birlikte günümüzde birçok birey yeterli ve dengeli beslenmeye katkı sağlamak hastalıklarını tedavi etmek ve bedensel ve ruhsal olarak dinç olmak için gıda takviyesi kullanmaktadır [5]. Günümüzde bireylerin doğal gıdalara ve gıda takviyelerine yönelmesi bilimsel araştırmaların odak noktası olmaktadır [6]. Bu nedenle, eski zamanlardan itibaren beslenme ve tedavi gibi farklı konular için kullanılan bal, balmumu, arı poleni, arı sütü, propolis, apilarnil, ana arı larvası, perga, arı zehri gibi arı ürünlerinin belirli dozlarda tüketilmesi bilimsel çalışmalarla öngörülmüş olup, araştırmaların odak noktası haline almıştır.

Bu tez çalışmasında; MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) kanser hücre hatlarında antikanserojenik etki göstereceği düşünülen gıda takviyesi olarak kullanılan liyofilize apilarnilin ve ana arı larvasının sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle hücre proliferasyonunu engelleyici olduğu düşünülen gıda takviyesi olarak kullanımı artıran apilarnil ve ana arı larvasının *in vitro* çalışılması planlanmıştır. MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) kanser hücre hatlarında, apilarnilin ve ana arı larvasının sitotoksik dozu ve IC<sub>50</sub> değeri MTT yöntemi ile tespit edilmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Gıda Takviyeleri ve Tarihçesi

Gıda takviyeleri veya nutrasötikler Dr. Stephen De Felice'in, "Nutrasötik" terimini 1989'da "Nutrition" ve "Pharmaceutical" kelimelerini birleştirerek türetmesiyle ortaya çıkmıştır [7].

Gıda takviyeleri, “Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği’nde; normal beslenmeyi takviye etmek amacıyla; vitamin, mineral, protein, karbonhidrat, lif, yağ asidi, amino asit gibi besin öğelerinin veya bunların dışında besleyici veya fizyolojik etkileri bulunan bitki, bitkisel ve hayvansal kaynaklı maddeler, biyoaktif maddeler ve benzeri maddelerin konsantre veya ekstraktlarının tek başına veya karışımlarının kapsül, tablet, pastil, tek kullanımlık toz paket, sıvı ampul, damlalık şişe ve diğer benzeri sıvı veya toz formlarda hazırlanarak günlük alım dozu belirlenmiş gıda ürünleri olarak tanımlanmaktadır [8]. Kullanılan gıda takviyelerinin olması gereken özellikleri şöyle sıralanabilir:

- Gıda maddesi normal beslenmeyi sağlamanın yanında beden ve zihin sağlığının sürdürülebilirliğine ve geliştirilerek iyileştirilmesine yardımcı olmalıdır.
- Besleyicilik özelliği ve sağlığa katkıları bilimsel çalışmalarla kanıtlanmış olmalı ve bu kanıtlar beslenme disiplinleri ve tıbbi platformlarda kabul edilmelidir.
- Gıda takviyesinin içindeki besinin uygun alım miktarı standardı tıp ve beslenme bilimi otoritelerince belirlenmiş olmalıdır.
- Gıda, içeriği açısından güvenilir olduğu tartışmasız kabul edilmiş olmalıdır.
- Gıda maddesindeki besin öğelerinin fiziksel, mikrobiyolojik, biyokimyasal özellikleri somutlaştırılmış olmalıdır.
- Proses modifikasyonu veya biyoteknoloji uygulamaları ile işlenerek fonksiyonel özellik kazandırılmış gıdaların besleyici özellikleri ve besin değerlerinde kayıp olmaması gerekir [9].

Günümüzde koruyuculuk hekim anlayışı olan bireylerin hastalanmadan önce beslenme tarzlarını değiştirmek gibi yaşam tarzları ile ilgili yapabilecekleri davranışları teşvik etmeyi temel alan bir anlayış önem kazanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü’nün (DSÖ) sağlığı “yalnızca hastalık veya sakatlığın yokluğu değil, fiziksel, ruhsal ve sosyal olarak tam bir iyilik hali” şeklindeki tanımlaması doğrultusunda, hastalıkları tedavi etmek değil, hasta olmamayı sağlamak da hekimliğin işlevleri arasında sayılmaktadır. Besinlerin tedavi edici olabileceği düşüncesi yeni değildir, 2500 yıl önce tıbbın babası Hipokrat “besinler ilacınız, ilacınız besinler olsun” sözü ile besinlerin ilaçlar gibi davranabileceğini belirtmiş bu sebeple besinlerin sağlık

üzerindeki etkileri uzun yıllar araştırılmıştır [10]. Son zamanlardaki bilimsel araştırmalar beslenme ve hastalıklar arasındaki bağlantıyı açıkça ortaya koymuştur. Epidemiyolojik çalışmalar, tıbbi beslenme tedavisinin bazı hastalıkların tedavisinde veya önlenmesindeki rolüne işaret etmektedir. Besinlerin “doğal” yollardan hastalıkların bilimsel bir şekilde sağlığın korunmasında ve hastalıkların önlenmesinde gıda takviyesinin önemini arttırmaktadır. Bu sebeple gıda takviyeleri daha fazla tüketilir hale gelmiştir [11].

Günümüzde hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçların yan etkileri, toksik olmayan ve kolay ulaşılabilir olan alternatif tedavilere ihtiyacı ortaya çıkarmıştır. Tıp eğitiminin ve tıbbi teknolojinin geliştiği günümüzde insanların gıda takviyelerini tüketmeleri çelişki gibi görünse de bireylerin yapay hale gelen yaşam koşulları neticesinde doğal olandan yararlanma düşüncesi ve motivasyonu anlaşılabilir niteliktedir [12].

Tüm kültürlerde insan sağlığı için geleneksel bir gıda bulunmaktadır. Örneğin bu gıda gruplarından birisi de arı ürünleridir. Yüzyıllardır yeryüzünde bal arılarının varoluşu ve ürettiği arı sütü, bal, balmumu, arı poleni, propolis ve arı zehri gibi kendi ürünlerinin kimyasal ve biyolojik özelliklerinin günümüzde pek çok alanda hala alternatif ürün olarak kullanılması sebebiyledir [13]. Günümüzde arı ürünleri çeşitli gıda takviyeleri olarak karşımıza çıkmaktadır ve bireylerin doğal olana yönelme isteği, arı ürünlerinin gıda takviyeleri olarak kullanımını tetikleyen ana unsurlardandır.

## 2.2. Apiterapi

Yapay yaşam koşulları ile artan hastalıklar, özellikle kimyasal ilaçların vücutta geliştirdiği ilaç direnci ve yan etkileri bireyleri alternatif çözümler aramaya yönlendirmiştir [14].

Apiterapi, insanların sağlıklarını korumak ve hastalıklarını kontrol altına almak veya önlemek, iyileşmeyi sürdürmek amacıyla arı ürünlerinin (bal, propolis, arı sütü, perga, polen, apilarnil, ana arı larvası, arı zehri, balmumu vb.) tek olarak veya bir araya getirmesiyle uygulanan destek alternatif tedavi yöntemidir. Apiterapi, dünyanın birçok yerinde çeşitli hastalıklar için yaklaşık 3000 yıldır uygulanan bir tedavi yöntemidir [15].

Arılar tarafından üretilen farklı ürünler, çeşitli hastalıkların iyileştirilmesine yardımcı olabilir ve sağlık açısından birçok olumlu katkı sağlar:

- Patojen mikroorganizmalara karşı koruma sağlar özellikle propolis bir anti-mikrobiyal bir arı ürünüdür.
- İştahı düzenler ve sindirimi iyileştirmektedir.
- İnsanlarda metabolizmayı hızlandırmaktadır.

- Yağ birikimini azaltmaktadır.
- Bağırsakların farklı fonksiyonlarını düzenlemektedir.

Arılar, yeryüzünde birçok katkısı bulunan canlılardır, polinasyondan sonra en önemli katkılarında biri, insan sağlığına sunduğu ürünlerdir. Apiterapide dikkat edilecek hususlar şu şekilde sıralanabilir:

- Düzenli olarak ve belirlenen miktarlarda tüketildiklerinde çeşitli hastalıklar önlenmektedir.
- Uygun şekilde kullanıldığında arı ürünleri yan etki göstermemektedir.
- Besin öğeleri açısından zengindir.
- Arı ürünlerinin bileşimi, ürünlerin hasatının yapıldığı bölge ve bitki örtüsüne göre farklılık gösterebilir. Bu nedenle kaynağının bilinmesi son derece önemlidir.
- Saklama koşulları önemlidir ve dikkat edilmelidir.
- Bazı arı ürünleri alerji riski oluşturabilir [16].

Son zamanlarda dünyada apiterapiden faydalanan çok sayıda ülke bulunmaktadır ve ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından 27 Ekim 2014'de çıkan Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği'nde apiterapi; 'arı ve arı ürünlerinin koruyucu ve bazı hastalıkların tedavisinde destek olarak kullanılması biçimi' olarak tanımlanmıştır [17].

Türk Gıda Kodeksi, Uluslararası Bal Komisyonu'nun tavsiyeleri ile apiterapide kullanılacak ürünlerin kalite kriterleri ve standardizasyonu konuları üzerinde çalışılmaktadır ve bilimsel literatür dikkate alınarak kalite kriterleri sürekli güncellenmektedir. [18].

## 2.2.1. Arı ürünleri

### 2.2.1.1. Bal

Bal, kolay ulaşılabilir olan ve en çok tüketilen arı ürünüdür [19]. Bal, çiçekli bitkilerde bulunan nektar bezlerinden salgılanan nektar ile ve bitki üzerinde yaşayan böceklerin salgıladığı maddeler ile bal arılarının (*Apis mellifera*) vücutlarında bu maddelerin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve olgunlaşması sonucu oluşan dünyada en çok bilinen tatlı bir arı ürünüdür [20].

Balın yapısında yaklaşık olarak 200 çeşit bileşen bulunmaktadır ve içerdiği besin öğeleri (vitaminler, mineraller, organik asitler, flavonoidler, fenolik asitler, aminoasitler ve enzimler) nedeniyle sindirimi kolay, besleyici ve birçok hastalığa karşı koruyucu özellik gösteren fonksiyonel bir gıdadır [21]. Balın biyolojik özelliklerinden sorumlu olabilecek bileşenlerin karakterizasyonu büyük ilgi görmektedir bu sebeple bal iyileştirici, antibakteriyel ve

antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle dünya çapında çeşitli tıbbi geleneklerde kullanılan oldukça besleyici doğal bir gıda ürünüdür. Ortaya çıkan kanıtlar, balın kimyasal önleyici, antiaterojenik ve bağışıklık düzenleyici özelliklerin yanı sıra doğal bir gıda antioksidanı olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir [22].

### 2.2.1.2. Propolis

Propolis kelimesi Yunanca 'pro' ('önünde' anlamına gelir) ve 'polis' ('şehir' anlamına gelir) kelimelerinden türetilmiştir ve 'şehrin savunması' anlamına gelmektedir. Arılar tarafından toplanan, dönüştürülen ve peteklerindeki delikleri kapatmak, iç duvarları düzleştirmek, larva gözlerine yumurta bırakılmadan önce cilalamada ve girişi davetsiz misafirlere karşı korumak için kullanılan birçok maddenin heterojen bir karışımıdır. Propolis, kolonilerin kovan duvarlarındaki mikrobiyal büyümenin azaltılması, yuvaya kontrolsüz hava akışının önlenmesi, duvarların dış neme karşı su geçirmez hale getirilmesi ve istilacılara karşı koruma yoluyla yuva ortamının homoestazını daha iyi sürdürmesi için bir araç görevi görür bu nedenle propolis kelime anlamı arılar için 'kovanın savunması' anlamına gelebilir [23]. Propolis, bal arıları tarafından davetsiz misafirlere karşı savunma olarak üretilen reçineli bir maddedir. Antik çağlardan beri kullanılan ilgili terapötik özelliklere sahiptir [24]. Propolisin özellikle antiseptik ve antibiyotik özellikleri antik çağlardan beri bilinmekte ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Eski antik çağ hekimleri propolisin öncelikli olarak ağız enfeksiyonları ve derideki yaraları iyileştirme de etkin olarak kullanıldığını not etmişler ve özellikle deri apselerinin tedavisinde uzun yıllar kullanılmıştır. Tıp yeminine adını vermiş tıbbın babası Hipokrat propolisin sindirim sisteminin inflamatuvar rahatsızlıklarında kullanımını önermiş, ülser tedavisi için kullanımını önermiştir. Antik mısırdaki propolisin antiseptik özelliği bilindiği için çürümeyi önleyici olarak ölüleri mumyalamada kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca ağrı kesici özelliği nedeniyle ağrıları gidermede de yüz yıllarca kullanılmıştır. Eski uygarlıklar propolisin ateş düşürücü ve antimikrobiyal özelliklerinden faydalanmış ve etkin olarak kullanılmıştır. Arı sağlığında ve koloninin tüm patojenlere karşı korunmasında müstesna ehemmiyeti olan propolis, insan sağlığı içinde çok önemli bir doğal üründür. İnsanoğlunun binlerce yıldır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullandığı propolis bilimin de ilgisini çekmiş ve antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-kanser etkisi yapılan klinik çalışmalarla da ispat edilmiştir [25].

Çeşitli hücre kültürü çalışmalarında ve *in vivo* çalışmalarda propolisin kanser hücrelerinin poliferasyonunu durdurduğu, anjiyogenezini önlediği ve kanserli hücreyi apoptoza sürüklediği görülmüştür. Diğer kimyasal tedavi edici ilaçlarla birlikte kanser tedavisinde çok etkili olduğu

belirtilmiştir. Propolisin yapılan çalışmalarda, kanser hücre hatlarına gösterdiği güçlü sitotoksik etkisi ile metastazı önlediği bulunmuş ve hücre içi yolaklarla otofajiyi sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca kanser hastalarının tedavisinde kullanılan kemoterapinin ve radyoterapinin yaratmış olduğu zararlı etkilerden sağlıklı hücreleri koruduğu görülmüştür. Propolisin kanser hastalığını tedavi etmesinden ziyade düzenli aralıklarla kullanımının kanseri önlemede etkili olacağı belirtilmiştir [26]. Sonuç olarak kovan savunmasını sağlayan propolis; güvenilir ve ilaç olarak kabul edilmeyen bir gıda takviyesi olarak tanımlanabilir ve tıbbi tedaviyi destekleyici olarak diyetisyen ve doktor gözetiminde kullanılması uygundur [27].

### 2.2.1.3. Arı poleni

En çok bilinen apiterapötiklerden biri olan arı poleni, çiçekli bitkilerin üreme birimi olan polenlerin, bir miktar arı salgısı ile pellet halini alması ile oluşmaktadır. Polen kelimesi ilk olarak İsveçli botanikçi Carl Linnaeus tarafından kullanılmıştır ve Latince’de ‘ince toz’ anlamına gelmektedir. Çiçeklerden topanan polenler, işçi arılarında bulunan polen keselerinde ve vücudunun üstüne yapışarak kovana taşınır. Kovana getirilen polen sepeti genellikle bir bitkinin polenlerinden oluşur. Arılar birçok farklı bitki türünden polen toplarlar ancak sadece polen topladıkları bitki grupları; haşhaş, mısır ve bakladır. Diğer melez bitkilerden arılar hem nektarı hem de polen toplar. Arı poleni, kapsamlı besleyici ve tedavi edici özelliklere sahip aktif doğal metabolitleri nedeniyle, insan beslenmesinin bir hazinesi olarak tanımlanır [28].

Bal arılarının tek doğal protein kaynakları polendir [29]. Polen, % 22,7 protein içermektedir ve bu proteinin % 10,4’ünü esansiyel amino asitler (metiyonin, lizin, treonin, histidin, lösin, izolösin, valin, fenilalanin ve triptofan) oluşturmaktadır. Arı poleni yapısında proteinlerin yanısıra flavonoidler ve fenolik bileşikler barındırmaktadır. Flavonoidler antioksidan, antiinflamatuvar ve antiaterosklerotik özelliklere sahiptir [30]. Polenin besleyici özellikleri ve düzenleyici metabolik süreçler, diğerlerinin yanı sıra, çocukların iştahsızlık, gelişme geriliği, çocukların ve yetişkinlerin yetersiz beslenmesi durumlarında kullanılır ve ayrıca, iyileşme döneminde kişilere polen verilmesi önerilir. İnsan vücudu için gerekli minimum aminoasit ihtiyacını günlük 15 gram polenin karşıladığı bildirilmiştir. Arı poleni, ağır metal kontaminasyonu, endüstriyel gazlardan ve radyasyondan kaynaklanan serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunu sağlar. Arı poleni, güçlü bir bağışıklık uyarıcısı ve sağlık destekçisidir. Arı poleni de değerli bir gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır [31].

#### 2.2.1.4. Arı ekmeği (Perga)

Çeşitli bölgelerden kovana getirilen polenler arılar tarafından kullanabilmek için fermentasyon sürecinden geçmesi gerekir. Petek gözlerine depolanan polenler, işçi arılar tarafından üzerine bir miktar sindirim enzimi ile sıkıştırılarak bir miktar bal eklendikten sonra petekler balmumu ile kaplanır. Mikroorganizmalar sayesinde petek gözlerine depolanan polenler yaklaşık iki hafta süresince fermentasyon sürecini tamamlayıp olgunlaşarak arıların beslenmesine uygun hale gelmektedir. Bu şekilde peteklerde fermentasyon sonucu olgunlaşan polenler 'perga' veya 'arı ekmeği' olarak adlandırılmaktadır [32]. Arı ekmeğinde gerçekleşen fermentasyon asiditeyi artırarak patojen mikroorganizmaların üremesini inhibe etmektedir. Bu sayede kovanda uzun süre muhafaza edilebilir. Perga, kraliçe arının ana gıda maddesi olmasının yanı sıra ergin arılar tarafından tüketilir ve larvaların beslenmesinde kullanılır [33].

Arı ekmeğinin biyolojik aktivitesi için polenin kaynağı, tazeliği ve kalitesi önemlidir. Uygun olmayan koşullar içerisinde depolanan veya uzun süre bekletilen (bir yıldan fazla) arı ekmeğinin biyolojik etkinliğinin azaldığı bildirilmektedir. Bu sebeple, arı ekmeğinin uygun şartlarda örneğin serin, gün ışığı almayan, rutubetsiz ve kuru ortamda depolanması gerektiği ifade edilmektedir. Polene göre kıyasladığımızda protein ve yağ miktarı daha az olan arı ekmeğinin, karbonhidrat ve laktik asit miktarı daha fazladır [34]. Arı ekmeği yapısında temel olarak amino asitler, basit şekerler içermektedir ayrıca vitaminler (A, B1, B2, B3, B6, B12, C) ve mineraller (kobalt, fosfor, demir, kalsiyum) açısından zengin bir içeriğe sahiptir. % 20-22 protein, % 24-35 karbonhidrat, % 1,6 lipid, % 2,43 mineral, %3,5 laktik asit, %35 şeker ve %1.6 yağ içeriğine sahiptir. İçerdiği amino asitler, biyoaktif olup, insan vücudu tarafından kolayca sindirilebilmektedir [35]. Fermente bir gıda olan perganın biyoyararlanabilirliği arı polenine göre çok daha yüksektir. Dünyada arı ekmeğinin (perga) gıda takviyesi olarak kullanımı yaygınlaşmaya ve arı polenine göre daha çok tercih edilmeye başlanmıştır [36].

#### 2.2.1.5. Arı sütü

Mükemmel besin anlamına gelen "Royal Jelly" adı verilen arı sütü 5-15 günlük işçi arıların üst çene (mandibular) ve boğaz bezlerinden (hipofaringeal) salgılanır. Tüm arı larvaları ilk üç günlük dönemlerinde, ana arı olacak larvalar ise larval ve ergin dönemlerinin tamamında sadece arı sütü ile beslenirler. Arı sütü, kremi, kemik renginde kendine has bir kokusu olan ve ekşi-acı bir tatta besleyici bir gıda şeklinde tanımlanmaktadır [37].

Ham madde kaynağı; polen, su ve baldan oluşan arı sütü, su (%50-60), proteinler (%18), karbonhidratlar (%15), lipidler (%3-6), mineral tuzlar (%1.5) ve vitaminlerden oluşur. Royalactin arı sütünde bulunan en önemli proteindir. İmmünomodülatör özelliklere sahip olan

10-hidroksi-2-dekenoik asit (HAD) dahil olmak üzere önemli sayıda biyoaktif bileşikten oluşur. Yağ asidi, proteinler, adenzin monofosfat (AMP) N1 oksit, adenosin, asetilkolin, polifenoller ve testosteron, progesteron, prolaktin ve estradiol gibi hormonlar, arı sütünde mevcut olduğu bildirilen diğer yararlı biyoaktif bileşenlerdir [38]. Arı sütü vücutta hücre yenilenmesi üzerinde etkili olmaktadır. Arı sütünün kandaki kolesterol, total lipid, fosfolipid, trigliserit seviyelerini düşürmesi, tansiyon düşürücü ve damar genişletici aktivitesi bulunmaktadır [39]. Pek çok biyolojik yararı bulunan arı sütünün özellikle alerjik olmayan bireyler tarafından güvenle tüketilebileceği, nadiren de alerjik reaksiyonlara sebep olabileceği dikkate alınarak hem üretimi hem tüketimi desteklenmelidir [40]. Bu nedenle arı sütü, gıda ve nutrasötik endüstrisinde insan sağlığını iyileştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [41].

### 2.2.1.6. Arı zehri

M.Ö.2000 yıllarına ait bir papirüste hastalıkların tedavisinde arı zehrinin tedavi amaçlı kullanıldığının delillerine rastlanmıştır. Özellikle arı zehri ile romatizmanın tedavi edilebileceğini ve vücutta ağrı bulunan yeri arıya sokturularak zehrin aktarılması yapıldı. Hipokrat arı zehrinin romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılması gerektiğinden; Aeneas Tacticus ve Appianos arı zehri tedavisini askeri amaçla kullanımının daha uygun olduğu görüşündeydi. Arı zehri uygulaması ilk kez Çin tıp kitabı olan Nei Jing içerisinde bahsedilmiştir. Arı zehri tedavisi eski dönemlerde bilinmesine rağmen, bileşimi ancak 1900'lü yıllarda anlaşılmıştır. İlk kez 1928'de Avusturya'da Dr. Franz Kretsky tarafından arı zehrinin enjektabl formu geliştirmiştir. Bu gelişmelere paralel olarak Amerika'da Apiterapi Derneği kurulmuştur ve çalışmalarına hala devam etmektedir. 2003 yılında Güney Kore'de Amerikalı Doktor Christopher Kim enjektabl arı zehrinin ilk standardize formunu 'Apitoxin' adıyla patent altına almıştır [42].

Apitoksin olarak bilinen arı zehri; arının karın boşluğunda yer alan bezlerde üretilmektedir. Arılar 12-18 günlük iken arı zehri üretme kapasitesi en yüksektir 20 günlük olduklarında zehir üretme yeteneklerini kaybetmektedir. Bir arıdaki zehir üretme miktarı mevsimlere ve arının fiziksel yapısına göre değişiklik gösterir. Arı zehri açık renkte, kokusuz, berrak acı tatlı asidik sıvı bir maddedir. Sıvı kısımda uçucu fenolik bileşikler bulunmaktadır ve bu fenolik bileşikler buharlaştıktan sonra yaklaşık 0,1 mikrogram saf, kuru arı zehri elde edilir ki bunun anlamı 1 gr kuru zehir için 10.000 arı iğnesindeki zehre ihtiyaç vardır. Saf arı zehrinin rengi sarımtırak kahverengidir ancak ticari preparatların kahverengi olmasının sebebi zehir proteinlerinin okside olmasıdır [43]. Yapısındaki birçok farmakolojik etkisi bulunan arı zehri günümüzde doğal ilaç olarak görülmektedir. Ancak apiterapide en az kullanılan arı ürünü de arı

zehri olarak karşımıza çıkmaktadır. Çünkü toksik olan bu arı ürününün kullanımında yaşanabilecek tehlikelerin rolü büyüktür. Apitoksin oldukça karmaşık bir kimyasal yapıya sahiptir. Ana bileşen olarak proteinler, peptitler, aktif aminler ve enzimlerden oluşur. Arı zehri bileşiminde farmakolojik aktiviteye sahip biyoaktif bileşikler (histamin, melittin, apamin, MCD-peptidi, Fosfolipaz A1- A2 ve hyaluronidaz enzimleri) bulunmaktadır. Apitoksinin asıl etkisini sağlayan bileşikler aminoasit içeren peptidlerdir ve melittin bu peptidlerin %50'sini hızla kan dolaşımına karışmasını sağlar. Melittin, antimikrobiyal, antifungal, sinir sistemini düzenleyici ve radyosyondan koruyucu etkilere sahiptir. Düz kasları uyarır, kapiller geçirgenliği artırır ve kan basıncını düşürür. Arı zehrinin içinde en belirgin biyoaktif antikanser bileşiği mellitindir. Sentetik olarak üretilen mellitinin tek başına kanser hücrelerinin büyümesini engellediği bildirilmiştir [44].

Arı zehri tedavisine uzman doktor gözetiminde başlanmalıdır ve öncesinde mutlaka arı zehrine karşı alerji testi yaptırılmalıdır. Tedavi süresince alkol alınmaması önerilmektedir. Ayrıca süt, beyaz ekmek, dondurma, pirinç, şeker vb. beyaz yiyecekler tüketilmemelidir. Tedaviye en az 6 ay süresince devam edilmesi önerilmektedir. Apiterapötik ürünlerden arı zehri dışındaki arı ürünleri gıda katkı maddesi, gıda takviyesi ve tıbbi birer ürün olarak kullanılmaktadır ancak arı zehrinin kullanım alanları ve tedavisi kontrollü şartlarda yapıldığında etkili olan tedavi yöntemi olarak bildirilmiştir [45].

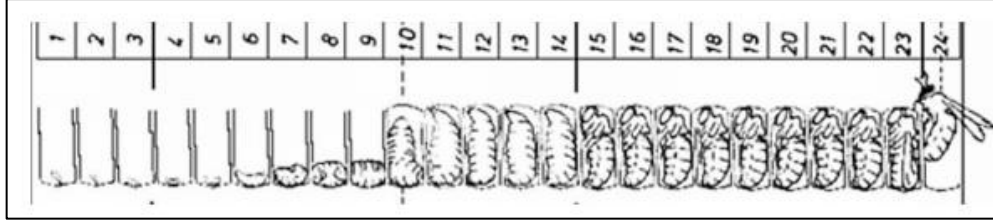
### 2.2.1.7. Apilarnil ve ana arı larvası

Apilarnil (erkek arı larvası), Nicola Iliesiu tarafından 1980 yılında Romanya'daki psikotik, nörodejeneratif ve cinsel rahatsızlıklara sahip olan yaşlılarda kullanılmıştır. Apilarnil adı Romen bilim adamı Nicolae Iliesiu tarafından, 'api' arıların latince adından (*Apis mellifera*), 'lar' larvalardan ve baş harfleri 'nil' tarafından oluşturulmuştur [46].

Günümüzde değişen yaşam koşulları nedeniyle hastalıkların artması, beslenmede yetersizlik, dengesizlik ve protein eksikliğinin giderilmesi amacıyla çeşitli fonksiyonel besin kaynakları konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Besin kaynaklarının etkin kullanılması amacıyla böcekler gıda olarak tüketilmeye başlanmıştır ve bal arıları da bu tüketimde yer almaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda erkek arı larvası (apilarnil) ve kraliçe (ana arı) larvasının yüksek besin değeri taşımaları nedeniyle sağlık koruma ve tıbbi beslenme tedavisine destek olmaktadır. Kraliçe arı (ana arı) ve erkek arı larvalarının hem gıda olarak tüketilmesi hem de apiterapide kullanımının yaygınlaşacağı ön görülmektedir. Apilarnil ve ana arı larvası ile üretilen sıvı, kapsül ve liyofilize olan gıda takviyelerinin insan sağlığına yararı konusunda farkındalığın artması sağlanmalıdır.

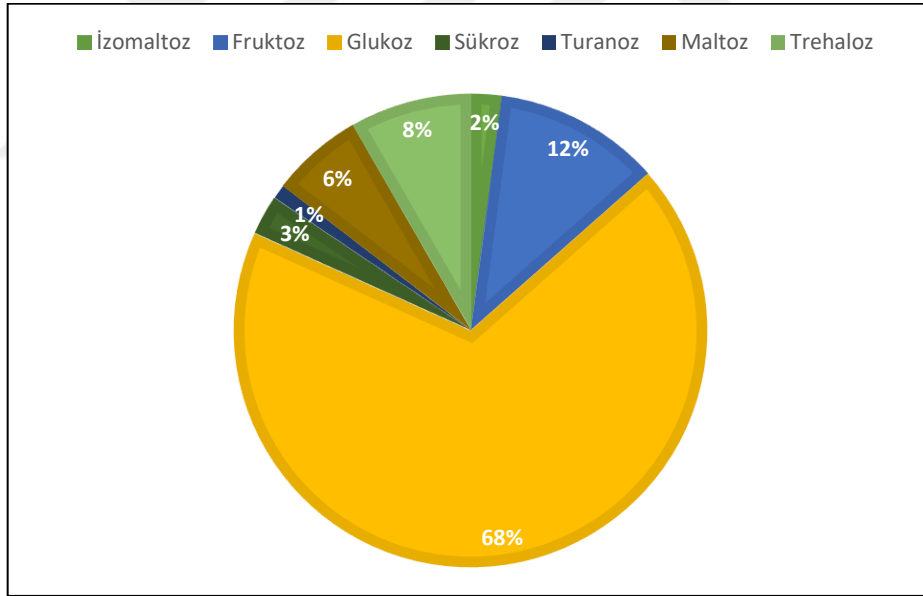


Apilarnil, erkek arı larvalarının pupa dönemine geçmeden önceki 3-7 günlük larva dönemidir. Hem yumurta hem de larva yapısı nedeniyle yüksek biyolojik aktivite göstermektedir. Apilarnil içeriğinde vücudumuzun temel yapıtaşı olan tüm esansiyel aminoasitleri içermesinden dolayı “tam gıda” olarak tanımlanmaktadır [47].



**Şekil 2.1.** Apilarnilin (erkek arı larvasının) gelişim evreleri [48]

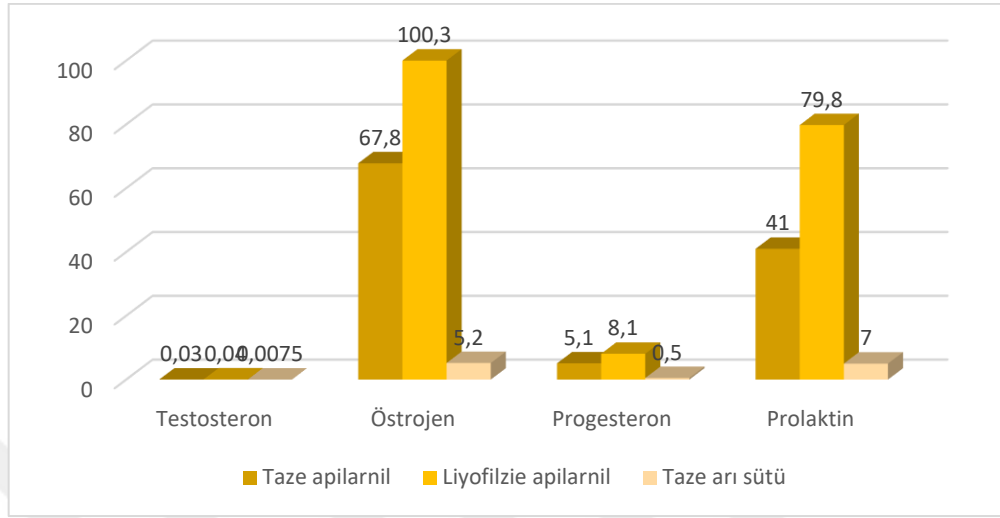
Kuluçkada bulunan şekerlerin kapsamlı karakterizasyonu Barnuti ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlara göre en yüksek oranda glukoz ve fruktoz bulunmuştur [48].



**Şekil 2.2.** Yüzde pay olarak liyofilize apilarnilin şeker profili [48]

Apilarnil, larvaların gelişimini düzenleyici hormonlar ve cinsiyet hormonları olmak üzere iki tür hormon içerir. Hem erkek hem de dişi cinsiyet hormonlarının kaynağıdır. Apilarnil içeriğinde en yüksek miktarda bulunan hormonlar östrojen ve prolaktin, en düşük düzeydeki hormon ise testosterondur. Yedi günlük erkek arı kuluçkasındaki bu erkek steroid hormonunun içeriği yaklaşık 0,003 nmol/mL'dir. Gelişmekte olan erkek arı larvalarındaki cinsiyet

hormonlarının seviyesi, gelişme aşamasına göre değişir, daha yaşlı larvalar daha yüksek testosteron ve daha düşük progesteron ve estradiol seviyelerine sahiptir [48].



**Şekil 2.3.** Arı sütüne kıyasla yedi günlük erkek arı kuluçkasında hormon seviyeleri (nmol/mL) [48]

Ana arı larvası son zamanların popüler olan bir diğer arı larvasıdır. Arı sütü üretimi sırasında doğal olarak ana arı yüksüğünde bulunan ve süt hasadı öncesi yüksükten 3 günlük ana arı larvaları toplanarak elde edilmektedir [49].

**Tablo 2.1.** Apilarnil ve ana arı larvasının kimyasal bileşimi

	Apilarnil	Ana Arı Larvası
Su Bileşimi %	73,25	75,17
Toplam Protein %	9,47	12,03
Lipid %	8,38	10,30
10 Hda %	-	0,09
Karbonhidrat %	-	-
Fruktoz %	0,38	1,25
Glukoz %	3,55	2,10
Sukroz %	-	0,08
Maltoz %	0,90	0,78
Trehaloz %	0,25	0,11

Apilarnilin toplam protein oranı %6.61-12 arasında saptanmıştır. pH 6.49 olarak belirlenmiştir [50]. Apilarnilin içeriğinde kalsiyum, magnezyum, fosfor, demir, manganez, bakır, çinko, sodyum, potasyum mineralleri; A vitamini, beta-karoten, ksantofil, B1 vitamini, B2 vitamini, B6 vitaminleri bulunmuştur [51]. Erkek arı (apilarnil) ve ana arı (kraliçe) larvası homojenatlarında en fazla saptanan bileşenler serbest aminoasitlerdir ve ana arı larvası

içeriğindeki esansiyel aminoasitlerin miktarı, erkek arı larvasından daha yüksek bulunmuştur. Bağlı içeriğin belirgin farklılıkları, homojenatin şeker içerikleri açısından da geçerlidir; ana arı larvaları az miktarda fruktoz (%0.4) ve glukoz (%6.0) içerirken erkek larvalarında bu içerikler sırasıyla %6.5 ve %56.7 olarak saptanmıştır [52].

Apilarnil ve ana arı larvası hasatı sonrası soğuk zincir muhafazasına dikkat edilmelidir. Diğer arı ürünleri gibi taze tüketilmelidir. Uzun süreli kullanımlarda ise öğütme, homojenleştirme, filtrasyon ve liyofilizasyon gibi işlemler uygulanmaktadır. Bu işlemler, larvanın besin madde kaybı olmaksızın, soğuk zincirde muhafazasına gerek olmadan kullanılmasına olanak tanımaktadır [53]. Özellikle apilarnilin ve ana arı larvalarının korunmasında uygulanan en iyi işlem liyofilizasyondur. Taze apilarnil ve ana arı larvası liyofilizesi -15 °C'de 1 yıl güvenle saklanabilmektedir [54]. Bu nedenle apilarnil ve ana arı larvalarının en kaliteli besin formunun korunduğu larva döneminde toplanması uygundur. Larvalar hasat sırasında öleceğinden yapısındaki protein bozulabileceğinden larvalar hızlı tüketilmeli veya işlenmelidir [55].

Apilarnil çeşitli nedenlere bağlı olan iştahsızlık, hipoproteinemi, erken yaşlanma, yaşlılarda depresyon, genital hastalıklar, hormon ve vitamin eksikliği gibi rahatsızlıklara fayda sağlamaktadır [56]. Kraliçe arının patojenlere karşı dirençli olmasında saf arı sütü ile ömür boyu beslenmesinin önemli etkisi bulunmaktadır [57]. Apilarnil ve ana arı larvası oksidatif süreçleri uyaran güçlü bir enerji sağlayıcıdır. Meme ve rahim kanserlerinin tedavisi sırasında va sonrasında apilarnil ve ana arı larvası kullanımının tedavide olumlu sonuçlar gösterdiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Erkek ve ana arı larvaları zengin bir besin kaynağıdır. Tıbbi tedaviyi beslenme anlamında tamamlayıcı ve destekleyici rol üstlenmektedir. Sağlığın korunması ve sağlığa destek sağlaması amacıyla apiterapötik etkilerinin belirlenerek gıda takviyesi olarak kullanımının yaygınlaştırılması gereklidir.

Arı ürünlerinin bilinen faydalı etkileri Tablo 2.2.'de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Arı ürünlerinin biyolojik özellikleri [57]

Arı Ürünlerinin Biyolojik Etkileri	Bal	Propolis	Arı Poleni	Arı ekmeği (Perga)	Arı Sütü	Arı Zehri	Apilarnil	Ana Arı Larvası
Anti-mikrobiyal	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Anti-viral	✓	✓	✓		✓		✓	✓
Antifungal	✓	✓	✓		✓	✓		
Antioksidan	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hepatoprotektif	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Anti-inflamatuar	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Radioprotektif		✓	✓	✓		✓		
Anti-kanser	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
İmmünstimulant	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Anti-allerjik	✓	✓	✓		✓	✓		
Yara iyileştirici özelliği	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Anti-aterojenik	✓	✓	✓		✓	✓		
Anti-nociceptive	✓	✓	✓		✓	✓		
Anti-nörodejeneratif	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Anti-osteoporozis					✓			
Anti-romatizmal		✓			✓	✓		
Anti-ülser	✓	✓	✓		✓	✓		
Anti-aging	✓	✓			✓	✓	✓	✓

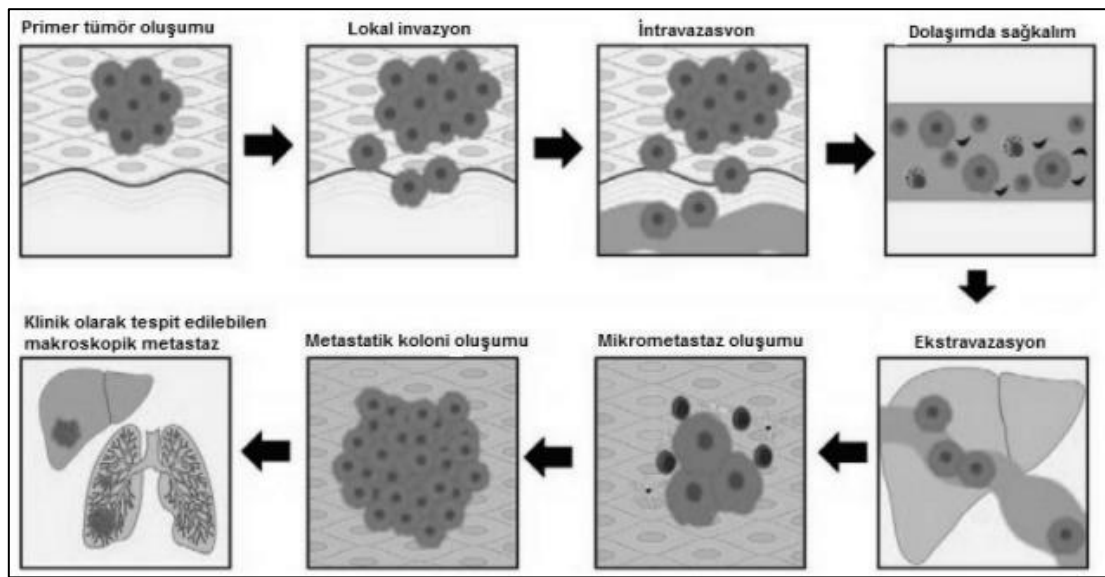
### 2.3. Kanser

Kanser kelimesi yengeç anlamına gelen Latince “cancer” ve “carcinus” kelimelerinden türetilmiştir. Tümör terimi ilk defa ilk defa MÖ 3. yüzyılda tümörün etrafındaki şişmiş damarları bir yengece benzetmesi nedeniyle Hipokrat tarafından kullanılmıştır. Yunan doktor Galen ise bu anlamda şişme anlamına gelen “oncos” terimini kullanmıştır. Kanser kompleks bir hastalık olarak, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkmaktadır. Kanser hücreleri normal hücrelerden şu özellikler sayısında ayrılmaktadır:

- Kendi sinyal sistemleri sayesinde kontrolsüz şekilde çoğalabilirler.
- Reseptörleri çevresinden daha sık sinyal almaktadır.
- Yanındaki hücreye temas ederek bölünmeyi durduramaz ve büyümeye ve çoğalmaya devam eder.
- Sağlıklı hücreler her besin ögesini kullanabilirken kanser hücreleri sadece glikolizden elde edilen glikozu kullanabilirler. Glikozu kandan yüz kat fazla almaları nedeniyle kanser hücreleri laktat üreterek enerji sağlarlar.

- Gerekli besin ve oksijeni almak üzere çevrelerindeki hücre kümesini etkileyerek yeni damar sistemleri oluşturabilirler.
- Sonsuz şekilde replike olup, çoğalabilirler
- Dolaşım sistemine girip farklı bir konumda kanserleşmeyi başlatabilirler.
- Apoptozdan kaçabilirler.
- Epigenetik olarak stabil olmamaktadırlar.

Kanser, farklı bir DNA'ya sahip olan her insan için tedavinin kuralını değiştirmesi sebebiyle “onkolojik hastalıklar” terimini kullanmak daha uygun görülmektedir [59].

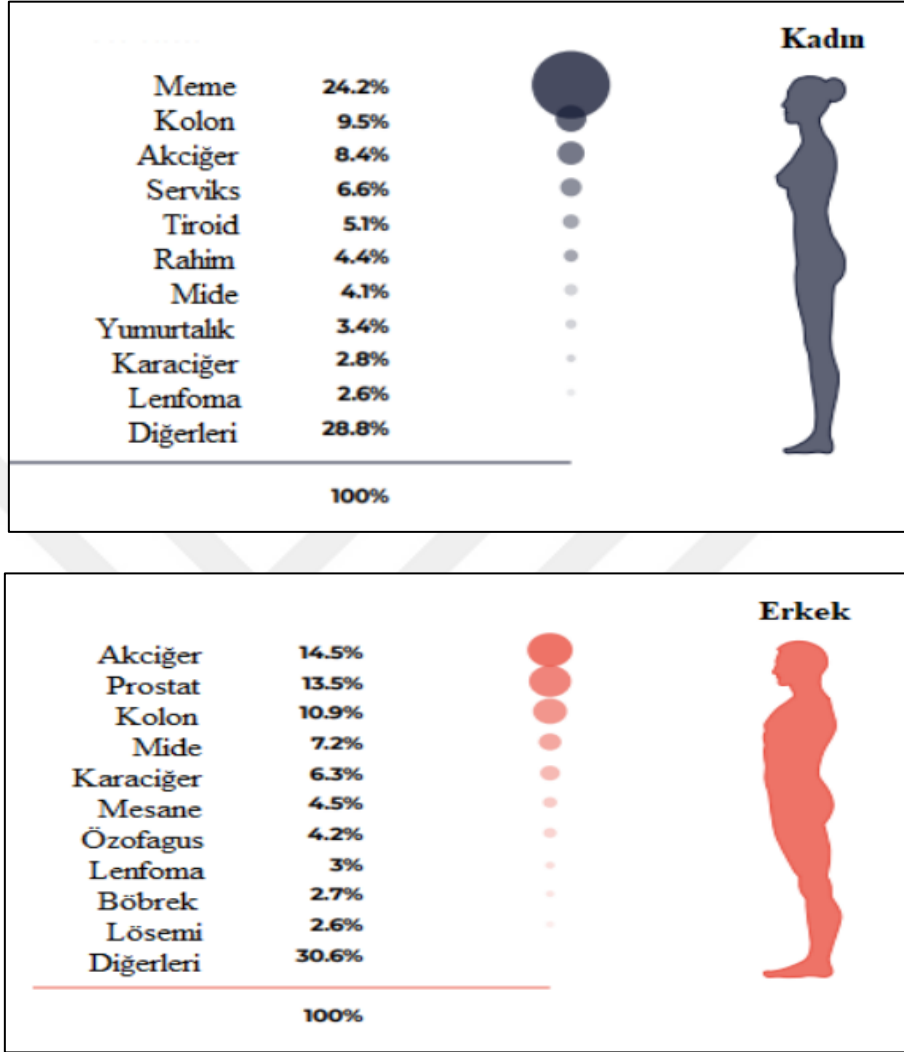


Şekil 2.4. Metastaz oluşum evreleri [60]

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2020 verilerine göre; 2040 yılında yaklaşık 30 milyon insanın kansere yakalanacağı ve her 6 kişiden birinin kanser nedeniyle yaşamını yitireceği rapor edilmiştir. 2018 verilerine göre; kadınlarda % 24,2'lik oranla meme kanseri ve % 9,5'luk oranla kolon kanseri ilk sıralarda yer alırken, erkeklerde meme kanseri % 1'lik oranla nadir görülmektedir ve kolon kanseri % 10,9'luk oranla üçüncü sırada yer almaktadır [61].

Dünya Sağlık Örgütü, kanser türlerinin üçte birinin çeşitli yollarla önlenebileceğini bildirmektedir. Kanser kontrolünde birincil koruma, en etkili strateji olmayı sürdürmektedir [62]. Kanserle mücadelenin en iyi yolu bilinen risk faktörlerinin farkında olarak bu risk faktörlerini kontrol altına alarak kanserin metastazını önlemektir. Bilinen ve değiştirilemeyen risk faktörleri arasında ilerleyen yaş, kadın cinsiyet ve ailesel öykü yer almaktadır. Bu risk faktörlerinden ailesel öyküye sahip bireylerin sağlıklı yaşam tarzları geliştirmeleri ve düzenli

tarama davranışları edinmeleriyle, kanser gelişiminin önlenmesi ya da erken tanı ve tedavi ile mümkün olabilmektedir [63].

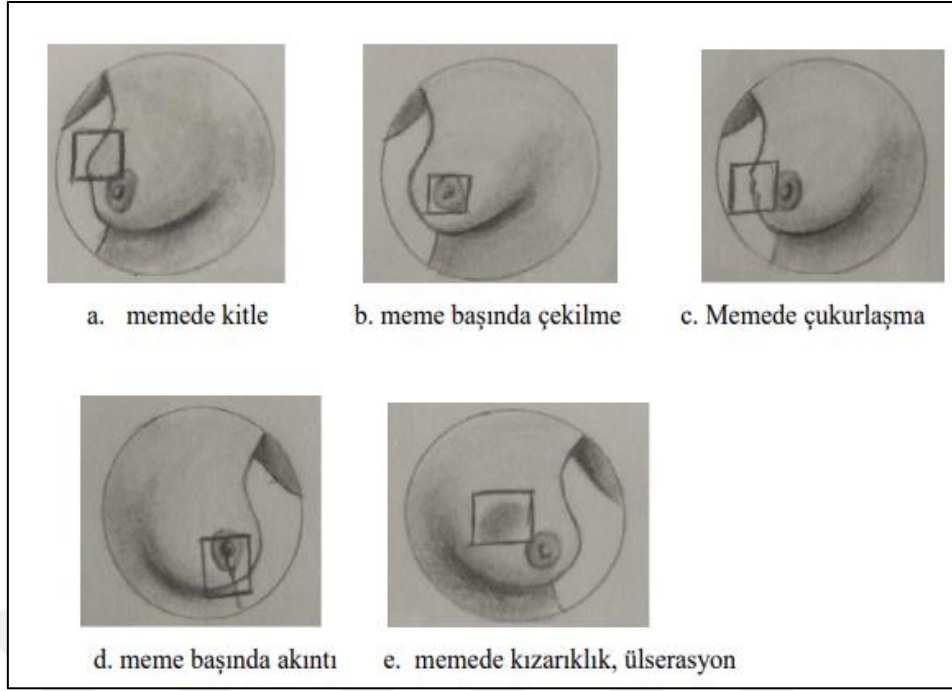


Şekil 2.5. Dünyada kadınlara ve erkelere ait 2020 yılı kanser istatistikleri [61]

### 2.3.1. Meme kanseri

Dünyada, kadınlarda kanser nedenli ölümlerin başında gelen meme kanseri, kadınlarda en sık görülen ve önemli sağlık problemlerine yol açan ilerleyici bir hastalıktır.

Meme kanseri dünyada akciğer kanserinden sonra %11.9 oranla en çok tanı konulan kanser türüdür ve kadınlarda tanılanma sıklığı (her yıl 1.7 milyon) olarak birinci sırada yer almaktadır. Meme kanserinin tam anlamıyla nedeni bilinmemektedir. Genetik, özellikle hormonal, çevresel, psikolojik ya da biyokimyasal faktörlerin gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir [64].



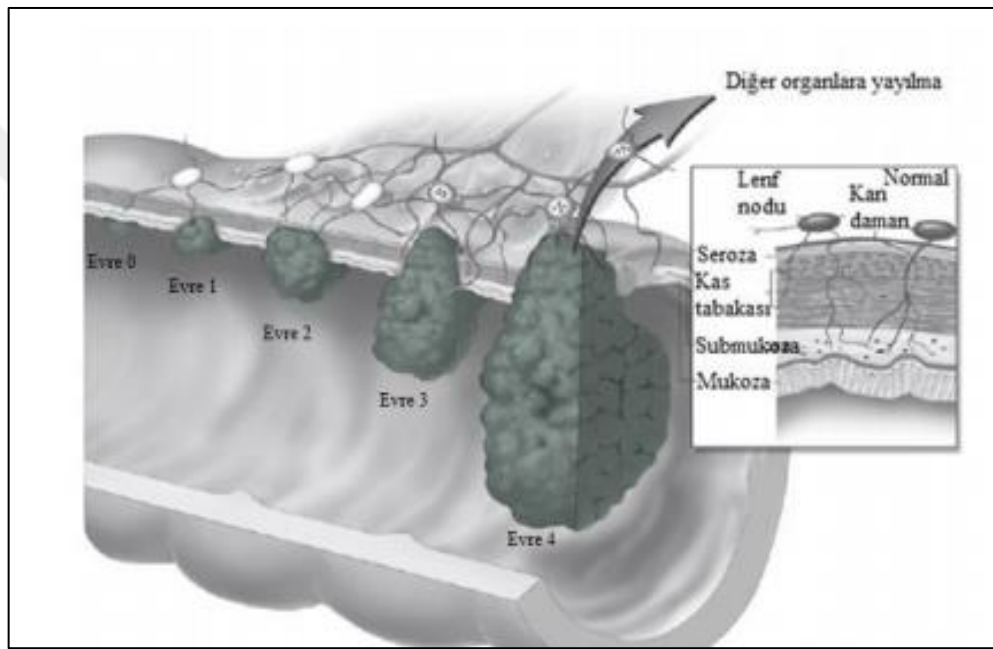
**Şekil 2.6.** Meme kanserinin belirtileri [64]

Bir meme kanseri hücre hattı olan ve MCF-7 olarak adlandırılan kanser hücreleri ilk defa 1970 yılında keşfedilmiştir. 69 yaşında invaziv duktal karsinomalı bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Michigan Kanser Vakfı -7'nin kısaltması yapılarak MCF-7 ismi verilmiştir. Morfolojisi epitelyaldir. İnsülin benzeri çoğalma faktörü bağlanma proteinlerini sentezleyebilmektedir. Meme kanseri ve diğer birçok kanserin oluşumunda, hücre döngüsü kontrol noktalarından olan siklin D1'de oluşan mutasyonlar, aynı şekilde MCF-7 kanser hücre hattında da görülmektedir. MCF-7 kanser hücre hattında kaspaz 6, 7 ve 9 ve BCL-2 ekspresyonu oldukça etkili olduğu saptanmıştır ayrıca p53 ve p21 genlerinin ekspresyonu ve düzenlenmesi normaldir. MCF-7 kanser hücre hattının çoğalmasında; aşırı artmış östrojen ekspresyonu ve östrojene bağlı proliferasyon, EGF'den bağımsız çoğalma, artmış Her-2/Neu/c-Erb-2 ekspresyonu artmış, N-ras ve Rb proteininin hızlı fosforilasyonu rol oynamaktadır [65].

### 2.3.2. Kolon kanseri

Kolon kanseri, en sık görülen gastrointestinal sistem kanseri olup, genetik faktörler, çevresel maruziyetler, diyet, sindirim sisteminin inflamatuvar durumları gibi etiyolojik nedenlere bağlı olarak gelişen bir multifaktöriyel bir kanser türüdür [66]. Kolon kanseri, ekonomik olarak "gelişmiş" popülasyonların bir hastalığıdır. Avrupa'da kolon kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen kanser türlerindedir. Bununla birlikte, kanser genç hastalarda da, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, kötü beslenme alışkanlıkları ve sigara içme gibi risk faktörleri

nedeniyle daha sık teşhis edilmektedir. Kolon kanseri, uzun yıllar boyunca kolonositlerin klonlarında meydana gelen düzensiz mutasyonların ve diğer genetik olayların birikmesinin bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Kolon adenokarsinom gelişimi, gastrointestinal özellikte epitelyal hücreler, spesifik onkogenler ve/veya tümör baskılayıcı genlerde sıralı genetik ve epigenetik mutasyonlar kazanarak kanser başlangıcına, ilerlemesine ve metastazına neden olmaktadır. Son zamanlarda, kolon kanserinin çok heterojen bir hastalık olduğuna ve tümörün moleküler ve genetik özelliklerinin prognozu ve hedefe yönelik tedaviye yanıt verdiğine dair daha fazla kanıt bulunmaktadır [67].



Şekil 2.7. Kolon kanseri oluşumu [68]

HT-29 hücre hattı 1964 yılında, kolorektal adenokarsinoması olan 44 yaşındaki beyaz bir kadının primer tümöründen oluşturulmuştur. HT-29, epitelyum morfolojisi ile insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattıdır. Kolorektal kanser için ksenograft tümör modeli olmaya ilaveten, HT-29 hücre dizisi, bağırsak hücreleri tarafından emilim, transport ve sekresyonu çalışmak için *in vitro* model olarak da kullanılmaktadır. Standart kültür koşulları altında, bu hücreler polarize olmamış, farklılaştırılmamış çoklu tabaka olarak büyürler. Kültür koşullarının değiştirilmesi veya hücrelerin çeşitli indükleyici ile muamelesi, farklılaşmış ve polarize olmuş morfoloji ile sonuçlanır [69].

Epitelyal kökenli, plastik yüzeye tutunan hücrelerdir. Kalın bağırsakta oluşan adenokarsinomlardan izole edilmiştir. D.L. Dexter tarafından ilk olarak 1977'de izole



edilmiştir. DLD-1 hücreleri önemli bir tümör baskılayıcı olan p53 antijen ifadesi açısından pozitifdir. Ancak aminoasit dizisini 241. pozisyonunda değişikliğe neden olan bir nokta mutasyonu içermektedir [70].

### 2.3.3. Kanser ve sitotoksosite

Sitotoksosite, aktif maddelerin kanser hücreleri üzerindeki toksik etki oranını ifade etmektedir. Sitotoksik ajanlar, çok sayıda kanser türü için tercih edilen tedavi şekli olmaya devam etmektedir. Antikanser bileşiklerinin potansiyelini değerlendirmek için sitotoksosite deneylerinde, en düşük sitotoksik konsantrasyon araştırılmaktadır. Sitotoksik ilaçlar, hücrelerin çoğalmasından sorumlu hücre içi sinyal molekülleri, membran reseptörleri ve kinazların işlevine müdahale etmekte, hücre ölümünü indüklemeden önce hücre büyümesini ve bölünmesini engellemektedir. Kültürlenmiş hücrelerle *in vitro* hücre canlılığı ve sitotoksosite deneyleri, kimyasalların sitotoksosite testleri ve ilaç taraması için yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu testlerin uygulanması son yıllarda artan bir ilgi göstermektedir. İlaç geliştirme sırasında kullanılan maddelerin toksisite ve tümör hücresi büyüme inhibisyonunu değerlendirmek için onkolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [71].

Bu bilgiler doğrultusunda; çalışmamızda MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) kanser hücre hatlarının tedavilerinde bir anti-kanser ajan olabileceği düşünülen gıda takviyesi olarak kullanılan apilarnil ve ana arı larvası liyofilizatlarının etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar

- Santrifüj (Hettich, ALMANYA)
- Vorteks (IKA, ALMANYA)
- Laminar akışlı kabin (Thermo Scientific, ABD)
- İnkübatör (Mettler, ALMANYA)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific, ABD)
- Işık mikroskobu (Olympus, JAPONYA)
- Invert mikroskop (Leica, ALMANYA)
- ELISA cihazı (Thermo Scientific, ABD)
- -80 °C Buzdolabı (Thermo Scientific, ABD)
- Buzdolabı (- 20 °C , + 4 °C) Arçelik, TÜRKİYE)
- Hassas terazi (Shimadzu, JAPONYA)
- Thoma lamı (ISOLAB, ALMANYA)
- Pipetör (Thermo Scientific, ABD)
- Mikro pipetler (Thermo Scientific, ABD)

##### 3.1.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler

Hücre kültürü çalışmamızda kullanılan kimyasal malzemeler ve kullanım amaçları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal adı	Marka	Kullanım Amacı
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Medium)	Sigma	Hücre besiyeri
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma	Hücre besiyeri
McCOY 5A Medium	Capricorn Scientific	Hücre besiyeri
Penisilin/streptomisin	Gibco	Hücre besiyeri içerisinde komplikasyon gerçekleşmemesi
FBS (Fetal Bovine Serum)	PAN Biotech	Hücre besiyeri serumu
Sodyum Bikarbonat	Sigma	Hücre besiyeri için tampon
Sodyum Pirüvat	Gibco	Hücre besiyerine ek enerji kaynağı
DMSO ( <i>Dimethyl sulfoxide</i> )	Honeywell	Bileşiklerin dilüe edilmesinde ve MTT ürünlerinin indirgenmesinde
Trypan Blue	Sigma	Hücrelerin canlılık ve sayım işlemlerinde
Tripsin-EDTA	Sigma	Hücre pasajlanması
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Sigma	Hücrelerin yıkanması

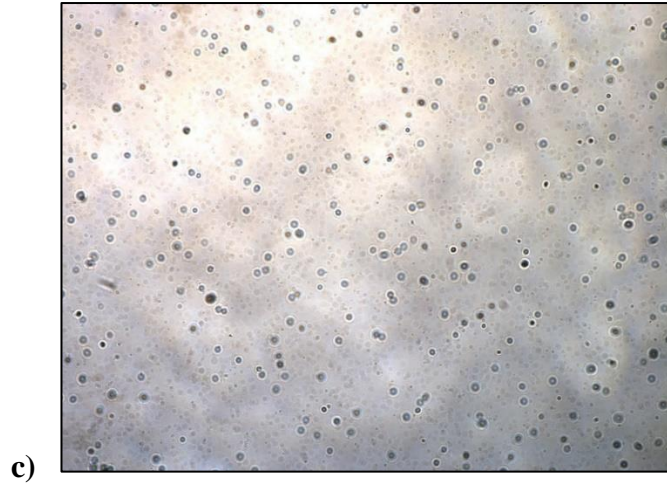
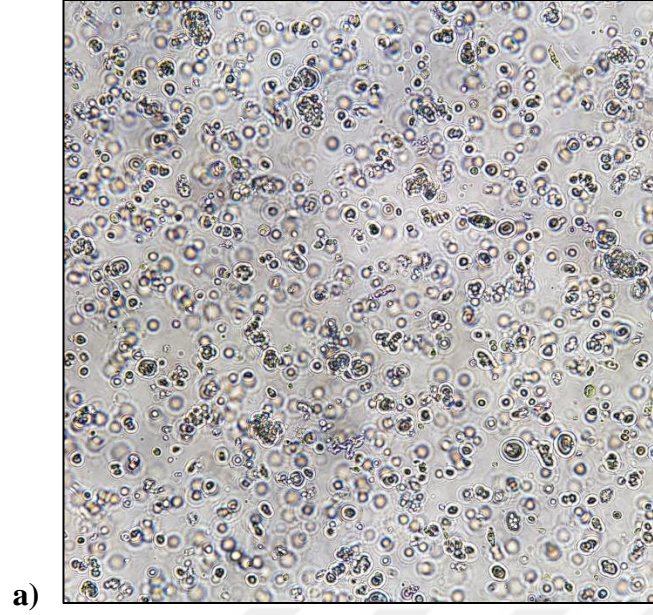
### 3.1.3. Test maddeleri

Tez çalışmasında kullanılan apilarnil ve ana arı larvası liyofilizati; Harşena Bal ve Apiterapi Ürünleri firmasından taze olarak temin edilmiştir.

**Resim 3.1.** Tez çalışmasında kullanılan liyofilize apilarnil ve ana arı larvası

### 3.1.4. Kanser hücre hatları

Tez çalışmasında MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoması) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoması) kanser hücre hatları üzerine deneysel çalışma yapılmıştır (Resim 3.2).



**Resim 3.2.** Tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarının görüntüleri a) MCF-7, b) HT-29, c) DLD-1

### 3.2. Metod

#### 3.2.1. Hücre besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması

**Tablo 3.2.** Hücre besiyerleri

Kanser Hücre Hatları	Besiyerleri	Serumlar
MCF-7	RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)	FBS (Fetal Bovine Serum)
HT-29	McCOY 5A Medium	FBS (Fetal Bovine Serum)
DLD-1	DMEM (Dulbecco's Modified Edagle Medium)	FBS (Fetal Bovine Serum)

- RPMI (1X)

250 mL RPMI için, 0,5 g NaHCO<sub>3</sub> kullanılarak besiyeri içerisinde çözülmüştür. pH 7,3-7,5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0,20 µm filtre ile steril edilmiştir ve +4°C'de saklanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan 250 mL 1 X RPMI miktarı aşağıda belirtilmiştir.

İçerik	Miktar
1 X RPMI	223 mL
%10 FBS	25 mL
Penisilin/streptomisin	2,5 mL

- McCOY (1X)

Deneysel çalışmalarda kullanılan 250 mL 1 X McCOY miktarı aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır ve +4°C'de saklanmıştır.

İçerik	Miktar
1 X McCOY	223 mL
%10 FBS	25 mL
Penisilin/streptomisin	2,5 mL

- DMEM (1X)

Deneysel çalışmalarda kullanılan 250 mL 1 X DMEM miktarı aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır ve +4°C'de saklanmıştır.

İçerik	Miktar
1 X DMEM	223 mL
%10 FBS	25 mL
Penisilin/streptomisin	2,5 mL
Sodyum Pürivat	2,5 mL

### 3.2.2. Hücre kültür ortamı

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin *in vitro* ortamda yaşayıp, çoğalabilmeleri gerekli besiyeri maddeleri ve uygun ortam sağlanmalıdır. Besiyeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine göre farklılık göstermektedir. Çalışmamızda üç farklı kanser hücre hattı için üç farklı besiyeri (RPMI, McCOY, DMEM) kullanıldı. 37°C , %95 nemli ortamda ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde tutulan hücrelerin besiyerleri haftada iki defa değiştirilerek hücrelerin gelişimi izlendi.

### 3.2.3. Hücrelerin dondurulması

Hücre besiyerinden ölen hücreleri arındırılmak için PBS (phosphate buffer saline) ile dikkatlice yıkandı. Hücrelerin üzerine 2 mL tripsin-EDTA eklendi ve inkübatörde 5-7 dakika bekletildi. Tripsin-EDTA miktarının en az 2 katı kadar besiyeri eklenerek falcon tüpüne aktarıldı. Hücre süspansiyonu 1000 rpm'da 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. % 45 FBS, % 45 Medium ve %10 DMSO' dan (1,8 mL cryotüp için) oluşan dondurma protokolü hazırlandı. Cryotüpler ilk olarak 24 saat -20°C'de bekletildi aşamalı şekilde dondurma işlemi gerçekleştirmek amacıyla ikinci 24 saatte -80°C'ye bırakıldı. Cryotüplerin bir kısmı 24 saat sonrasında -80°C'den alınarak -196°C sıvı azot tankına transfer edildi.

### 3.2.4. Hücrelerin çözülmesi

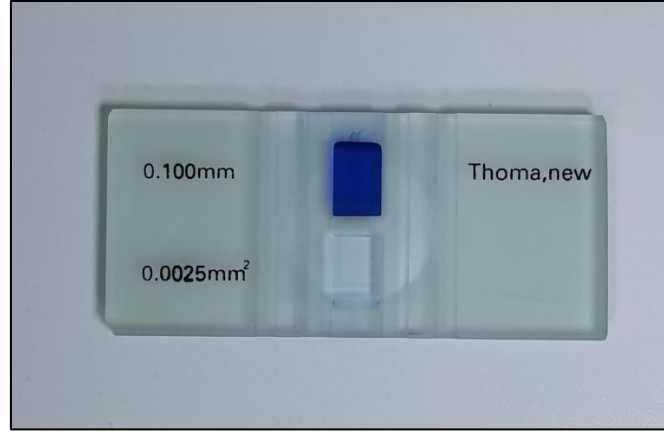
-80°C 'den alınan hücreler kademeli çözüldürmek için öncelikle - 20°C'de yarım saat bekledi sonrasında hücreler oda ısısında bekletilerek çözünmesi sağlandı. 25 cm<sup>2</sup>'lik flask içerisine en az 5 mL olmak üzere besiyeri bırakıldı ve flask üzerine kanser hücre hattının ismi, besiyeri, pasaj numarası ve tarih yazıldı. Hücreler çözüldükten sonra içerisinde 3 mL besiyer bulunan falkon tüpe alındı. Falkon tüpü 10.000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilip hücrelerin falkon tüpünde dibe çökmesi sağlandı. Üst kısmında bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve üzerine besiyeri konularak pelletin çözünmesi sağlandı ve hazırlanan flaska hücre ekimi yapıldı. Invert mikroskopta flasktaki hücrelerin kontrolü yapıldı Hücrelerin yapışması için 24 saat inkübatöre bırakıldı ve 24 saat sonrasında besiyeri değiştirilerek invert mikroskop altında incelendi. Konfluent olana kadar kanser hücrelerinin haftada 2 gün besiyerleri değiştirildi ve konfluent olduğunda pasajlama işlemi yapıldı.

### 3.2.5. Hücrelerin pasajlanması

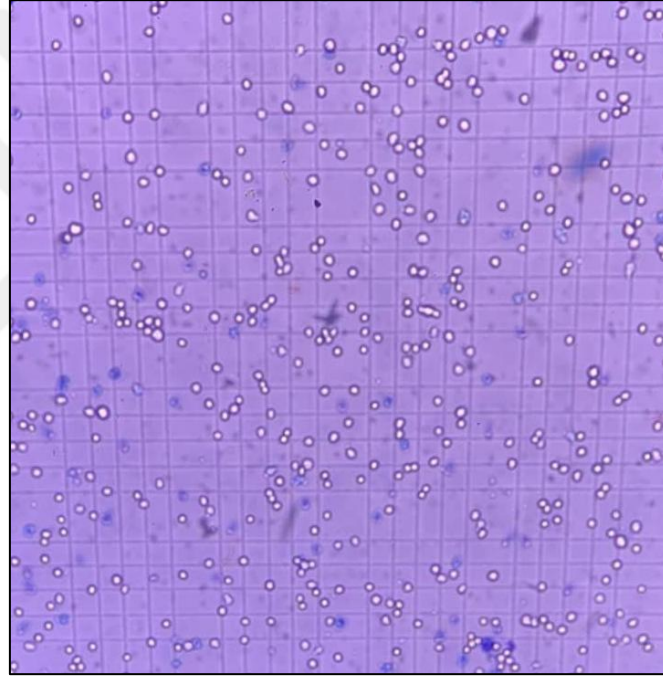
Hücre besiyerinden ölen hücreleri arındırılmak için PBS (phosphate buffer saline) ile dikkatlice yıkandı. Hücreler konfluent olduğunda hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için 25 cm<sup>2</sup> flasklara 2 ml tripsin-EDTA eklendi. Tripsin-EDTA sıcaklık arttıkça daha etkili çalıştığı için 5-7 dakika inkübatörde bekletildi ve böylece flaskın yüzeyine yapışan hücrelerin daha çabuk yüzeyden kaldırılması sağlanmış oldu. Tripsin-EDTA hücre kültür ortamında uzun süre kaldığında hücrelerin membranına zarar vermeye başlamaktadır bu sebeple hücrelerin üzerine eklenen tripsin-EDTA etkisini azaltmak için kullanılan kanser hücre hattının besiyeri eklenerek seyreltme işlemi yapıldı. Hücreler falkon tüpüne alınarak 10.000 rpm'de 5 dakika süresince santrifüj edilip hücrelerin falkon tüpünde dibe çökmesi sağlandı. Üst kısmında bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve üzerine besiyeri konularak pelletin çözünmesi sağlandı. Hazırlanan hücrelerin sayımı yapılarak hücre ihtiyacına göre yoğunluk belirlendikten sonra belirlenen ölçüde flasklara hücrelerin ekimi yapıldı. Flaskların üzerine hücre hattının ismi, besiyeri, pasaj numarası ve tarih yazıldıktan sonra flasklar 37°C 'de, % 95 nemli ortamda ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırıldı. Kanser hücrelerinin ekiminin ertesi günü hücreler invert mikroskop altında incelendi. Flask yüzeyine yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla besiyeri değiştirme işlemi uygulandı. MTT çalışması için yeterli hücre sayısına ulaşana kadar bu işlemler sürekli olarak devam ettirildi. Deneysel çalışmanın tamamı MCF-7 kanser hücre hattında pasaj 25-36'ya; HT-29 kanser hücre hattında pasaj 19-25'e; DLD-1 kanser hücre hattında pasaj 12-22'ye kadar olan sürede gerçekleştirildi.

### 3.2.6. Hücrelerin sayımı

Pasajlama protokolü uygulanarak falkon tüpüne alınan hücreler 10.000 rpm'de beş dakika boyunca santrifüj edildi ve üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet halindeki hücreler taze besiyeri ile süspanse edildi daha sonra süspanse olmuş hücreden 10 µL alınarak 0,5 mL tüpte üzerine 10 µL Trypane blue boyası eklenerek pipetaj yapıldı. Boya ile muamele edilen süspansiyondan 10 µL alınarak thoma lamına dikkatlice yayıldı. Thoma lamında sayım, 0.1 mm<sup>3</sup> alanda yapılan sayımı mL başına düşen hücre sayısı prensibine dayanır. Thoma lamında çukur bir kısım vardır ve buraya lamel konulduğunda çukurda 0.1 mm yüksekliğinde sıvı kalır. Bu lamda büyük ve küçük olmak üzere toplam 400 kare vardır. Thoma lamının alt ve üst kısmında bulunan toplam 16 karedeki hücreler mikroskop altında sayıldı. Her karede sayılan hücre sayısı toplandı ve bulunan toplam  $2 \times 10^4$  formülü kullanılarak flaskta bulunan toplam hücre sayısı belirlendi.



**Resim 3.3.** Thoma lamı



**Resim 3.4.** Thoma lamından hücre sayımı

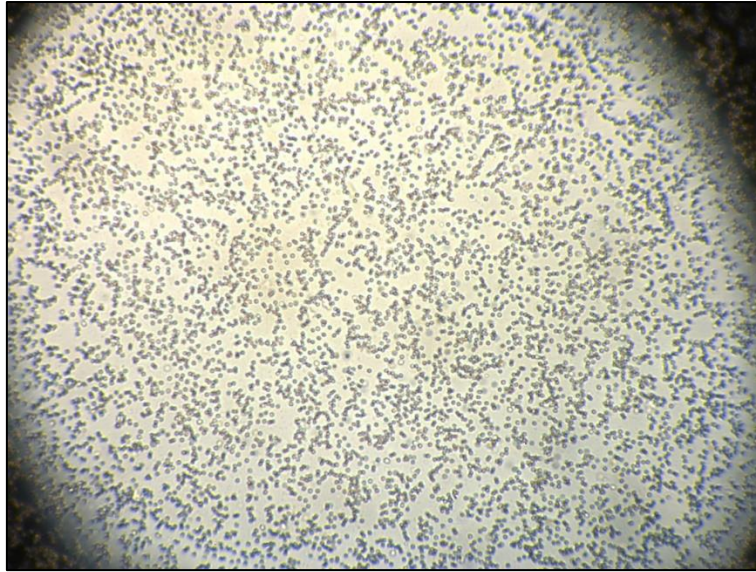
### **3.2.7. Hücrelerin platalere ekimi**

96 kuyucuklu platalere her kuyucuğa hesaplanan şekilde hücre gelecek şekilde multipipet yardımıyla hücrelerin platalere ekim işlemi (Her kuyucuk için 100  $\mu$ l) gerçekleştirildi. Ekilen hücrelerin plate yüzeyine yapışması için 24 saat süre ile inkübatörde bekletildi ve MTT assay için kullanacağımız hücreler deneye hazır hale getirildi.





**Resim 3.5.** MCF-7, HT-29 ve DLD-1 kanser hücre hatlarının 96'lı plate içine ekimi



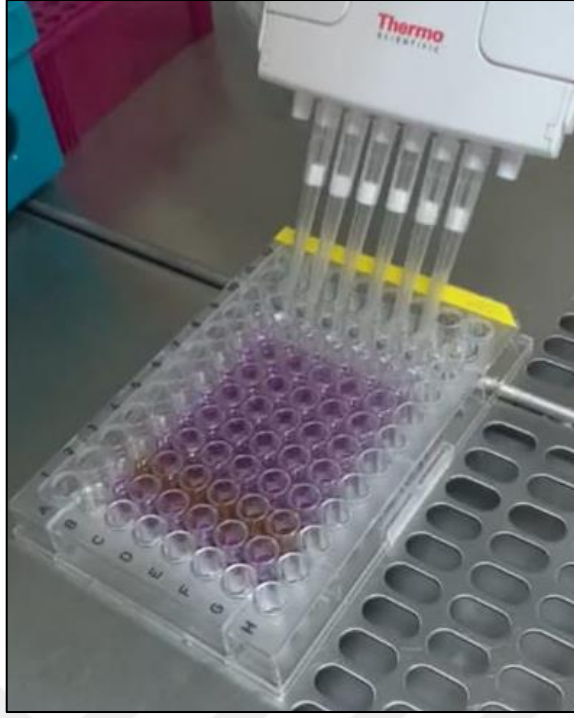
**Resim 3.6.** 96'lı plate kuyusuna ait HT-29 kanser hücre hattının görüntüsü

### 3.2.8. Test maddelerinin plate içerisine ekimi

Deneysel çalışmada kullanılan liyofilize apilarnil ve ana arı larvasının her biri distile suda çözülerek 1 mg/1 ml (1000 ppm) ana stok hazırlandı. Çalışılacak diğer konsantrasyonlar (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 ve 1,56 ppm) 1000 ppm ana stok konsantrasyonunun seri dilusyonları ile hazırlandı. Kanser hücrelerin üzerine hazırlanan 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 ve 1,56 ppm konsantrasyonlarındaki apilarnil ve ana arı larvası bileşiklerimiz üç tekrarlı olacak şekilde plate içerisine eklendi. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve 1/1000 DMSO konsantrasyonları da üç tekrarlı olarak plate içerisine eklendi ve 24 saat inkübatöre bırakıldı.

### 3.2.9. MTT solüsyonunun hazırlanması ve plate içerisine ekim

MTT boyası, hücre canlılığını tespit etmek için kullanılır. MTT boyası, tetrazolyum tuzlarının formozan kristallere dönüşümüdür ve formozan kristalleri ışıktan etkilenen bir madde olması nedeniyle karanlık ortamda 1 plate için 5 mg MTT tartıldı ve 1 mL PBS (phosphate buffer saline) ve üzerine 8 mL besiyeri eklenerek vorteks yardımı ile karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Hazırlanan solüsyon plâtelere ekildi ve plâtelere alüminyum folyo ile kaplanarak 2-4 saat inkübatörde bekletildi. Süre sonunda MTT solüsyonu aspire edildi ve her kuyucuğa reaksiyonu durdurmak için 100 µL DMSO (% 100) eklendi.



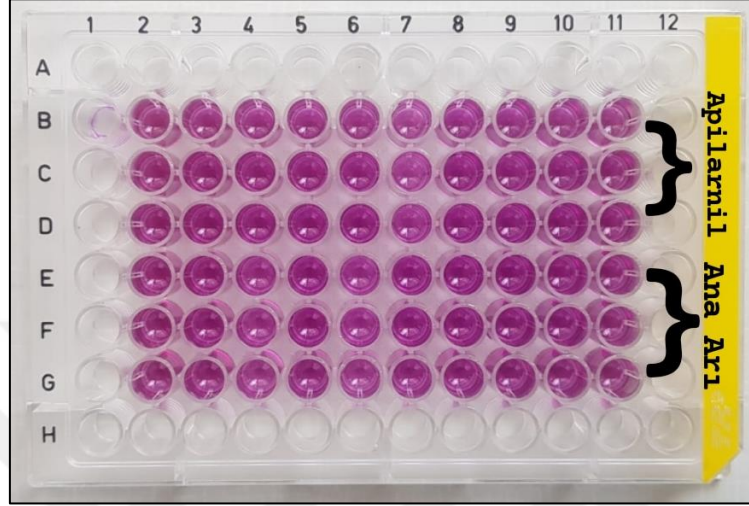
**Resim 3.7.** Reaksiyonu durdurmak için DMSO eklenmesi

Plate karanlıkta 10 dakika beklendikten sonra spektrofotometrik olarak 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okutuldu.

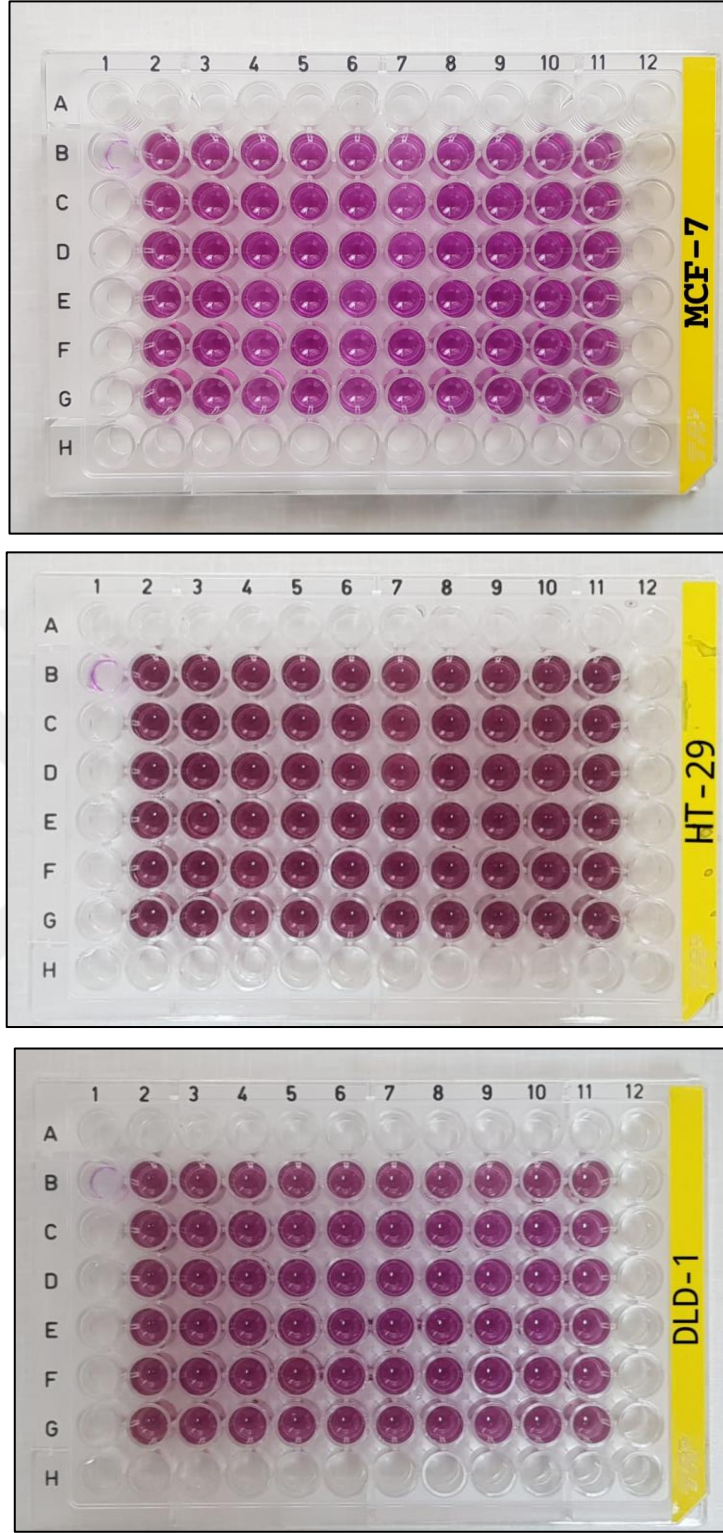


**Resim 3.8.** Plate'nin spektrofotometrede okutulması

Bu MTT denemeleri farklı günlerde tekrarlanarak apilarnilin ve ana arı larvası liyofilizati ile hazırlanan maddelerin MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) kanser hücre hatları üzerine sitotoksik etkilerinin olup olmadığı tespit edildi.



**Resim 3.9.** Test maddelerinin tek tekrarlı MTT çalışması



**Resim 3.10** MCF-7, HT-29 VE DLD-1 tek tekrarlı MTT çalışması

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre anti-proliferasyon analizleri

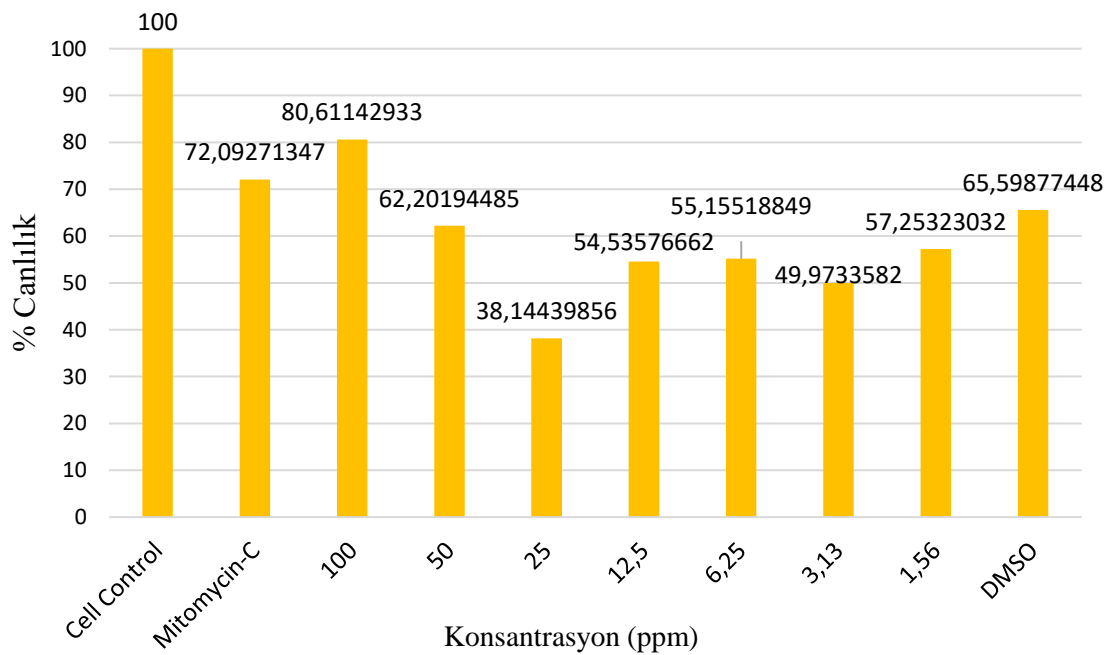
MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) hücre hatları üzerine, en etkin dozu belirleyebilmek amacıyla liyofilize apilarnil ve ana arı larvası distile suda çözülerek 1 mg/1 ml (1000 ppm) ana stok hazırlandı. MCF-7, HT-29 ve DLD-1 kanser hücre hatlarında, liyofilize apilarnil ve ana arı larvasının sitotoksik dozu spektrofotometrik olarak ölçme metotuna dayanan MTT yöntemiyle belirlendi. Microsoft Excel programı ile uygulanan doz miktarları ile % hücre canlılık eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon değeri (IC<sub>50</sub>) sütun grafiği ile hesaplandı. Anti-kanser bileşiği olan mitomycin C (100 mg/ml) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

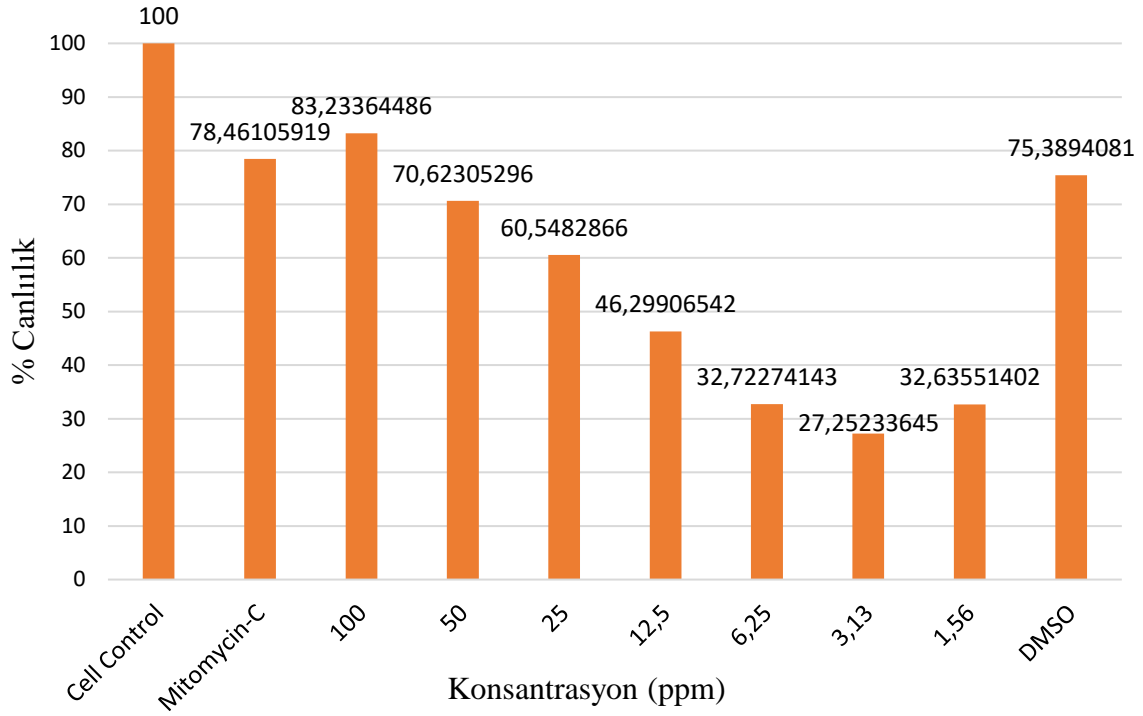
### 4.2. Liyofilize apilarnilin ve ana arı larvasının etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

MCF-7 (insan meme adenokarsinoma) hücre hattında; liyofilize apilarnilin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrol olarak kullanılan DMSO'ya göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 25 ppm konsantrasyonunda göstermiştir. MCF-7 hücre hattında liyofilize apilarnilin % canlılık aktiviteleri 80 ve 38 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.1) (Şekil 4.1) ve (Şekil 4.2). Liyofilize ana arı larvasının *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 3 ppm konsantrasyonda göstermiştir. MCF-7 hücre hattında liyofilize ana arı larvasının % canlılık aktiviteleri 83 ve 27 arasında belirlenmiştir. Bu nedenle liyofilize apilarnil ve ana arı larvasının MCF-7 hücre hattında antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (Tablo 4.1) (Şekil 4.1) ve (Şekil 4.2). Apilarnil ve ana arı larvasının arasında karşılaştırma yapıldığında; apilarnilin canlılık aktivitesi %56,83 iken, ana arı larvasının canlılık aktivitesi %50,47 olarak tespit edilmiştir. Ana arı larvasının apilarnile oranla MCF-7 hücre hattında daha etkili sitotoksik aktiviteye sahiptir. Apilarnil ve ana arı larvasının arasındaki en büyük farklılık ana arının saf arı sütü ile beslenmesi sebebiyle içeriğindeki total protein miktarından kaynaklanmaktadır.

**Tablo 4.1.** Apilarnil ve ana arı larvasının MCF-7 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

MCF-7 Kanser Hücre Hattı	Apilarnil	Ana Arı Larvası
Cell Control	1,5014	1,605
Mitomycin-C	1,0824	1,2593
100 ppm	1,2103	1,3359
50 ppm	0,9339	1,1335
25 ppm	0,5727	0,9718
12,5 ppm	0,8188	0,7431
6,25 ppm	0,8281	0,5252
3,13 ppm	0,7503	0,4374
1,56 ppm	0,8596	0,5238
DMSO	0,9849	1,21
% Aktivite	56,83	50,47

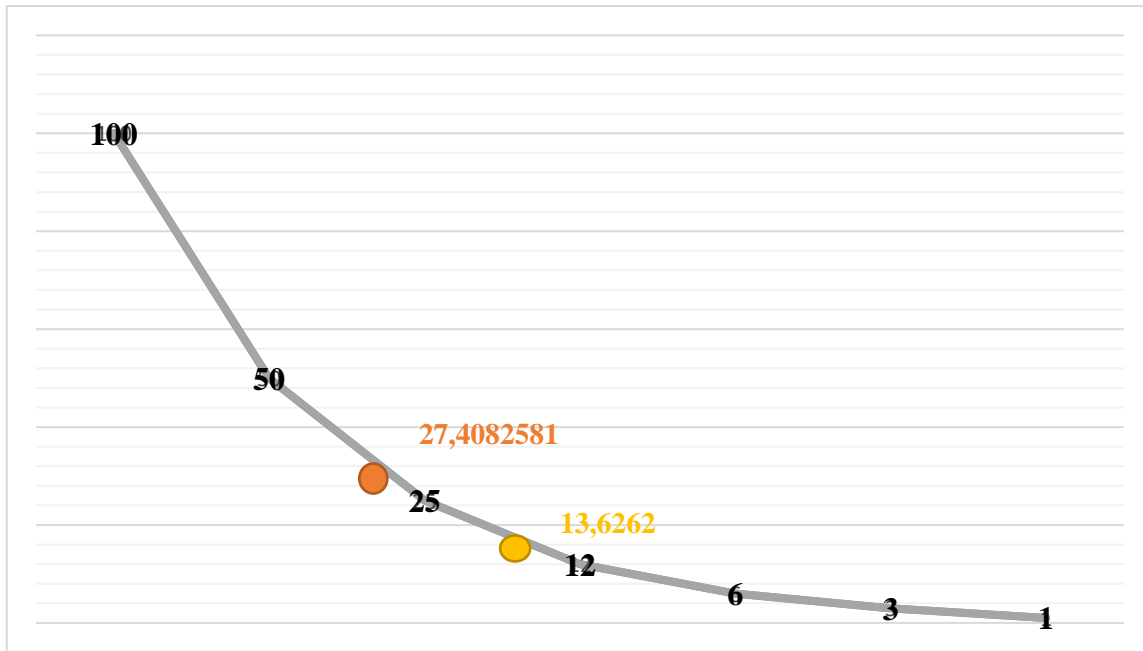
**Şekil 4.1.** Apilarnilin MCF-7 kanser hücre hattında MTT analizi



**Şekil 4.2.** Ana arı larvasının MCF-7 kanser hücre hattında MTT analizi

MTT yöntemi ile hücre yoğunluğu üzerindeki apilarnil ve ana arı larvasının olası etkisi spektrofotometre ile okutularak Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz miktarları ile % canlılık eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon değeri ( $IC_{50}$ ) sütun grafiği ile hesaplandı ve logaritmik eğim çizgisi çizildi. Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon ( $IC_{50}$ ) değeri apilarnilde 13 ppm, ana arı larvasında 27 ppm olarak belirlendi.



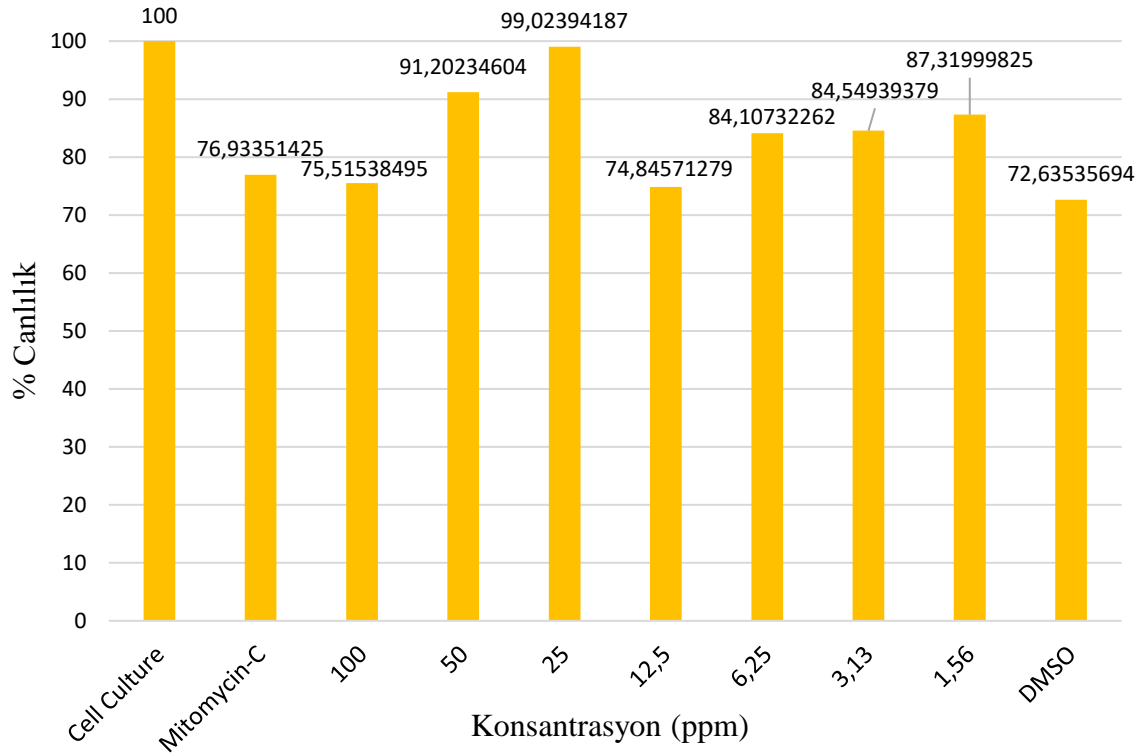


Şekil 4.3. Apilarnil ve ana arı larvasının MCF-7 hücre hattında MTT analizleri

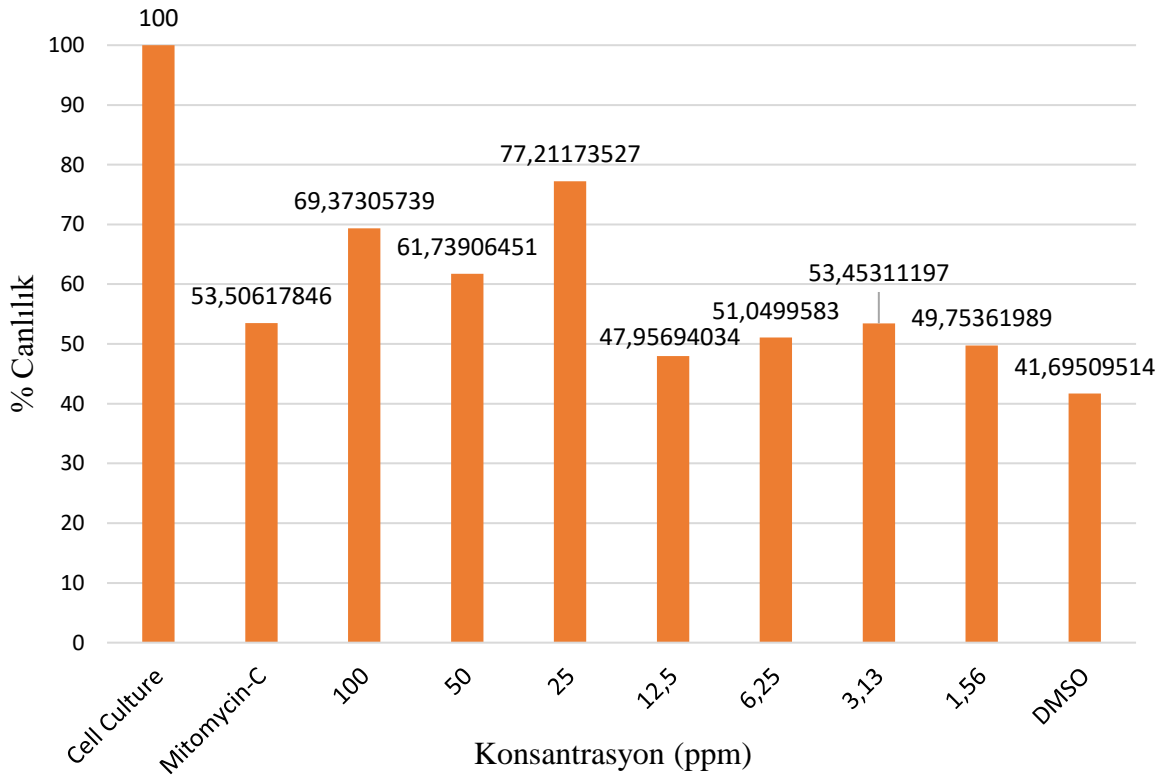
HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) hücre hattında; liyofilize apilarnil ve ana arı larvasının *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4.2) (Şekil 4.4) ve (Şekil 4.5).

Tablo 4.2. Apilarnil ve ana arı larvasının HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

HT-29 Kanser Hücre Hattı	Apilarnil	Ana Arı Larvası
Cell Culture	2,2847	1,3191
Mitomycin-C	1,7577	0,7058
100 ppm	1,7253	0,9151
50 ppm	2,0837	0,8144
25 ppm	2,2624	1,0185
12,5 ppm	1,7100	0,6326
6,25 ppm	1,9216	0,6734
3,13 ppm	1,9317	0,7051
1,56 ppm	1,9950	0,6563
DMSO	1,6595	0,5500



Şekil 4.4. Apilarnil'in HT-29 kanser hücre hattında MTT analizi

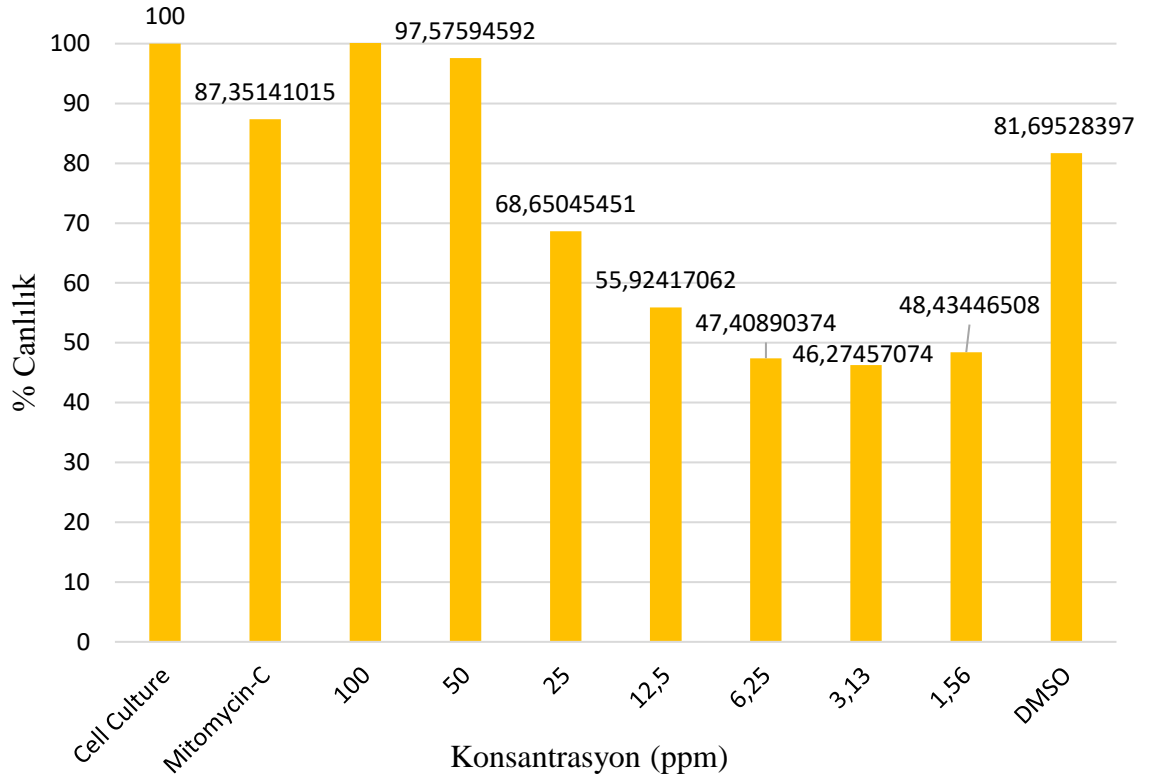


Şekil 4.5. Ana arı larvasının HT-29 kanser hücre hattında MTT analizi

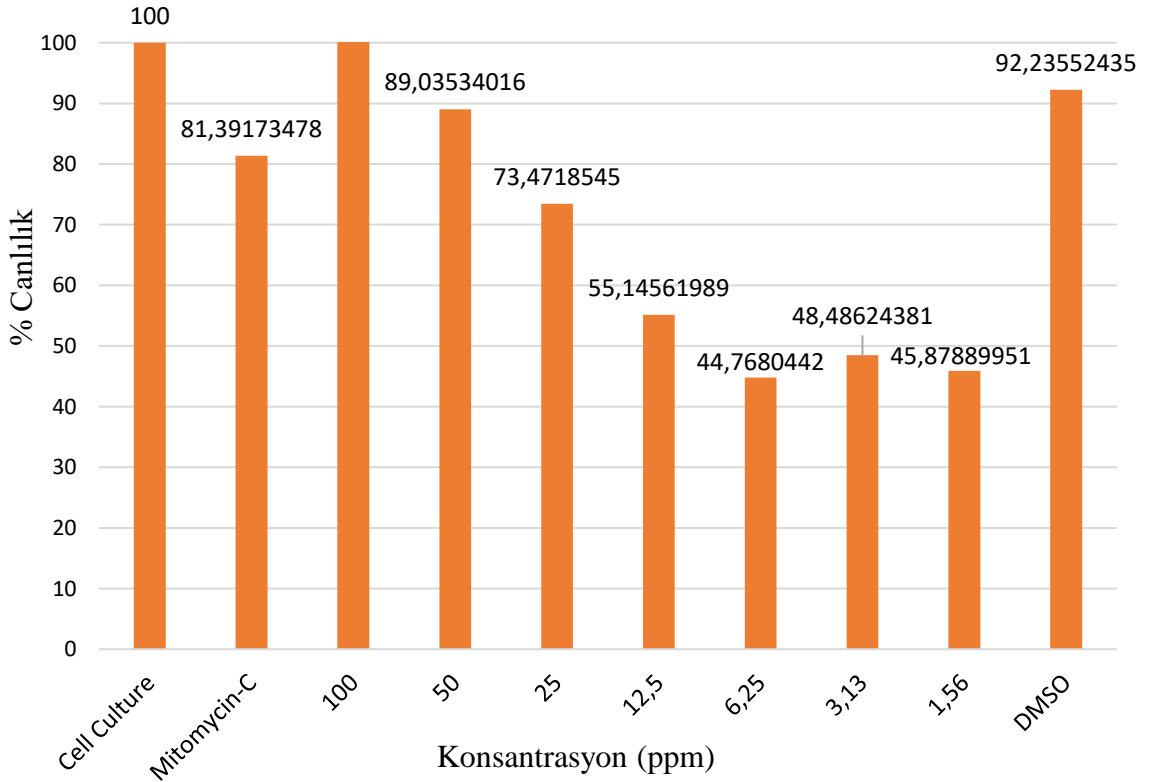
DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) hücre hattında; liyofilize apilarnilin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrol ile karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 3 ppm konsantrasyonunda göstermiştir. DLD-1 hücre hattında apilarnilin % canlılık aktiviteleri 97 ve 46 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.3) (Şekil 4.6) ve (Şekil 4.7). Liyofilize ana arı larvasının *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 6 ppm konsantrasyonda göstermiştir. DLD-1 hücre hattında liyofilize ana arı larvasının % canlılık aktiviteleri 89 ve 44 arasında belirlenmiştir. Bu nedenle liyofilize apilarnil ve ana arı larvasının DLD-1 hücre hattında antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (Tablo 4.3) (Şekil 4.6) ve (Şekil 4.7). Apilarnil ve ana arı larvasının arasında karşılaştırma yapıldığında; apilarnilin canlılık aktivitesi % 73,83 iken, ana arı larvasının canlılık aktivitesi % 65,4040 olarak tespit edilmiştir. Ana arı larvasının apilarnile oranla DLD-1 hücre hattında daha etkili sitotoksik aktiviteye sahiptir. %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değeri apilarnilde 5,1 ppm, ana arı larvasında 5,4 ppm olarak belirlendi.

**Tablo 4.3.** Apilarnil ve ana arı larvasının DLD-1 hücre hattında MTT absorban ölçümleri

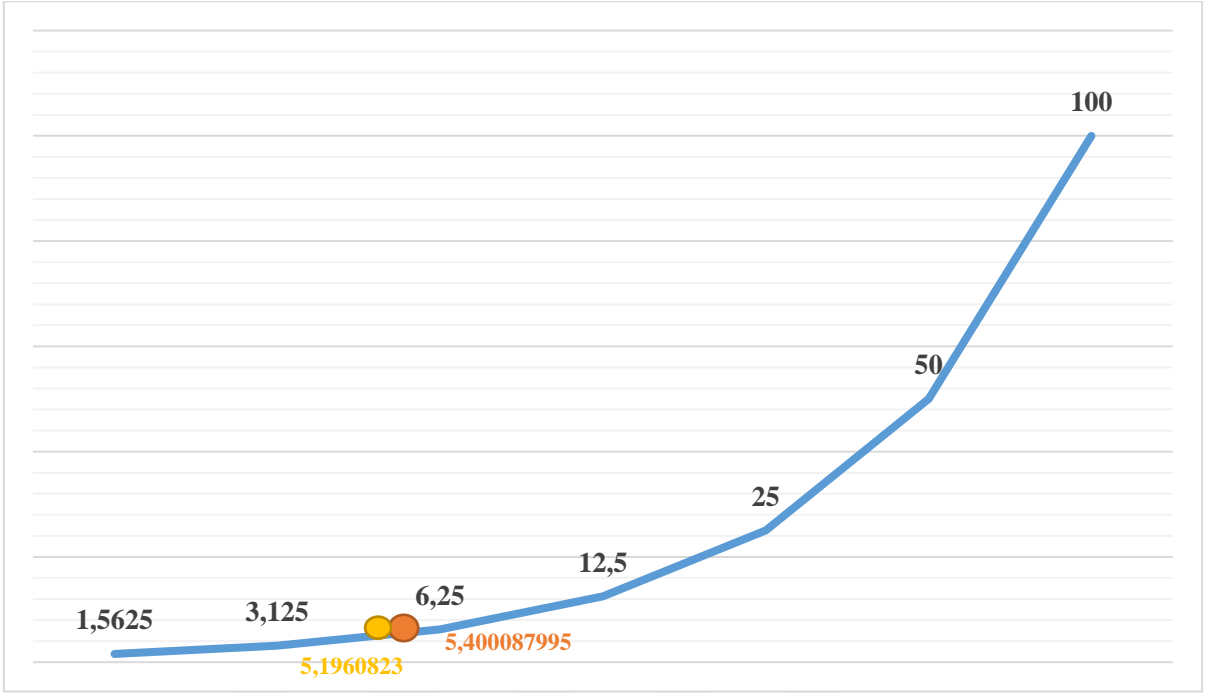
DLD-1 Hücre Hattı	Apilarnil	Ana Arı Larvası
Cell Culture	1,2871	1,7374
Mitomycin-C	1,1243	1,4141
100 ppm	1,3177	1,7555
50 ppm	1,2559	1,5469
25 ppm	0,8836	1,2765
12,5 ppm	0,7198	0,9581
6,25 ppm	0,6102	0,7778
3,13 ppm	0,5956	0,8424
1,56 ppm	0,6234	0,7971
DMSO	1,0515	1,6025
% Aktivite	70,8307	65,4040



Şekil 4.6. Apilarnilin DLD-1 kanser hücre hattında MTT analizi



Şekil 4.7. Ana arı larvasının DLD-1 kanser hücre hattında MTT analizi



Şekil 4.8. Apilarnil ve ana arı larvasının DLD-1 kanser hücre hattında IC<sub>50</sub> değerlerinin karşılaştırılması

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu deneysel çalışmamızın amacı, dünya genelinde en sık karşılaşılan kanser tipi olan kolon kanseri ve kadınlarda mortalitesi en yüksek kanser tipi olan meme kanserine karşı antikanser potansiyeli yüksek olabileceğini düşündüğümüz doğal bir ürün olan ve gıda takviyesi olarak kullanılan apilarnil ve ana arı larvasının etkilerini *in vitro* olarak araştırmaktır. Hücre kültürü, deney hayvanlarının kullanıldığı yöntemlere göre etik kurul zorunluluğu olmayan ve kullanılan maddenin etkisinin kısa sürede ve doğrudan test edilmesine olanak sağladığından dünya genelinde yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla, bu çalışmada *in vitro* çalışmalarla MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) kanser hücre hatları üzerine apilarnil ve ana arı larvasının MTT yöntemiyle sitotoksik ve antiproliferatif etkileri ortaya koyulmuştur.

Gıda takviyesi olarak kullanılan apilarnil ve ana arı larvası başta olmak üzere, çeşitli arı ürünleri ve çeşitli kanser türleri ile ilgili çalışmalara ait kapsamlı olarak literatür bilgileri aşağıda verilmiştir. Literatür araştırmasında birçok arı ürünü ile çalışmaların mevcut olduğu tespit edilmiştir. Doğal besin olan arı ürünleri ile birçok kanser hücresinde antikanser aktivite (antioksidan, sitotoksik, antitümör, antiproliferatif) çalışmaları yapılmıştır. Apiterapik ürünlerin kanser hücrelerine etkisi üzerine yapılan çalışmalar, araştırmacılar tarafından uzun yıllardır ön planda tutulmaktadır ve günümüzde önemi devam etmektedir.

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından üretilen GLOBOCAN 2020 kanser insidansı ve mortalite çalışmalarına göre kadın meme kanseri, tüm kanser vakalarının %11,7'sini temsil eden tahmini 2,3 milyon yeni vaka ile 2020'de küresel kanser insidansının önde gelen nedeni olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır. Meme kanseri için birincil önleme programları oluşturmak bir zorluk olmaya devam etmektedir bununla birlikte, vücut ağırlığını ve alkol tüketimini azaltmaya ve fiziksel aktiviteyi ve emzirmeyi teşvik etmeye yönelik çabalar, dünya çapında meme kanseri insidansını azaltmada etkili olmaya devam etmektedir. Nüfus çapında meme kanseri tarama programları, erken teşhis ve etkili tedavi yoluyla meme kanseri mortalitesini azaltmayı amaçlamaktadır. DSÖ, iyi kaynaklara sahip ortamlarda, 50 ila 69 yaşları arasındaki ortalama meme kanseri riski taşıyan kadınlar için her 2 yılda bir organize, nüfusa dayalı mamografi taraması yapılmasını önermektedir.

2020'de 1,9 milyondan fazla kolorektal kanser (anüs dahil) vakası görülmüştür ve 935.000 ölümün meydana geldiği tahmin edilmektedir ve yaklaşık 10 kanser vakasından ve kanser

kaynaklı ölümden birini temsil etmektedir. Genel olarak, kolorektal insidansı mortalite açısından ikinci sırada yer almaktadır.

Kanser, sosyoekonomik gelişmenin göstergesi olan bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler özellikle hayvan kaynaklı gıdaların alımının artması ve fiziksel aktivitenin azalması kanser prevalansının artmasına neden oluyor. Ek risk faktörleri arasında alkol tüketimi ve sigara kullanımı bulunurken, dengeli beslenme ve gıda takviyelerinin bir arada tüketimi riski azaltılmaktadır [72].

Velentzis ve arkadaşlarının 2011 yılı çalışmasında, hastaların %47,4'nün tanı öncesinde ve sonrasında gıda takviyesi kullanmakta olduğu, %25,0'inin hiçbir gıda takviyesi kullanmadığı saptanmıştır. Kanser tanısı alan hastaların %23,3'nün gıda takviyesi kullanım durumlarında değişiklik olmuş ve %10,3'ü gıda takviyesi almayı tanı ile keserken %15,3'ü tanı sonrası gıda takviyesi almaya başlamış olduğunu saptamışlardır [73].

Öztürk ve arkadaşları tarafından hastaların gıda takviyesi kullanımına ilişkin yaptıkları çalışmada hastaların %28,4'ünün gıda takviyesi kullandığı ve en yaygın kullanım amacının "tedaviye destek olmak" olduğu belirlenmiştir (%75,8). En fazla kullanılan gıda takviyesi omega 3 (%30,3) olup, gıda takviyesi kullanan ve kullanmayan hastalar yaş, eğitim, cinsiyet, tedavi türü ve metastaz varlığı açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Kanser, gıda takviyesi kullanımı için bir neden olmakla birlikte hastaların gıda takviyesi kullanım nedenleri; tedaviye destek, halsizlik, kan değeri düşüklüğü hücre yenileyici amaçlı, bulantı-kusma-tedaviye destek amaçlı olduğu belirlenmiştir [74].

Kurt ve arkadaşları tarafından meme kanserli hastalarda tamamlayıcı ve alternatif tedavi kullanımı çalışmasında 129 meme kanserli hasta alınmıştır. Çalışmaya katılan hastalara anket uygulanmış ve tamamlayıcı ve alternatif tedavi (TAT) kullanım sıklığı ve yöntemleri sorgulanmıştır. Çalışmaya katılan 129 kişiden 63'ünün (%48,8) kanser tanısı konduktan sonra en az bir çeşit TAT kullandığı tespit edilmiştir. TAT kullananlardan 62'sinin (%98,4) alternatif tedavi yöntemlerinden bitkileri tercih ettiği saptanmıştır. Bunlardan 17'sinin (%27) bitkisel yöntemler yanında hayvansal gıdalar tükettiği, bir hastanın (%1,6) bitkisel yöntemler ve hayvansal gıdalar ile birlikte akupunktur yöntemini de kullandığı, bir (%1,6) hastanın sadece hayvansal gıda tükettiği saptanmıştır. Tamamlayıcı ve alternatif tedavi kullanan 63 hastadan 19'unun (%30,1) tek başına veya bitkisel TAT'a ek olarak hayvansal gıdalar tükettiği ve en sık bal kullanıldığı, daha sonra arı sütü, arı poleni, kefir ve balık yağı kullanıldığı tespit edilmiştir [75].

Jaganathan ve arkadaşları insan kolorektal kanser hücreleri HT-29 ve HCT-15 üzerine yapılan çalışmalarında balın anti-proliferatif etkisini MTT deneyi kullanılarak incelenmiştir. Logaritmik olarak büyüyen kolon kanseri hücreleri, 48 saat boyunca seyreltilmiş farklı bal konsantrasyonları ile muamele edilmiştir ve hücre proliferasyonu, konsantrasyona ve kullanılan bal numunesinin türüne bağlı olarak önemli ölçüde inhibe ettiğini gözlemlemiştirler [76].

Münstedt ve arkadaşları tarafından tamoksifen veya aromataz inhibitörleri ile antihormonal tedavi gören meme kanserli hastalarda arı poleni ve balın kombine tüketilmesi diğer menopoz semptomlarını hafifletebildiği bulunmuştur [77].

Caner ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışma, kanser tedavisinde kullanılan Doksorubisin (DOX) ve Cisplatin (CDDP) ile birlikte uygulandığında perganın (arı ekmeği) MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini ve bu hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücrelerin çoğalması, farklı DOX ve CDDP konsantrasyonları ile birlikte 5 mg/mL perga uygulanarak belirlenmiştir. Perga, DOX ve CDDP'nin MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkisini önemli ölçüde baskılamıştır. DOX ve CDDP'li BB, ayrı ayrı anti-apoptotik Bcl-2 genini aşırı ifade ederken proapoptotik Bid genini bastırdı. Perga, 72 saat sonra bile MDA-MB-231 hücrelerinin göçünü %50 engellemiştir. Sonuç olarak perga, DOX ve CDDP'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki toksisitesini önemli ölçüde azalttığı ve kanser hücrelerinin göçünü engellediği kanıtlanmıştır [78].

Bu çalışma, propolis, bal ve perganın özelliklerini fizikokimyasal analizler, antioksidan ve anti-proliferasyon aktiviteleri açısından kanser hücreleri üzerinde araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu arı ürünleri arasında propolis en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olarak bulunmuştur ve MCF 7 hücre hatları üzerinde en düşük IC<sub>50</sub> değerinin (38,9ug/ml) uygulandığı görülmüştür. Propolis MCF-7'nin (insan meme adenokarsinoma) proliferasyonunu engellemiştir. Bal ve perganın IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 60 v/v ve 64 µg/mL'de olarak bulunmuştur [79].

Tez çalışmamda kullandığım apilarnil ve ana arı larvası, Ismail ve arkadaşlarının propolis, bal ve perga gibi arı ürünleri ile yaptığı çalışmada olduğu gibi MCF-7 (insan meme adenokarsinoma) kanser hücre hattında yüksek antioksidan aktiviteye sahip olarak bulundu. MCF 7 hücre hatları üzerinde düşük IC<sub>50</sub> değerleri (apilarnilde 13 ppm, ana arı larvasında 27 ppm) belirlendi.

Jovanović ve arkadaşlarının çalışmasında arı sütünün normal insan fibroblast (MRC-s) ve kolorektal kanser (HCT-116 ve SW-480) hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerini belirlenmiştir. Sitotoksik aktiviteyi belirlemek için MTT yöntemi ve süperoksit anyon radikal konsantrasyonunun belirlenmesi için NBT testi kullanılmıştır. Arı sütü, hücre canlılığını



etkilemiş ve kanser hücre hatlarında (HCT-116 ve SW-480) apoptoz genlerinde ekspresyonunda artış görülmüştür [80].

Arı zehrinin, çeşitli kanser hücrelerine karşı *in vitro* antikanser etkilerine sahip olduğu gösterildiği bu çalışmada; *Apis mellifera*'nın iki ana biyopeptidi olan melittin (MEL) ve fosfolipaz A2 (PLA2)'nin antikanser aktiviteden sorumlu biyomoleküller olduğu düşünülmüştür ve insan kolon karsinomu hücreleri (HCT-116) üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, *A. mellifera* zehri MEL veya PLA2 tarafından indüklenen güçlü bir sitotoksikite etkisi göstermiştir. Bu bulgular, *A. mellifera*'nın sitotoksik etkisini doğrulamaktadır. Arı zehri HCT116 kanser hücrelerinin membran bozulmasını indükleyen MEL ve PLA2 arasındaki sinerjik potansiyel aktivitelerin varlığını vurgulamıştır. Bu sonuçlar yeni antikanser tedavilerinin geliştirilmesi için bir temel olarak arı zehrinin hizmet edebileceğini kanıtlamıştır [81].

2013 yılında Jan ve Song tarafından arı zehri üzerine yapılan çalışmada, A549 insan akciğer kanser hücre hattında hücre proliferasyonunu engellenmesi üzerine etkileri araştırılmıştır ve arı zehrinin akciğer kanseri üzerinde apoptotik hücre ölümünün tetiklediği böylece antitümör etki gösterdiğini bulmuşlardır [82].

Bu çalışmada arı zehri içeriğinde başta melittin olmak üzere bulunan bileşikler kanser hücresindeki habercileri doğrudan etkiler, apoptoz ve hücre döngüsü durmasını sağlar, anjiyogenez faktörlerinin etkisini azaltır ve tümör büyümesini baskılar [83].

Hamamcı ve arkadaşlarının apilarnil üzerine yaptığı çalışmada; Apilarnil, sepsis gelişen beyinde SOD ve CAT düzeylerindeki düşüşü azaltmıştır. Apilarnil septik beyinde MDA, XOD ve testis-1 düzeylerindeki artışı azalttığı gözlemlenmiştir ve apilarnil dozu arttıkça sepsise bağlı dejenere olmuş nöron sayısı azalmıştır. Apilarnil, sepsis tarafından indüklenen proinflatuar sitokinlerin (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) yüksek seviyelerini azaltmıştır. Apilarnil beyinde sepsis ile ilişkili apoptozu önlemiştir [84].

Wistar sıçanları üzerine yapılan çalışmada apilarnilin yoğun katabolik etkiye sahip oksidatif süreçleri uyaran, güçlü bir enerji kaynağı olduğu bulunmuştur [85].

Meda ve arkadaşlarının Güney Afrika'da yaptıkları çalışmada apilarnilin sindirim sistemi hastalıkları, solunum yolu hastalıkları, vertigo, oftalmik hastalıklar için yararlı bir ajan olarak kullanımının yanında özellikle erkek kısırlığında tedavi edici olduğuna dair sonuçlar bulmuşlardır [86].

Apilarnilin, malnütrisyonlu çocuklara düzenli tüketilmesi sağlıklı kilo alımını ve iştahta iyileşmeyi sağlamıştır. Ayrıca vücutta doku gerginliği ile sonuçlanmıştır [87].

Osnicewa ve arkadaşlarının köpekler üzerinde yaptığı çalışmada apilarnilin 30 günlük kuluçka uygulamasından sonra tiroksin ve triiyodotironin konsantrasyonu %40 artarken tiroid uyarıcı hormon %37 azaldı [88].

Hem amino asit dizileri hem de moleküler ağırlığı antioksidan aktiviteyi göstermek için önemlidir. Dong ve arkadaşları, kraliçe arı larvasının içeriğinde bol miktarda bulunan hidrofobik amino asiti ile yüksek antioksidan aktivitesi arasındaki ilişki bulmuştur [89].

Tirosin sağlıklı bir sinir sistemi için esansiyel bir aminoasittir. Vücudun stres ile mücadelesini destekler. Bilişsel fonksiyonları düzenleyen tirosin düzeyi yapılan çalışmalarda ana arı larvasında apilarnilden yaklaşık iki kat daha fazla olduğu Mărgăoan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bulunmuştur [90].

Bu bilgiler doğrultusunda; tez çalışmamızda kullandığımız ana arı larvası ile yapılan MTT analizine literatür taramalarında rastlanılmamıştır. Apilarnil ve ana arı larvasının MCF-7, HT-29 ve DLD-1 kanser hücre hatlarında yapılan sitotoksik aktivite çalışmaları için özgün nitelik taşımaktadır. Tez çalışmamda; MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) kanser hücrelerinde antikanserojen etki göstereceği düşünülen apilarnil ve ana arı larvasının etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece hücre proliferasyonunu engelleyici, apoptozun indüklenmesini ve ilaç-hedef etkileşimini artıran yeni ilaç adayı olabilecek apilarnil ve ana arı larvasının *in vitro* çalışmaları planlanmıştır.

Deneysel çalışmamızdan elde edilen sonuçlar özetlendiğinde;

- 1- Sitotoksitite analizleri yapılarak en etkili apilarnil ve ana arı larvası dozu belirlendi. Çeşitli hücre hatlarında apilarnil ve ana arı larvasının %50 baskılayıcı konsantrasyon ( $IC_{50}$ ) değerleri MTT yöntemi ile analiz edildi.
- 2- MCF-7 kanser hücre hattında uygulanan apilarnil ve ana arı larvasının hücre çoğalması üzerinde olan etkisi incelendi.  $IC_{50}$  değeri apilarnilde 13 ppm, ana arı larvasında 27 ppm olarak belirlendi. MTT yöntemine göre ana arı larvasının MCF-7 kanser hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi apilarnilden (erkek arı larvası) daha fazla olarak saptandı.
- 3- DLD-1 kanser hücre hattında apilarnil ve ana arı larvasının arasında karşılaştırma yapıldığında; apilarnilin canlılık aktivitesi %73,83 iken, ana arı larvasının canlılık aktivitesi %65,40 olarak tespit edilmiştir. Ana arı larvasının, apilarnile oranla DLD-1 hücre hattında daha etkili sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulundu. %50 baskılayıcı konsantrasyon ( $IC_{50}$ ) değeri apilarnilde 5,1 ppm, ana arı larvasında 5,4 ppm olarak belirlendi.

- 4- HT-29 hücre hattında apilarnilin ve ana arı larvasının *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır.
- 5- Apilarnil ve ana arı larvasının arasındaki en büyük farklılık ana arının saf arı sütü ile beslenmesi sebebiyle içeriğindeki total protein miktarından kaynaklanmakta olduğu tahmin edilmektedir.
- 6- Apilarnil ve ana arı larvasının etkinliklerinin literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmadan elde edilen bulguların değerlendirilmesi ile onkolojik tedavi sürecinde hastaların yaşadığı olumsuzluklar ve kullanılan kimyasal ilaçlar ile yapılan tedavi protokollerinin yarattığı güçlü yan etkiler düşünüldüğünde, antioksidan ve antikanserojen etkisi olan ve sağlığı destekleyen gıda takviyelerinin geliştirilmesi ve kullanılması önem arz etmektedir. Kanser hastalığının kalıcı tedavisi için alternatif tedavi yolları araştırılmaya ve ilaçlar üretilmeye devam edilmektedir. Kemoterapötiklerin hedef hücreler dışında hayati pek çok organı olumsuz etkilediği bilinmektedir. Kanser tedavisinin yan etkileri göz önüne alındığında, antikanserojen özellik taşıyan birçok takviye gıdanın, farmakolojik ajanlar ile kombine kullanımının araştırılması ve çözüm bulunmasının önemli olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, kanser tedavisinde olumlu etkisine şahit olduğumuz apilarnil ve ana arı larvasının DNA hasarlarının önlenmesi ve birtakım ilaçların yan etkilerinin gelişiminin engellenmesinde etkili olabileceği tahmin etmekteyiz. Bu çalışmamız literatüre, kanser hastaları arasında gıda takviyelerinin kullanımındaki artış nedeniyle, apilarnil ve ana arı larvası gibi son zamanlardaki popüler arı ürünlerinin geniş çaplı çalışmalarla insan sağlığı üzerine etkisi ve sağlık profesyonellerinin bu konuda hastalarını bilinçlendirmesi için önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. El, S.N. (2010). Ürün Geliştirmede Optimum Beslenme Yaklaşımı. Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Ders Notları, İzmir.
2. Onur, E., Nalbantsoy, A. ve Kışla, D. (2018). İmmünoterapi ve Propolisin Kansere İmmünoterapisinde Kullanım Potansiyeli. *Food and Health*, 4(4), 231-246.
3. Duran, E. T. (2011). Kansere Tedavisinin Yan Etkilerine Yönelik Alternatif Uygulamalar. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(2), 72-77.
4. WHO (World Health Organization) (2004). Issues Guidelines for Herbal Medicines, 82(3):236- 238.
5. Er Velioglu, E. (2019). *Gıda Takviyelerinin Kullanımının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma: Trakya Örneği*. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
6. Silici, S. (2019). Bal Arısı Ürünleri ve Apiterapi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji dergisi*, 7(9), 1249-1262.
7. Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical-Definition And Introduction. *Aaps Pharmsci*, 5(3), 27-28.
8. Anonim (2013). Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği. Ağustos 2013 (Tebliğ No: 2013/49), Resmi Gazete Tarihi: 16.08.2013, Sayısı: 28737.
9. Aslan, R. (2019). Fonksiyonel Gıda: Besinler İlacımız Olabilir mi?. *Ayrıntı Dergisi*, 7(77).
10. Araz, A., Harlak, H. ve Meşe, G. (2007). Sağlık Davranışları ve Alternatif Tedavi Kullanımı. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6(2), 112-122.
11. Coşkun, T. (2005). Fonksiyonel Besinlerin Sağlığımız Üzerine Etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48(1), 61-84.
12. Bulduklı, Y. (2015). Hedef Kitle Bağlamında Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Uygulamaları. *Türkiyat Araştırmaları Dergisi*, 607.
13. Onbaşlı, D. (2019). Apiterapi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 49-56.
14. Sorucu, A. (2019). Arı Ürünleri ve Apiterapi. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 10(1), 1-15.
15. Çelik, K. ve Aşgun, H. F. (2020). Arılarla Gelen Sağlık “Apiterapi”. *Tudás Alapítvány*.
16. İnternet: [http://apiedu.eu/pluginfile.php/52/mod\\_page/content/17/apitherapy-handbook-tr.pdf](http://apiedu.eu/pluginfile.php/52/mod_page/content/17/apitherapy-handbook-tr.pdf). Son Erişim Tarihi: 30.06.2021.

17. Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği, 2014. Resmi Gazete, Sayı 29158, 27 Ekim 2014.
18. Atayoğlu, A. T. (2019). Apiterapiye Genel Bakış. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3, 61-66.
19. Karadal, F. ve Yıldırım, Y. (2012). Balın Kalite Nitelikleri, Beslenme ve Sağlık Açısından Önemi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(3).
20. Anonim, (2010). TSE 3036 Bal Standardı. 19 Ocak 2010 Kabul Tarihli Bal Standardı, Ankara.
21. Mutlu, C., Erbaş, M. ve Tontul, S. A. (2017). Bal ve Diğer Arı Ürünlerinin Bazı Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda*, 15(1), 75-83.
22. Spilioti, E., Jaakkola, M., Tolonen, T., Lipponen, M., Virtanen, V., Chinou, I. and Moutsatsou, P. (2014). Phenolic Acid Composition, Antiatherogenic And Anticancer Potential Of Honeys Derived From Various Regions In Greece. *Plos One*, 9(4), e94860.
23. Silici, S. (2015). Propolis Üzerine Ön Klinik Araştırmalar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 31(3), 185-191.
24. Miguel, M. G. and Antunes, M. D. (2011). Is Propolis Safe As An Alternative Medicine?. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 3(4), 479.
25. Memmedov, H., Aldemir, O. ve Aliyev, E. (2018). Propolisin Antikanser Etkisi. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 10(1), 20-27.
26. Sforcin, J. M. and Bankova, V. (2011). Propolis: Is There a Potential for the Development of New Drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253-260.
27. Aydın, M., Danacıoğlu, D. A. ve Türker, S. (2021). Propolisin Genel Özellikleri ve Kullanımı. *Gıda*, 46(1), 69-81.
28. Li, Q. Q., Wang, K., Marcucci, M. C., Sawaya, A. C. H. F., Hu, L., Xue, X. F. and Hu, F. L. (2018). Nutrient-Rich Bee Pollen: A Treasure Trove Of Active Natural Metabolites. *Journal of Functional Foods*, 49, 472-484.
29. Cınbirtoğlu, Ş., Konak, F., Sıralı, R. ve Demirkol, G. Bal Arısı (*Apis mellifera* L.)'nın Polen Aktivitesi. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 11(1), 21-27.
30. Özdemir, G., Ersöz, E. ve Dilek, N. M. (2021). Apitherapy and Health. *Black Sea Journal of Health Science*, 9-10.
31. Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L. and Olczyk, K. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

32. Mayda, N. (2020). *Arı Poleni ve Arı Ekmeğinin Palinolojik, Kimyasal ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
33. Fidan, M., Arif, Ayar ve Konar, V. (2020). Effects of Perga (Bee Bread) On Metamorphosis, Mortality, and Fecundity in *Drosophila melanogaster*. *Sabuncuoğlu Serefeddin Health Sciences*, 2(2), 1-15.
34. Karlıdağ, S. ve Keskin, M. (2020). Arı Ürünlerine Genel Bir Bakış. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(1), 58-63.
35. Küçükersan, M. K., Artık, N., Karaman, M. R., Halıcı, Z. ve Çelik, M., (2017). Sağlıklı Beslenme ve Apiterapi İçin Değerli Bir Arı Ürünü: Perga (Bee Bread). *Gıda 2000 Gıda Teknoloji ve Tarım Dergisi*.
36. Salazar-González, C. Y., Rodríguez-Pulido, F. J., Terrab, A., Díaz-Moreno, C., Fuenmayor, C. A. and Heredia, F. J. (2018). Analysis of Multifloral Bee Pollen Pellets by Advanced Digital Imaging Applied to Functional Food Ingredients. *Plant Foods For Human Nutrition*, 73(4), 328-335.
37. Akyol, E. (2015). Arı Sütünün Yapısı, İnsanlar ve Arılar İçin Önemi Structure of Royal Jelly, Importance For Humans And Bees. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 15(1), 16-21.
38. Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N. and Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
39. Bilgi, G. Arı Sütü.  
<https://Arastirma.Tarimorman.Gov.Tr/Aricilik/Belgeler/Kitap/Ari%20s%C3%Bct%C3%B C.Pdf>. Son Erişim Tarihi: 01.07.2021.
40. Uçar M. (2018). Arı Sütünün Büyüme, Yaşlanma ve Üreme Sağlığına Etkisi. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7(1), 193-202.
41. Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A. And Fernández-López, J. (2017). Royal Jelly: Health Benefits and Uses in Medicine. In *Bee Products-Chemical and Biological Properties* (Pp. 199-218). Springer, Cham.
42. Bulut, S. ve Lenger, D. S. (2015). Antik Dönemde Arı Ürünlerinin Kullanımı. *Arı Ürünleri ve Sağlık (Apiterapi)*. 1st Ed. Izmir, Turkey: *Sida Mediya*, 7-16.
43. Derebaşı, E. ve Canbakal, E. (2009). Arı Zehirinin Kimyasal Yapısı ve Tıbbi Çalışmalarda Kullanımı. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 1(2), 32-34.
44. Duffy, C., Sorolla, A., Wang, E., Golden, E., Woodward, E., Davern, K. and Blancafort, P. (2020). Honeybee Venom and Melittin Suppress Growth Factor Receptor Activation in HER2-Enriched And Triple-Negative Breast Cancer. *NPJ Precision Oncology*, 4(1), 1-16.
45. İnternet: <https://apitherapy.org/> Son Erişim Tarihi: 02.07.2021.

46. Erdem, B. Ve Özkök, A. (2018). Can Food Supplement Produced From Apilarnil be an Alternative to Testosterone Replacement Therapy. *Hacettepe Journal Of Biology and Chemistry*, 45(4), 635-638.
47. Topal, E., Strant, M., Yücel, B., Kösoğlu, M., Margaoan, R. ve Dayıoğlu, M. (2018). Ana ve Erkek Arı Larvalarının Biyokimyasal Özellikleri ve Apiterapötik Kullanımı. *Hayvansal Üretim*, 59(2), 77-82.
48. Sidor, E. and Džugan, M. (2020). Drone Brood Homogenate as Natural Remedy for Treating Health Care Problem: A Scientific and Practical Approach. *Molecules*, 25(23), 5699.
49. Mărgăoan, R., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Bobiş, O., Bonta, V., Cătană, C. And Margin, M. G. (2017). Comparative Study on Quality Parameters of Royal Jelly, Apilarnil and Queen Bee Larvae Triturate. *Bulletin of The University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 74(1).
50. Balkanska R, I Karadjova, M Ignatova. (2014). Comparative Analyses of Chemical Composition of Royal Jelly and Drone Brood. *Bulgarian Chemical Communication*, 46(2): 412-416.
51. Strant M, A Varadi, C Aoşan. (2016). The Apilarnil and Queen Larvae Studies, Utilization, Doses, Clinical Cases. Cluj Napoca.
52. Sidorov V A, S Bakier, M Stocki. (2016). GC-MS Investigation of The Chemical Composition of Honeybee Drone And Queen Larvae Homogenate. *Journal of Apicultural Science*, 60(1): 111-120.
53. Yücel B, Z Açıkgoz, H Bayraktar, C Seremet. (2011). The Effects of Apilarnil (Drone Bee Larvae) Administration on Growth Performance And Secondary Sex Characteristics of Male Broilers. *Journal Of Animal And Veterinary Advances*, 10(17): 2263-2266.
54. Bruneau E. (2015). First Steps For Good Beekeeping Practices-Guide For Apitherapy Products. Apitherapy Symposium Book Of Abstracts Page:40.
55. Silici, S. (2019). Chemical Content And Bioactive Properties of Drone Larvae (Apilarnil). *Mellifera*, 19(2), 14-22.
56. Yucel, B., Sahın, H., Yıldız, O. ve Kolaylı, S. Bioactive Components and Effect Mechanism of Apilarnil. *Hayvansal Üretim*, 60(2), 125-130.
57. Yang W, Y Tian, M Han, X Miao. (2017). Longevity Extension of Worker Honey Bees (*Apis mellifera* L.) By Royal Jelly: Optimal Dose And Active Ingredient. Peerj, DOI 10.7717/Peerj.3118.
58. Şengül, F. ve Vatansev, H. (2021). Overview Of Apitherapy Products: Anti-Cancer Effects Bee Venom Used in Apitherapy. *International Journal of Traditional And Complementary Medicine Research*, 2(1), 36-48.

59. Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
60. Özkara, G., Öztürk, O. ve Aydoğan H. Y. (2020). Kanser ve Metastaz: Hücre Adezyon Molekülleri ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi. *Experimed*, 10(1), 38-48.
61. World Health Organization. (2020). WHO Report on Cancer: Setting Priorities, Investing Wisely And Providing Care For All. World Health Organization. pp 160.
62. Çaman, Ö. K., Bilir, N. ve Özcebe, H. (2014). Ailede Kanser Öyküsü ve Algılanan Kanser Riski, Kanserden Korunma Davranışları ile İlişkili Mi? *Fırat Med J*, 19(2), 95-100.
63. Taylan, S. ve Çelik, G. K. (2020). Ailesel Meme Kanseri Öyküsü Olan ve Olmayan Kadınlarda Meme Kanseri Tanılama Davranışları. *Cukurova Medical Journal*, 45(4), 1467-1475.
64. Fidan, E. (2020). *Meme Kanseri Kadınların Kanserin Evrelerine Göre Hastaneye Başvurmalarında Etkili Olan Faktörlerin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hemşirelik Anabilim Dalı.
65. Arı, M. (2018). *Meme Kanseri Hücre Dizisinde (MCF-7) Oleuropein ve D Vitamininin Antiproliferatif, Apoptotik ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü.
66. Teker, E. (2018). *Kolon Kanseri Tumor Supressör Mikrona'ların Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
67. Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruiz, K. and Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(11).
68. Güvenir Çelik, E. (2015). *SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Epibrassinolide ile Tetiklenen Apoptozun Moleküler Hedeflerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans, İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
69. Yılmaz, S. (2014). *HT-29 Kanser Hücrelerinin Metastaz Takibi İçin Mikro Kanallarda Tespiti ve Sayılması*, Yüksek Lisans Tezi, Başkent Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
70. Acar, M. B. (2015). *Genç ve Senesent Mezenkimal Kök Hücre Sekretomlarının Kanser Hücre Hatlarına Etkilerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
71. Mesci S. (2020). *İzoindol Türevli Bileşiklerin İnsan Meme ve Kolon Kanseri Hücrelerinde Çoklu İlaç Direncine ve Apoptotik Sinyal Yolaklarına Etkilerinin Belirlenmesi*. Amasya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Amasya.
72. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide For 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 71(3), 209-249.



73. Velentzis, L. S., Keshtgar, M. R., Woodside, J. V., Leathem, A. J., Titcomb, A., Perkins, K. A. and Cantwell, M. M. (2011). Significant Changes In Dietary İntake and Supplement Use After Breast Cancer Diagnosis İn A UK Multicentre Study. *Breast cancer research and treatment*, 128(2), 473-482.
74. Öztürk, S. A., Özerson, Z. ve Özkara, İ. Ö. (2019). Kanser Hastalarında Tanı Öncesi ve Sonrası Beslenme Alışkanlıkları, Besin Tüketim Sıklıkları, Besin Takviyesi Kullanımı ve Kullanımı Etkileyen Faktörlerin Karşılaştırılması. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12(2), 182-194.
75. Kurt, H., Keşkek, Ş. Ö., Çil, T. ve Canataroğlu, A. (2013). Meme Kanserli Hastalarda Tamamlayıcı/Alternatif Tedavi Kullanımı. *Türk Onkoloji Dergisi*, 28(1), 10-15.
76. Jaganathan, S. K. and Mandal, M. J. J. A. (2009). Honey Constituents and Their Apoptotic Effect in Colon Cancer Cells. *Journal of Apiproduct and Apimedical Science*, 1(2), 29-36.
77. Münstedt, K., Voss, B., Kullmer, U., Schneider, U. And Hübner, J. (2015). Bee Pollen And Honey For The Alleviation of Hot Flushes And Other Menopausal Symptoms in Breast Cancer Patients. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(4), 869-874.
78. Caner, A., Onal, M. G. ve Silici, S. (2021). The Effect of Bee Bread (Perga) With Chemotherapy On Mda-Mb-231 Cells. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2299-2306.
79. Ismail, W. I. W., Hussin, N. N., Mazlan, S. N. F., Hussin, N. H. and Radzi, M. N. F. M. (2018, October). *Physicochemical Analysis, Antioxidant and Anti Proliferation Activities of Honey, Propolis and Beebread Harvested From Stingless Bee*. In IOP Conference Series: Materials Science And Engineering (Vol. 440, No. 1, P. 012048). IOP Publishing.
80. Jovanović, M. M., Ćupurdija, M. Đ., Nikodijević, D. D., Milutinović, M. G., Cvetković, D. M., Rakobradović, J. D. and Marković, S. D. (2018). Effects Of Royal Jelly On Energy Status and Expression of Apoptosis And Biotransformation Genes in Normal Fibroblast And Colon Cancer Cells. *Kragujevac Journal of Science*, (40), 175-192.
81. Yaacoub, C., Rifi, M., El-Obeid, D., Mawlawi, H., Sabatier, J. M., Coutard, B. and Fajloun, Z. (2021). The Cytotoxic Effect of *Apis mellifera* Venom with a Synergistic Potential of Its Two Main Components Melittin and PLA2 On Colon Cancer HCT-116 Cell Lines. *Molecules*, 26(8), 2264.
82. Jang, D.M., Song, H.S. (2013). Inhibitory Effects of Bee Venom on Growth of A549 Lung Cancer Cells via Induction of Death Receptors. *Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society*. 30 (1): 57-70.
83. Oršolić N. Bee Venom in Cancer Therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31: 173-94.
84. Hamamci, M., Doganyigit, Z., Silici, S., Okan, A., Kaymak, E., Yilmaz, S. ve Inan, L. E. (2020). Apilarnil: A Novel Neuroprotective Candidate. *Acta Neurologica Taiwanica*, 29(2), 33-45.

85. Kogalniceanu, S., Lancrajan, I. and Ardelean, G. (2010). Changes of the Glucidic Metabolism Determined by the Physical Effort of The Treatment with the Aslavital and Apilarnil. *J Med Aradian*, 3, 33-41.
86. Meda A, Lamien CE, Millogo J, Romito M, Nacoulma OG. (2004). Therapeutic Uses of Honey And Honeybee Larvae In Central Burkina Faso. *J Ethnopharmacol*. 95:103-107.
87. Iliesiu, N. A Modern Preparation Of Bees “Apilarnil”. *Inf. Reg. Zrzesz. Pszczel. Apipol* 1988, 10, 15–20.
88. Osnicewa, L.A.; Efanowa, N.W.; Kabyszewa, W.W. (2009). Homogenate of Drone in the Diet of Dogs. *Beekeeping*, 10, 50–51.
89. Dong, D., Dong, M., Liu, K., Lu, Y. and Yu, B. (2018). Antioxidant Activity of Queen Bee Larvae Processed by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), e13461.
90. Mărgăoan, R., Mărghițaș, L. A., Dezmirean, D. S., Bobiș, O., Bonta, V., Cătană, C. and Margin, M. G. (2017). Comparative study on quality parameters of royal jelly, apilarnil and queen bee larvae triturate. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 74(1).