

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**





KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

ORCID : - - -

Trabzon

ÖNSÖZ

“N- ω -Nitro L-Arginin Metil Ester (L-NAME) ile İndüklenmiş Deney Hayvanlarında Deli Bal ve Orman Gülü (*R. luteum*) Ekstresinin Anti-Hipertansif Etkisinin Araştırılması” adlı bu tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim dalında doktora tezi olarak hazırlandı. Doktora tezimi maddi olarak destekleyen KTÜ BAP06’ya, ayrıca doktora öğrenimim sırasında burs desteğiyle şahsımı destekleyen Kredi Yurtlar Kurumu’na teşekkür ederim.

Doktora çalışmam süresince engin bilgisi, anlayışıyla desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’ya, bilgisi ve değerli fikirleriyle bana yol gösteren tez ikinci danışmanım Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN’e, tecrübesi ve becerisiyle çalışmamın hayvan deneyleri aşamasında tezime katkıda bulunan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Meltem MALKOÇ’a, deneyimleriyle ve yardımlarıyla tezime katkıda bulunan Doç. Dr. Oktay YILDIZ’a, lisans günlerimden bu güne bana ve ayrıca tezime olan katkılarından dolayı Prof. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya, dokuların saklanması konusunda Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK ve ekibine, tezimin her aşamasında yardımını, bilgisini, tecrübesini asla eksik etmeyen değerli laboratuvar arkadaşım Araş. Gör. Yakup KARA’ya, moral-motivasyon konusunda beni destekleyen laboratuvar arkadaşlarım Ceren BİRİNCİ ve Esra BİRİNCİ’ye, lisans eğitimim sırasında ve lisansüstü eğitimime başladığım ilk günden bu yana bir aile oluşturduğumuz, maddi ve manevi olarak koca bir teşekkürü borç bildiğim Doç. Dr. Zehra CAN’a ve bana engin faydaları olan KTÜ Kimya Bölümü, Biyokimya Kürsüsü’ndeki saygıdeğer hocalarıma teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamda, deney hayvanlarının tansiyonlarının ölçümlerinde yardımcı olan Prof. Dr. Mine DUMAN KADIOĞLU’na ve Dr. Öğr. Üyesi İlknur ERKÖSEOĞLU’na, polen analizleri için Esra DEMİR’e, GTX-III analizi için Halil KOCABAŞ’a, KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi ekibine ve Osman ÇAKIR’a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan aileme, eşime ve kötü gün dostlarıma teşekkürlerimi cân-ı gönülünden sunarım.

Hilal Ebru ÇAKIR
Trabzon, 2020

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora tezi olarak sunduğum “N- ω -Nitro L-Arginin Metil Ester (L-NAME) ile İndüklenmiş Deneş Hayvanlarında Deli Bal ve Orman Gülü (*R. luteum*) Ekstresinin Anti-Hipertansif Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.
19/10/2020

Hilal Ebru ÇAKIR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. <i>Rhododendron</i> Türleri ve Grayanotoksin-III.....	2
1.3. Orman Gülü (<i>Rhododendron</i>) Balı	3
1.4. Hipertansiyon	5
1.5. Nitrik Oksit (NO•) ve Nitrik oksit Sentaz (NOS)	6
1.6. Endotel Hücrelerinde L-NAME Kaynaklı Nitrik Oksit Eksikliği	8
1.7. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar & Hipertansiyonla İlişkisi.....	12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler	19
2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	19
2.3. Numunelerin Temini ve Saklama Koşulları	21
2.4. LC-MS/MS ile GTX-III Analizi.....	23
2.5. Ballarda Polen Analizi.....	23
2.6. Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Antioksidan Analizleri	24
2.6.1. Optik Çevirme Açısı [20 [α] D] (α – Rotasyon)	24
2.6.2. %Nem ve %Briks Değeri	25
2.6.3. Elektriksel İletkenlik	25
2.6.4. pH Ölçümü	25
2.6.5. Renk Tayini	25

2.6.6.	Prolin Miktarının Belirlenmesi.....	26
2.6.7.	Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin Antioksidan Özellikleri	26
2.6.8.	HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini	31
2.7.	Deney Hayvanları Çalışması	31
2.7.1.	Hipertansif Deney Hayvanı Modeli Oluşturma	32
2.7.2.	Hayvanların Vücut Ağırlığının Takibi	35
2.7.3.	Hayvanların Tansiyonunun Ölçülmesi	35
2.7.4.	Dekapitasyon ve Serumda Bazı Biyokimyasal Analizler	36
2.7.5.	Dokuda Homojenatında Yapılan Analizler	36
2.7.5.1.	Glutasyon (GSH) Düzeyinin Ölçümü	36
2.7.5.2.	Nitrik Oksit (NO) Düzeyinin Ölçümü	38
3.	BULGULAR.....	40
3.1.	LC-MS/MS ile GTX-III Analizi Sonucu.....	39
3.2.	Polen Analizi Sonuçları	41
3.3.	Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Antioksidan Analizlerinin Sonuçları	42
3.3.1.	Optik Çevirme Açısı [20 [α] D] (α – Rotasyon)	42
3.3.2.	%Nem ve %Briks Değeri	43
3.3.3.	Elektriksel İletkenlik	43
3.3.4.	pH Ölçüm Sonucu	43
3.3.5.	Renk Analiz Sonucu	44
3.3.6.	Prolin Tayini Sonucu	45
3.3.7.	Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin Antioksidan Özellikleri	45
3.3.8.	Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini Sonucu	47
3.4.	Deney Hayvanları Çalışması Sonuçları.....	49
3.4.1.	Deney Hayvanlarının Tansiyon Ölçüm Sonuçları.....	49
3.4.2.	Hayvanların Vücut Ağırlığının Takibi	51
3.4.3.	Dekapitasyon ve Serumda Bazı Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları	52
3.4.4.	Doku Homojenatlarında Yapılan Analizlerin Sonuçları	57
3.4.4.1.	Doku Homojenatlarında GSH Bulguları	57

3.4.4.2.	Doku Homojenatlarında NO Bulguları	59
4.	TARTIŞMA.....	61
5.	SONUÇLAR	75
6.	ÖNERİLER.....	77
7.	KAYNAKLAR	78
8.	EKLER.....	79
ÖZGEÇMİŞ		



ÖZET

N- ω -NİTRO L-ARGİNİN METİL ESTER (L-NAME) İLE İNDÜKLENMİŞ DENEY HAYVANLARINDA DELİ BAL VE ORMAN GÜLÜ (*R. luteum*) EKSTRESİNİN ANTI-HİPERTANSİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hilal Ebru ÇAKIR

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2020, 100 Sayfa, 6 Sayfa Ek

Orman gülü bitkisi Karadeniz Bölgesi'nde yetişen çalı tipinde bir bitki olup *Rhododendron ponticum* (mor çiçekli, komar çiçeği), *Rhododendron luteum* (sarı çiçekli, zifin çiçeği) türleri ile bölgeye endemiktir. Her iki bitkiden nektar ve polen alan bal arısının ürettiği bal, içerisinde bulunan grayanotoksin (GTX) bileşiklerinden dolayı zehirlidir ve halk arasında damar genişletici özelliğinden dolayı tansiyon düşürücü olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada GTX içeren orman gülü balının N- ω -nitro L-arginin metil ester (L-NAME) ile indüklenmiş sıçanlarda anti-hipertansif etkinliğinin aydınlatılması amaçlandı. Karadeniz Bölgesi'nde farklı bölgelerden toplanan orman gülü çiçeklerinde (*R. ponticum* ve *R. luteum*) ve deli balda GTX-III miktarları LC-MS/MS ile belirlendi. Yüksek miktarda GTX-III içeren çiçek ve bal numuneleri 2 çalışma grubunda test edildi. L-NAME (40 mg/kg/30 gün) ile hipertansiyon oluşturulan Sprague Dawley dişi sıçanlara gavaj ile orman gülü çiçek özütü (155,80 mg/kg/15 gün) ve deli bal (12,50 mg/kg/15 gün) verilerek tansiyonları tail-craft yöntemi ile takip edildi. Bulgular kontrol grubu olarak kullanılan kapril (20 mg/kg/15gün) grubu ile karşılaştırıldı. Deney gruplarının serum biyokimyasal parametreleri glukoz, aspartat aminotransferaz, alkalin fosfat, laktat dehidrogenaz, kreatin kinaz ve kan üre analizleri yapıldı. Hipertansiyondan hasar gören kalp, karaciğer ve böbrek dokularında nitrik oksit (NO) ve Glutatyon (GSH) değerleri ölçüldü.

Özet olarak, deli balın ve orman gülü çiçek ekstresinin prelinik olarak anti-hipertansif etkiye sahip olduğu ilk kez deneysel olarak tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Rhododendron*, Deli Bal, Grayanotoksin, L-NAME, Kapril, Hipertansiyon

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE ANTI-HYPERTENSIVE EFFECT OF MAD HONEY AND RHODODENDRON (*R. luteum*) EXTRACT IN EXPERIMENTAL ANIMALS INDUCED BY N- ω -NITRO L-ARGININE METHYL ESTER (L-NAME)

Hilal Ebru ÇAKIR

Karadeniz Technical University
The Graduate of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Sevgi KOLAYLI
2020, 100 Page, 6 Pages Appendix

Rhododendron plant is a bush type plant that grows in the Black Sea Region and is endemic to the region with *Rhododendron ponticum* (purple flower, komar flower), *Rhododendron luteum* (yellow flower, zifin flower) species. The honey produced by the honey bee, which receives nectar and pollen from both plants, is poisonous due to the grayanotoxin (GTX) compounds it contains and is used as a blood pressure reducer due to its vasodilating properties.

In this study, it was aimed to elucidate the anti-hypertensive activity of mad honey containing GTX in rats induced with N- ω -nitro L-arginine methyl ester (L-NAME). GTX-III amounts in *Rhododendron* flowers (*R. ponticum* and *R. luteum*) and honey collected from different regions in the Black Sea Region were determined by LC-MS / MS. Flower and honey samples containing high amounts of GTX-III were tested in 2 study groups. Sprague Dawley female rats with hypertension induced by L-NAME (40 mg/kg/30 days) were treated with rhododendron flower extract (155,80 mg/kg/15 days) and mad honey (12,50 mg/kg/15 days) by gavage.) and their blood pressure was followed by the tail-craft method. The findings were compared with the capril (20 mg/kg/15 days) group used as a control group. Serum biochemical parameters of the experimental groups were analyzed for glucose, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, creatine kinase and blood urea. Nitric oxide (NO) and Glutathione (GSH) values were measured in heart, liver and kidney tissues damaged by hypertension.

In summary, it was experimentally determined for the first time that mad honey and rhododendron flower extract have a preclinical anti-hypertensive effect.

Keyw Words: *Rhododendron*, Mad Honey, Grayanotoxin, L-NAME, Hypertension

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Rhododendron luteum</i> (sarı) ve <i>Rhododendron ponticum</i> (mor)	2
Şekil 2. GTX-I, GTX-II, GTX-III bileşikleri.	3
Şekil 3. NOS enzimi katalizli NO• oluşumu	7
Şekil 4. N-ω-nitro L-arginin-metil ester(L-NAME).....	7
Şekil 5. Damar duvarında NO•'nun oluşumu ve etki mekanizması.....	8
Şekil 6. Kan basıncının N-ω-nitro-L-arginin metil ester modülasyonu	10
Şekil 7. Kapril (1-(3-Mercapto-2-metil-propionil)-pirrolidin-2-karboksilik asit).....	12
Şekil 8. Ekzojen antioksidan mekanizmalarının anti-hipertansif etkilerinin şematik özeti	15
Şekil 9. Kondanse ve hidrolizlenebilir tanenler, flavonoidler, hidroksisinamik asit, hidroksibenzoik asit genel yapıları	16
Şekil 10. Ekstraktların süzülmesi ve evaporasyon sonrası görüntü	32
Şekil 11. Deney hayvanları ve intragastrik (gavaaj) yoldan hayvanların beslenmesi.....	34
Şekil 12. Deney hayvanlarının tansiyonunun ölçülmesi	35
Şekil 13. Tansiyon ölçüm ekranı	36
Şekil 14. Alifatik tiyol bileşiklerinin 5,5'- ditiyobis- 2-nitrobenzoik asit ile tepkimesi	37
Şekil 15. Griess reaksiyonu	38
Şekil 16. Toplam polifenol kalibrasyon grafiği	45
Şekil 17. Toplam flavonoid madde kalibrasyon grafiği	46
Şekil 18. FRAP kalibrasyon grafiği	46
Şekil 19. HPLC-UV ile standart fenolik bileşenlerin kromatogramı	49
Şekil 20. Deli balın HPLC-UV kromatogramı	49
Şekil 21. <i>Rhododendron</i> çiçeğinin HPLC-UV kromatogramı	49
Şekil 22. Hayvanların 30 gün sonundaki sistolik kan basıncı ortalamaları.....	50
Şekil 23. Hayvanların 30 gün sonundaki diastolik kan basıncı ortalamaları	51
Şekil 24. Sıçanların 30. gün ve 1.gün ortalama ağırlıkları farkı.....	52
Şekil 25. Glukoz sonuçları ve karşılaştırılması	53
Şekil 26. BUN sonuçları ve karşılaştırılması	53

Şekil 27.	AST sonuçları ve karşılaştırılması	55
Şekil 28.	ALP sonuçları ve karşılaştırılması	55
Şekil 29.	CK sonuçları ve karşılaştırılması	56
Şekil 30.	LDH sonuçları ve karşılaştırılması.....	56
Şekil 31.	Karaciğer dokusundaki GSH sonuçları ve karşılaştırılması.....	58
Şekil 32.	Böbrek dokusundaki GSH sonuçları ve karşılaştırılması.....	58
Şekil 33.	Kalp dokusundaki NOx sonuçları ve karşılaştırılması	59
Şekil 34.	Karaciğer dokusundaki NOx sonuçları ve karşılaştırılması.....	60
Şekil 35.	Böbrek dokusundaki NOx sonuçları ve karşılaştırılması.....	60



TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Doğal antioksidanlar.....	14
Tablo 2. Polifenollerin sınıflandırılması.....	16
Tablo 3. Kullanılan cihaz ve gereçler, marka/modelleri	19
Tablo 4. Kullanılan kimyasallar ve satın alındığı firma	20
Tablo 5. Bal numune kodu ve toplandığı bölge.....	22
Tablo 6. Bitki numuneleri ve bilgileri	22
Tablo 7. Optik çevirme açısı için hazırlanan çözeltiler	24
Tablo 8. Prolin analizi için hazırlanan çözeltiler	26
Tablo 9. Toplam fenolik madde miktarı için hazırlanan çözeltiler	27
Tablo 10. Toplam polifenol tayininde yapılan pipetleme işlemi.....	27
Tablo 11. Toplam flavonoid madde miktarı için hazırlanan çözeltiler	28
Tablo 12. Toplam flavonoid tayininde yapılan pipetleme işlemi.....	28
Tablo 13. Demir (III) indirgeme/antioksidan güç FRAP için hazırlanan çözeltiler	29
Tablo 14. FRAP tayininde yapılan pipetleme işlemi.....	30
Tablo 15. DPPH radikal temizleme aktivitesi için hazırlanan çözeltiler.....	30
Tablo 16. DPPH yöntemi için yapılan pipetlemeler	31
Tablo 17. Hazırlanan çözeltiler.....	33
Tablo 18. Deney hayvanları grupları	34
Tablo 19. GSH düzeyinin ölçümü için hazırlanan çözeltiler.....	37
Tablo 20. NOx düzeyinin ölçümü için hazırlanan çözeltiler.....	39
Tablo 21. Balların GTX-III analizi sonuçları	40
Tablo 22. Bitkilerin GTX-III analizi sonuçları.....	41
Tablo 23. Ballardaki polen yüzdeleri.....	42
Tablo 24. Orman gülü ballarının optik çevirme, nem, briks, iletkenlik, pH, renk ve prolin sonuçları	44
Tablo 25. Toplam polifenol, toplam flavonoid, FRAP ve DPPH testleri sonucu	47
Tablo 26. Bal ve <i>Rhododendron luteum</i> çiçeğinin fenolik bileşen kompozisyonu .	47
Tablo 27. Sistolik ve diastolik kan basıncı ortalama sonuçları ve standart sapmaları	50

Tablo 28. Denev hayvanlarının serum parametreleri ölçüm sonuçları.....	54
Tablo 29. Karaciğer ve böbrek dokularındaki GSH testi bulguları	57
Tablo 30. Kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki NO testi bulguları	59



SEMBOLLER DİZİNİ

•	: Radikal
ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü (conversing) enzim
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
Ang II	: Anjiyotensin II
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BH ₄ ,	: Tetrahidrobiyopterin
BHT	: Bütillendirilmiş Hidroksi Toluen
BUN	: Kan Üre Azotu
CAPE	: Kafeik Asit Fenil Esteri
cGMP	: Siklik Guanizin Monofosfat
CK	: Kreatin Kinaz,
CK-MB	: Kalp Kasında Bulunan Kreatin Kinaz İzoenzimi
DAD	: Diyot Dizi (Array) Dedektörü
DKB	: Diastolik Kan Basıncı
DNTB	: 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDHF	: Endotel Türevi Hiperpolarizasyon Faktörü
eNOS	: Konstitütif Endotelial İzofomdur
eNOS	: Nitrik oksit sentaz
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
GLU	: Glukoz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GTP	: Guanozin trifosfat
GTX	: Grayanotoksin
i.p.	: İntraperitoneal
KE	: Kuersetin Eşdeğeri

LC-MS/MS	: Likit Kromatografi -Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
L-NAME	: N- ω -nitro L-arginin-metil ester
L-NMMA	: N-monometil-L-arginin
MH	: Mad Honey
NAC,	: N-asetilsistein
NAD (P) H	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NO [•]	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NO _x	: Nitrik Oksit
oksBH ₄	: Oksitlenmiş Tetrahidrobiyopterin
Quercetin	: 3,3',4',5,7-Pentahidroksi Flavon Hidrat
R.	: <i>Rhododendron</i>
R ²	: Korelasyon Katsayısı
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RP	: Reverse Phase (Ters Faz)
SC ₅₀	: % 50 Scavenging Concentration
SF	: Serum Fizyolojik
SKB	: Sistolik Kan Basıncı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
t.e.	: Tespit Edilemedi
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TEP	: Tetra Etoksi Propan
TF	: Toplam Flavonoid Madde
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TP	: Toplam Fenolik Madde
TPTZ	: 2,4,6-Tri(2-Pridil)-s-Triazin
Troloks [®]	: 6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilkroman-2- karboksilik asit
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü

TTB	: Türk Tabipleri Birliği
U/L	: Ünite/Litre
UV-VIS	: Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi
VSMC,	: Vasküler Düz Kas Hücreleri
WHO	: World Health Organization



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

“Orman Gülü” bitkisi Karadeniz Bölgesi’nde yoğun olarak yetişen çalı tipinde bir bitki olup *Rhododendron ponticum* (mor çiçekli, komar çiçeği), *Rhododendron luteum* (sarı çiçekli, zifin çiçeği) türleri bölgeye endemiktir. Her iki bitkiden nektar ve polen alan bal arısının ürettiği ballar içeriğinde bulunan grayanotoksin (GTX) bileşiklerinden dolayı zehirlidir ve orman gülü balı (deli bal, *Rhododendron* balı) olarak tanınır.

Orman gülü balının geleneksel olarak tansiyon düzenlemede kullanıldığı öteden beri bilinmektedir. Ancak bu balın hipertansiyonla ilişkisi sadece bildirilen vaka sayılarına göre bilinmekte olup araştırmalarımız neticesine GTX-III miktarı bilinen ballarla deney hayvanlarında yapılan geniş kapsamlı bir çalışmaya literatürde rastlanamadı. Balın tüketilmesiyle birlikte öncelikle en önemli belirtiler tansiyon ve nabız düşüklüğü ile birlikte kusma, halüsinasyondur. Ancak kontrollü olarak tüketildiğinde balın kas gevşetici, damar çapını genişletici ve tansiyon düşürücü rolü olduğuna inanılmaktadır. Balın ve orman gülü çiçeğinin anti-hipertansif rolünün ortaya çıkarılması durumunda orman gülü balına rağbet artmasıyla üretilmesi teşvik edilecek, orman gülü bitkisinden de doğal kaynaklı ilaç üretilmesinin yolu açılacaktır.

Bu çalışma ile nitrik oksit sentaz enzim inhibitörü olan L-NAME ile oluşturulmuş deneysel kronik hipertansif sıçanlara GTX içeren orman gülü bitkisinin çiçeklerinin ekstresi ile deli bal oral yolla (gavaj) verildikten sonra deney hayvanlarının Tail-cuff yöntemine göre kuyruk manşetlerinden tansiyonları ölçülerek, bilinen bir tansiyon ilacıyla (Kapril-etken madde kaptopril) kıyaslanması amaçlandı. Ardından serumda bazı biyokimyasal parametreler ve hipertansiyonun zarar vermiş olduğu en önemli organlardan olan kalp, böbrek ve ayrıca karaciğer dokuları üzerine hipertansiyonun oksidatif stres üzerinden organlara etkisini araştırma amaçlandı.

1.2. *Rhododendron* Türleri ve Grayanotoksin-III

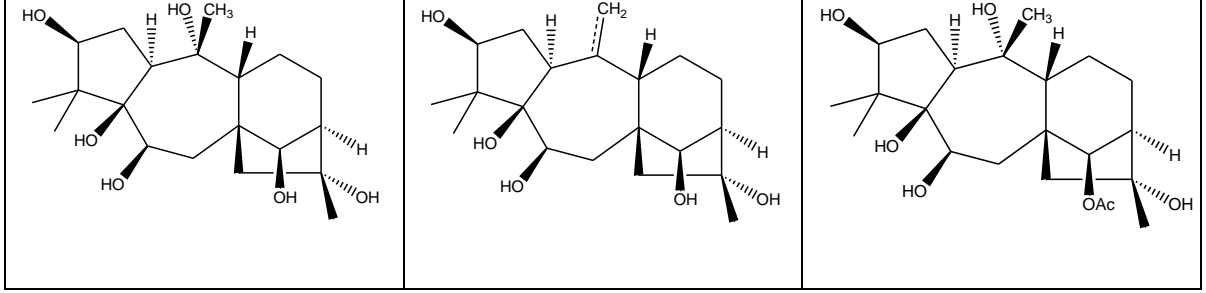
Ülkemizde özellikle Doğu Karadeniz'in dağlık kesimlerinde mor çiçekli “komar” (*Rhododendron ponticum*) ve sarı çiçekli “zifin” (*Rhododendron luteum*) bitkileri geniş bir alana yayılım gösteren toksin ihtiva eden, ormanları tehdit eden istilacı türlerdir (Terzioğlu vd., 2001) (Şekil 1). Öte yandan bunlara ek olarak *R. ungeronii* (beyaz çiçek), *R. smirnovii* (pembe çiçek) ve *R. caucasicum* (Kafkas ormangülü)'un da dahil olduğu deniz seviyesinden yaklaşık 3200m yüksekliğe kadar büyüeyebilen toplamda beş tür ülkemizde sıklıkla görülür (Gunduz vd., 2008).



Şekil 1. *Rhododendron luteum* (sarı) ve *Rhododendron ponticum* (mor)

Grayanotoksinler (GTX), *Rhododendron* bitki türlerinde bulunan ana toksin bileşiklerdir (Wong vd., 2002). Ericaceae familyasından bazı bitkilerin nektar, polen ve yaprak kısımlarında bu toksin grubu görülmektedir (Stevens, 1978). GTX'ler birer diterpenoid olup, azotsuz polihidroksile siklik hidrokarbonlardan oluşur (Lampe, 2009). Aynı zamanda andromedotoksin, acetilandromedol ve rhodotoksin olarak adlandırılır. Su ve yağda çözünebilen GTX'ler uçucu değildir ve 300 °C sıcaklığa kadar bozunma göstermezler. Günümüze kadar 128 çeşit GTX izomeri Ericaceae türlerinden izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmış (Li vd., 2013) olup bunlardan I, II, III izoformları sıklıkla karşılaşılan toksik ajanlardır (Gunduz vd., 2011) (Şekil 2). Grayanotoksin I (andromedotoksin), Grayanotoksin II (desasetilandromedotoksin) ve Grayanotoksin III (desasetilandromedotoksin) baldaki ana toksik izomerlerdir. Grayanotoksin III (GTX-III)

Rhododendron bitki türlerindeki ana toksik izomer bileşik olup grayanotoksin I (GTX-I) ve grayanotoksin II (GTX-II)'nin daha az toksik özellik gösterdiği çeşitli kaynaklarda bildirilmiştir (Wong vd., 2002; Kurtoglu 2014).



Şekil 2. GTX-I, GTX-II, GTX-III bileşikleri

Grayanotoksin (GTX) özellikle hücre zarındaki iyon kanallarında etkilidir. GTX'in toksik etkisinin, voltaj-bağımlı sodyum kanalları ile etkileşiminin bir sonucu olduğu literatürde bildirilmektedir. GTX' in hücre zarı üzerindeki sodyum kanallarına doğrudan bağlanması, membranın sodyum geçirgenliğinde bir artışa yol açar ve bunun bir sonucu olarak, hücrede uzun süreli depolarizasyon (voltaj-bağımlı sodyum kanallarının sürekli açık kalması) meydana gelir (Seyama and Narahashi, 1981). GTX, Na⁺ kanallarının aktivasyonu ile voltaj-bağımlı Ca⁺⁺ kanallarından Ca⁺⁺'nın presinaptik geçirgenliğine yol açar. GTX 'in hücre zarı üzerindeki etkileri hem iskelet hem de kalp kaslarının yanı sıra periferik ve merkezi sinir sistemlerindeki hücreler üzerinde de gözlenir (Gunduz vd., 2006). GTX-I ve GTX-III bunun için ideal yapıya sahiptir.

Bir patente göre *Mollusca apelta* adında bir bitkinin kuru köklerinden ekstrakte edilip saflaştırılan yeni bir grayanotoksin bileşiği rapor edilmiştir ve H₂O₂ ile oksidatif hasara uğrayan vasküler endotelial hücreler üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ve vasküler koruma için ilaçlara dönüştürülebileceği ifade edilmiştir (URL-1). Ayrıca başka patentlere bakıldığında grayanotoksin ve grayanotoksin karışımlarının fareler gibi kemirgenlerle savaşmak için kullanıldığı belirtilmektedir (URL-2, URL-3).

1.3. Orman Gülü (*Rhododendron*) Balı

Ülkemiz, bulunduğu coğrafik konumundan dolayı dünyadaki en zengin ballı bitki florasına sahip ülkelerdendir. Balın bileşimi, arıların ziyaret ettiği çiçeklere ve balın toplandığı alanın hava koşullarına büyük ölçüde bağlıdır (Sahin vd., 2015). *Rhododendron* balı ise Türkiye’de Karadeniz Bölgesi’nde yetişen *Rhododendron* çiçeklerinden bal arıları tarafından üretilen çok sayıda kimyasalın karmaşık bir karışımıdır. (Sahin vd., 2015; Gunduz vd., 2007). Gerek saf ve gerek kestane, ıhlamur ve diğer çiçek ballarıyla karışmış olarak orman gülü balı üretimi yapılmaktadır. Orman gülü balındaki GTX miktarı, balın saflığına (monofloral özelliğine), toplandığı bölgenin coğrafik özelliğine ve tabii tutulduğu işleme bağlı olarak değişim gösterdiği belirtilmektedir. Ülkemizde Mayıs-Haziran aylarında yapılan hasat ile kendine has aroması ve tadı olan bu bal içeriğinde doğal olarak bulunan *Rhododendron* kaynaklı grayanotoksin bileşikleri içermektedir (Oztasan ve Songur 2007). Deli balın literatürde genellikle yerel arıcıların ifadelerine göre “Orman Gülü Balı” olarak toplandığı belirtilmektedir. Ancak polen analizi ile birlikte örneklerdeki orman gülü polen frekanslarının farklı olduğu ve balın monofloral özelliği belirlenebilir. Balın toksisite derecesi yıllara göre mevsimsel olarak değişiklikler göstermektedir. Balın içerdiği toksin miktarı ve tüketilme derecesine bağlı olarak zaman zaman bal zehirlenmeleri ile sağlık kuruluşlarına başvuran çok sayıda vaka ile karşılaşmaktadır. Literatürdeki zehirlenme vakaları genelde Türkiye kökenli ballarda kendini göstermektedir (Ozhan vd., 2004). Deli bal zehirlenmeye neden olduğu için bölgede tutan bal, ağu balı, yabancı bal, acı bal ve dünyada yaygın olarak “Mad Honey”, “Deli Bal” olarak bilinmektedir. Maejima vd., (2003) tarafından yapılan çalışmaya göre toksin sodyum kanallarını kademeli olarak etkilemektedir. İlk aşamada grayanotoksin, voltaj bağımlı kanalların açılma fazında kanallara bağlanır ve modifikasyona uğrayan kanalların inaktivasyonunu (kapanmasını) engeller. Son aşamada modifiye olmuş (açılmış) sodyum kanallarının aktivasyon potansiyeli, sodyum kanalının hiperpolarizasyonuna (iyonlarının hücre içinden hücre dışına fazla çıkışı) neden olur. Bunun sonucunda, grayanotoksinlerin (GTX’ler) varlığına bağlı olarak ishal, terleme, baş dönmesi, bilinç, senkop, diplopi ve bulanık görme, bradikardide değişikliklere ve hipotansiyona yol açar (Sahin vd., 2015). Ayrıca Ohgaki vd., (1987) GTX-III’ün intraperitoneal (0,10-0,25 mg / kg bw) uygulanması ile hayvanların genel davranışları üzerindeki etkiyi araştırmış, GTX’ in doza bağlı bir şekilde anlamlı ve geri dönüşümlü kas gevşemesi ile sonuçlandığını yayınlamıştır. Orman

gülü bitkilerinde (*R. poticum* ve *R. luteum*) ve deli baldaki GTX miktarı çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Deli bal zehirlenmesine maruz kalmış kimselerin tükettiği orman gülü ballarındaki GTX-III miktarı LC-MS/MS ile ölçülmüş ve 10-80 µg GTX/g arasında olduğu gösterilmiştir (Sahin, 2015). Genelde belirtiler yaklaşık 50 g balın yenilmesinden 1-2 saat sonra ortaya çıkar ve zehirlenme kritik değilse 12-24 saat içinde düzelir. Toksinler özellikle dolaşım, solunum, sindirim ve merkezi sinir sistemlerini etkiler (Biberoglu vd., 1988). *Rhododendron ponticum* toksininin bu ölümcül felç etkisi 2009 yılında Sherlock Holmes filminde gerçek etkileri ile doğru bir şekilde gösterilmemesine rağmen yer almıştır (URL-4).

Orman gülü balı zehirlenmesi Türkiye’de Karadeniz Bölgesi’nde yaygın olarak görülmekle birlikte, Almanya, Avusturya, Amerika ve Kore’den de bildirilen olaylar beraberinde popüleritesi de artmaktadır. Bradikardi ve hipotansiyon gibi ciddi kardiyak yan etkiler aşırı doz *Rhododendron* balının tüketimi ile görülebilir. Özellikle kardiyovasküler tesirleri nedeniyle bu tür gıda zehirlenmeleri yaşamı tehdit edici olabilir (Cetin vd., 2009). Na⁺ ve K-ATPaz kanalının modifikasyonu da bu durumların en yaygın nedenidir. “Kardiyotoksisite “ olarak da adlandırılan Na⁺ / K⁺ modifikasyonunun en önemli sonucu, CK, CK-MB, troponin T, AST, ALT, LDH ve troponin I gibi kan serumu biyobelirteç seviyelerinin değişimidir (Sahin vd., 2015). Ayrıca Silici vd., (2014), *Rhododendron* balı ile beslenen sıçanlardaki biyokimyasal antioksidan parametreler üzerine GTX’ in etkisini değerlendirmiş, bu araştırmanın sonucunda hem grayanotoksin hem de yüksek doz *Rhododendron* bal tedavilerinin incelenen kan plazması ve organ dokuları üzerinde oksidan etki gösterdiği belirlenmiştir.

1.4. Hipertansiyon

Hipertansiyon; yüksek kan basıncı; günümüzde çok yaygın görülen, vücudu sistemsel olarak etkileyen ve kalp-damar rahatsızlıklarına bağlı morbitide ve mortaliteye yol açan kardiyovasküler bir hastalıktır (Gün ve Korkmaz, 2014). Dünya sağlık örgütüne (DSÖ) (WHO, World Health Organization) göre kan basıncı; vücuttaki ana kan damarlarının duvarlarına kan dolaşımıyla uygulanan güçtür. Hipertansiyon ise kan basıncının kuvveti aşırı olduğunda ortaya çıkar. Kan basıncı iki sayı olarak yazılır. İlk (sistolik) sayı, kalp kasıldığında veya attığında kan damarlardaki basıncı temsil eder. İkinci (diastolik) sayı, kalp atımlarının arasındaki damarlardaki basıncı temsil eder. İki farklı

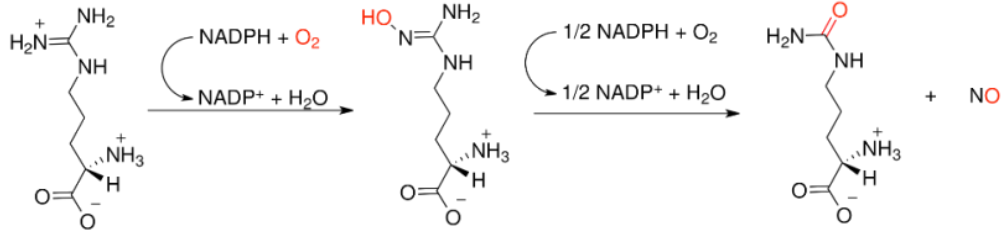
günde ölçüldüğünde, her iki günde sistolik kan basıncı değerleri ≥ 140 mmHg ve / veya her iki günde diastolik kan basıncı değerleri ≥ 90 mmHg ise hipertansiyon tanısı konur. Hipertansiyon, dünyadaki 8 ölümden birinin sorumlusu tutulan en öldürücü 3. hastalıktır. Dünya çapında 1,13 milyar insanda görülen hipertansiyon (her 4 erkekten birinde ve her 5 kadından birinde) görülebilen bu hastalık DSÖ'ye göre kontrol altına alınabilen bir hastalıktır. Hipertansiyon hastalarının sadece bir kısmı hipertansif olduklarının farkında olmakla beraber farkında olanların da bir kısmı düzenli tedavi olmaktadır. Kalp krizi, inme, böbrek yetmezliği ve körlüğe sebep olabileceğinden kan basıncının kontrol altına alınması bu olumsuz sonuçların önlenmesi için çok önemlidir (URL-5). Ayrıca, Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği'nin yaptığı Türkiye Hipertansiyon Prevalans Çalışması (THPÇ) verilerine göre, Türkiye'de 3 kişiden 1'inde hipertansiyon olduğu belirlenmiştir (Önal ve Tümerdem, 2001). Son yıllarda yaşanan koşullar, teknoloji ve beslenme şekli nedeniyle oluşan stres faktörlerinin hipertansiyon teşekkülü için alt yapı oluşturduğu bildirilmektedir. Ancak hipertansiyonun gelişimi ve buna katkısı olan faktörler henüz tam olarak aydınlatılamasa da bazı faktörler ön plana çıkmaktadır. Bunlar:

- Kalp debisi artışı (Vücuttaki sıvı hacminin artması ve kalbin kasılabilirliğinin artması.)
- Periferik direnç artışı (Damar çapı genişlemesi ve buna bağlı olarak damar duvarındaki yapısal kalınlaşma.)
- Sıvı hacmi ve kan hacmi artışı (Aşırı sodyum alımı ve şişmanlık.)
- Stres ve aşırı sempatik aktivite (Hipertansif ebeveyn ve sürekli psikojenik stres.)
- Renin anjiyotensin sistemi (Renin aktivitesi.)
- Endotel (Kan ve lenf damarlarının iç yüzünü oluşturan doku) disfonksiyonu (Endotelin ve NO eksikliği) (Kolay, 2011).

1.5. Nitrik Oksit (NO•) ve Nitrik oksit Sentaz (NOS)

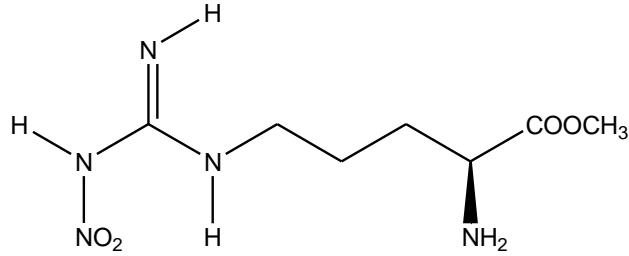
NO• doğada ve organizmada varlığı çok eskiden beri bilinen kısa ömürlü (2-30 sn) bir radikal olup L-argininin L-sitrüline dönüşümü sırasında açığa çıkmaktadır (Şekil 3). Doğada asit yağmurları, elektrik trafoları ve zehirli egzoz gazları içerisinde bulunmaktadır. Vücutta hemen hemen tüm organ ve sistemlerde yer alan NO•, fizyolojik

konsantrasyonlarda, değişik biyolojik etkilere (gastrointestinal sistem, merkezi sinir sistemi, immünolojik temizleme reaksiyonları, miyokard fonksiyon bozukluğu vb.) sahiptir (Çekmen vd., 2001).



Şekil 3. NOS enzimi katalizli NO[•] oluşumu (URL-6)

NO[•]'nun oluşumunda L-argininin L-sitrüline dönüşümünü sağlayan bu reaksiyonu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi gerçekleştirmektedir. NOS'un genetik olarak farklı üç izoformundan biri de düşük konsantrasyonlarda üretilen ve damar tonüsünü ayarlayan bir konstitüif endotelial izoformudur (eNOS) (Çekmen vd., 2001).



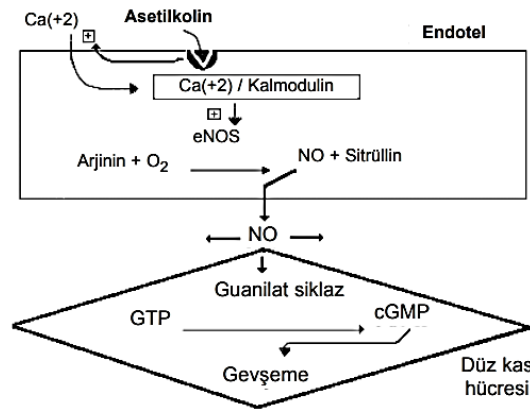
Şekil 4. N-ω-nitro L-arginin-metil ester(L-NAME)

Yapılan çalışmalarda L-argininden NO sentezi yolu aydınlatılmaya çalışılırken L-arginin analoglarının bu yolu inhibe ettiği görölmüştür. İnhibitör etkisi ilk gözlenen L-arginin analogu, yapısında metil grubu ihtiva eden N-monometil-L-arginindir ve yarışmalıdır (L-NMMA). L-NMMA dışında L-arginin amino asidinin yapısına çeşitli gruplar dahil edilerek değişik L-arginin analogları oluşturulmuş ve bunlardan bir diğeri de N-nitro L-arginin-metil ester(L-NAME) dir (Şekil 4) (Bruhwyler vd., 1993, Moncada vd., 1991).

1.6. Endotel Hücrelerinde L-NAME Kaynaklı Nitrik Oksit Eksikliği

Endotel hücreleri, arterler (atar damar), venler (toplar damar), kapillerler (kılcal damar) ve lenf damarlarının iç yüzeyini kaplayan tek sıra poligonal hücrelerdir. Endotel tabakası metabolik olarak oldukça aktif bir doku olup, sürekli humoral ve hemodinamik uyarılar ile karşılaşır. Endotel hücreleri salgıladıkları vazoaaktif (damarlarının çapı üzerine etki gösteren) maddeler, büyüme faktörleri ve büyüme inhibitörleri ile koagülasyonu, fibrinolizisi, hücre proliferasyonu, inflamasyonu ve damar tonusunu, dolayısıyla kan akışını ve kan basıncını düzenlemektedir (TTB, 1994). Endotelden salgılanan vazodilatör (damar genişletici) ve vazokonstriktör (damar daraltıcı) maddeler arasındaki etkileşim ya da denge vasküler tonusun regülasyonunu sağlar (Anderson, 1999).

Küçük bir gaz molekülü olan nitrik oksit radikali (NO^\bullet) nitrik oksit sentaz enzimi katalizliğinde L-argininden sentezlenir ve insan organizmasındaki neredeyse tüm organ ve doku sistemlerinde, çok geniş ve farklı alanlarda fizyolojik ve patolojik etkilere sahiptir. Organizmadaki NO^\bullet miktarı endotelyum disfonksiyonunu etkileyen sebeplerden biri olmakla beraber ve eksikliği hipertansiyonun gelişmesinde rol oynamaktadır. NO^\bullet hem bazal şartlarda salgılanarak sürekli damar tonusunu düzenlemekte, kan basıncının regülasyonunda rol oynamakta ve hem de çeşitli egzojen ve endojen uyarılarla salgılanabilmektedir. (Gürdal ve Ademoğlu, 2005; Onat vd., 2002).



Şekil 5. Damar duvarında NO^\bullet 'nun oluşumu ve etki mekanizması (Çekmen vd., 2001)

Haberçi bir molekül olan asetilkolin, endotel hücre üzerinde bulunan reseptörüne

yapıştır. Bu impulsla Ca^{++} iyon kanalları açılır, hücre içindeki Ca^{++} düzeyi yükselir. Ardından kalmoduline artan Ca^{++} 'lerin bağlanmasıyla oluşan kompleks, yapısal bir katalitik molekül olan eNOS'ı uyarır ve L-arginin'den NO^{\bullet} ile sitrüllin oluşur. Oluşan NO^{\bullet} , endotelden çıkar ve komşu düz kas hücrelerine girer. Düz kas hücrelerinin sitozolindeki guanilat siklaz hem gurubundaki demire bağlanır, onu aktifleştirir ve GTP'den (guanozin trifosfat) cGMP (siklik guanozin monofosfat) oluşumunun artmasına neden olur. Artan cGMP ise düz kasların gevşemesine ve damarlarda vazodilatasyona (damar genişlemesine) neden olur (Şekil 5) (Marletta, 1993).

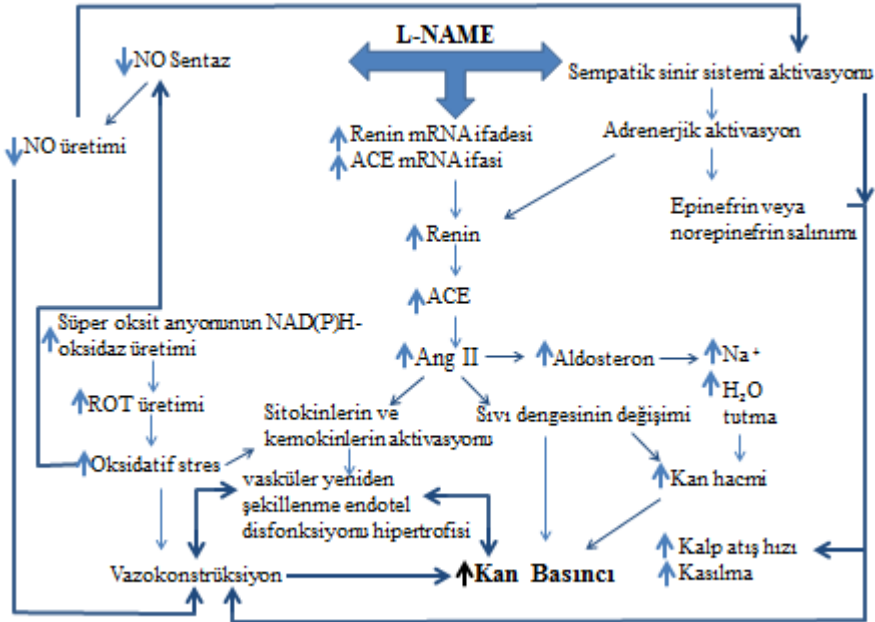
Araştırmalar; hipertansiyonlu kişilere, L-arginin veya NO^{\bullet} donörleri verilerek kan basınçlarının düştüğünü, NOS inhibitörleri (L-arginin analogları (L-NAME vb.), NAD(P)H, NADH oksidaz, calmodulin, GTP, düşük Ca^{++} vb.) verilerek yükseldiğini göstermektedir (Marletta, 1993; Knowles ve Moncada, 1994).

Dünyada önlenebilir ölüm nedenleri dahilinde başta gelen risk faktörlerinden biri olan hipertansiyon; artan oranda ve önemli bir tıbbi halk sağlığı problemidir. Yaygınlığı kültürel, coğrafik, beslenme ve genetik faktörleri temelinde büyük değişkenlikler göstermekle birlikte, özellikle önde gelen ülkelerde toplumdaki en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Kan basıncının normal kabul edildiği değerlerin sınırların üzerinde çıkması olarak tanımlanan hipertansiyon; beyin, böbrek ve kalbin de içinde olduğu sistemlerle beraber birçok basınç mekanizmalarının doğrudan ya da dolaylı katkıları sonucu gelişen dinamik bir sendromdur (Izzo vd., 2003).

Sıçanlar gibi deney hayvanlarında kronik hipertansiyon hastalığı oluşturmak için kullanılan ilk NOS inhibitörü bir L-arginin analogu olan L-NAME'dir (Zats ve Baylis, 1998; Gardiner vd., 1992). L-NAME'nin suda çözünebilmesi ve içme suyuyla kolayca hayvanların içebilmesi sebebiyle kronik hipertansiyon hastalığı oluşturmak için L-NAME'nin yaygın olarak kullanılmasının yolu açıldı. Bunun dışında L-NAME'nin intraperitoneal(i.p.) enjeksiyonuyla da sıçanlarda kronik hipertansiyon oluşturulabilir (Sakuma vd., 1995). L-NAME, NO sentezinin engellemekte, sistemik kan basıncını yükseltmekte ve renovasküler parankimal hasara (böbrekteki arter(ler)in) darlığının neden olduğu, yüksek kan basıncı ile karakterize klinik bir durum yol açmaktadır (Bruhwyler vd., 1993). Bu durumun bir şablonu olarak bir organizmaya L-NAME verildiğinde kan bas Ruiz-Ruiz vd., 2017incinin artması Şekil 6'da "Kan basıncının N- ω -nitro-L-arginin metil ester modülasyonu" olarak özetlenmektedir.

L-NAME etkilerinin toplamı, endotel disfonksiyonu, yeniden modelleme ve

hipertansif bir durumla sonuçlanan hipertrofidir. L-NAME, NO•'nun ayrılmasını ve NO•'nun azalmasına ve sonuç olarak vazokonstriksiyona (damarların daralmasına) neden olur. Renin andgiotensin sisteminin L-NAME ile aktivasyonu, renin ve ACE' nin mRNA ekspresyonunu artırır. Bu, Ang II' nin yükselmesiyle sonuçlanır ve süper oksit anyonunun artan NAD (P) H-oksidadz üretimi ve ROT (reaktif oksijen türlerinin) üretimi, artmış aldosteron, sıvı dengesinin değiştirilmesi ve sitokinlerin ve kemokinlerin aktivasyonunu içerir. Ang II ayrıca vazokonstriksiyonu doğrudan uyarır ve kan basıncını artırır. Sempatik sinir sisteminin aktivitesinin uyarılması, artmış kalp atış hızı, kasılma ve vazokonstriksiyon ile sonuçlanır (Lane, 2012).



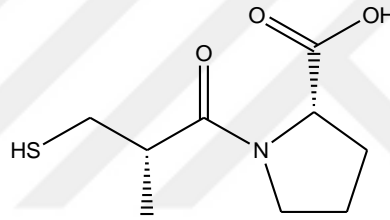
Şekil 6. Kan basıncının N-ω-nitro-L-arginin metil ester modülasyonu

Doğal ürünler kullanılarak oksidatif stresin azaltılması, hipertansiyonun önlenmesi ve tedavisi literatürde birçok kaynakta yer almaktadır. Aekthammarat vd., (2019), Moringa oleifera yapraklarının (MOE) sulu ekstraktının vasküler fonksiyon ve antioksidan özelliklerinin modülasyonu yoluyla N-nitro-L-arginin-metil ester (L-NAME (50 mg/kg/gün)) kaynaklı yüksek kan basıncını azaltıp azaltmayacağını araştırdı. Başka bir çalışmada da yine L-NAME (40 mg/kg/gün) ile uyarılarak hipertansiyon oluşturulup Carthamus tinctorius sulu özütü ve kaptopril (5 mg/kg/gün) ratlara verildi Carthamus

tinctorius ekstresi ve kaptoprilin antihipertansif etkilerinin sinerjik olduğunu göstermiştir (Maneesai, vd., 2016). Benzer bir çalışma olarak Piper sarmentosum (L-NAME (100 mg / kg / gün)) ile yapılmış ve bitkinin antihipertansif etkisinin olduğu bildirilmiştir (Alwi vd., 2018). Başka bir çalışma da (Gulhan, 2019) apiterapi ürünlerinin (propolis ve polen) L-NAME kaynaklı hipertansif erkek sıçanların üreme fonksiyonları üzerindeki terapötik ve koruyucu etkilerini araştırmıştır. Sonuç olarak artan kan basıncının düzenlenmesinde doğal arı ürünleri olan propolis ve polen etanolik ekstraktlarının etkili olduğu belirlenmiştir. Propolis veya polenin hipertansiyona yol açan enflamatuar yolların işleyişini inhibe ederek üreme fonksiyonunu düzenlemeye yardımcı olduğu bildirilmektedir.

Deli balın halk arasında tansiyon düzenlemede kullanıldığı bilinmektedir. Ancak bu balın hipertansiyonla ilişkisi sadece bildirilen vaka sayılarına göre bilinmekte olup GTX-III miktarı bilinen bir balla deney hayvanlarında yapılan mevcut bir çalışma bulunmamaktadır. Bu teze referans olan makalelerden biri Oztasan ve Songur (2007), yaptığı çalışmada kontrol (A), hipertansiyon indüksiyonu sonrası (B) ve hipertansif sıçanlara deli bal uygulanması (C) olmak üzere sıçanlardan 3 grup oluşturmuştur. Deli bal uygulamasından sonra kan basıncının ve kalp atış hızı sonuçlarının azaldığını gözlemlemiştir. Doğu Karadeniz halkı tarafından alternatif ilaç olarak kullanılan deli balın düşük dozlarda hipertansiyon gibi hastalıkların tedavisi için uygun olabileceğini belirtmiştir. Çay yapımında orman güllerinin yaprak, çiçek ve nektarı kısımlarının kullanılmasıyla grayanotoksinlerin yutulması da alternatif olabileceğini belirtmiştir. Küçük dozlarda deli balın yararlı kullanımı mümkündür. İçeriği belirlemek, faydalı dozajı değerlendirmek ve deli balın hipertansiyon üzerindeki etkilerinin kesin mekanizmasını netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyacın olduğunu belirtmiştir. İkinci bir makale olan (Tata vd.,2019), Senecio serratuloides bitkisinin hidroetanol ekstraktının sıçanlarda N-Nitro-L-arginin metil ester (L-NAME (40 mg / kg / gün)) ile oluşturulan hipertansiyondaki antihipertansif etkilerini araştırmayı amaçlanmıştır. Biri kontrol olmak üzere 5 grup oluşturmuştur. Kontrol haricindeki grupların hepsine L-NAME verilip kronik hipertansiyon modeli oluşturulmuştur. Bir grup L-NAME grubu, bir grup kaptopril grubu (diğer referans makaleden farkı), bir grup düşük doz bitki ekstresi grubu, bir grup da yüksek doz bitki ekstresi ile beslenmiştir. Sonuçta Senecio serratuloides' in hidroetanol (%70 etanol-su) özütünün, sıçanlarda antihipertansif, tedavide yararlılığını ve antihipertansif ilaç geliştirme potansiyeli doğrulanmıştır.

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar kalsiyum kanal blokörleri, diüretikler, renin anjiotensin aldesteron sistemini etkileyen ilaçlar, vazodilatörler vb. gibi ilaçlardır. Renin anjiotensin aldesteron sistemini etkileyen ilaçlar ACE (Anjiotensin conversing enzim) inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Renin anjiotensin aldesteron sistemi, kan basıncını etkileyen bir sistemdir. Böbrekler kan hacmini değiştirerek kan basıncının kontrolüne katkısı olmaktadır. Böbreklerdeki baroreseptörler kan basıncı azaldığında; böbreklerde sentezlenen renin enziminin salgılanmasını sağlar. Renin enzimi anjiotensin I'e çevirir. Anjiotensin I enzimi de anjiotensin çevirici enzim tarafından anjiotensin II'ye çevrilir. Anjiotensin II güçlü vazokonstriktör (damar daraltıcı) maddedir, damarların daralmasıyla kan basıncı artmış olur. Aldesteron hormonunun salgılanmasını uyarır. Aldesteron ise böbreklerden tuz-su atılımını azaltır ve tuz ve su vücutta tutulmuş olur. Böylece vücutta sıvı hacmi artar, damarlar daralır ve kan basıncı artar.



Şekil 7. Kapril (1-(3-Mercapto-2-metil-propionil)-pirrolidin-2-karboksilik asit)

Hipertansiyonun tedavi sürecince anjiotensin sistemini etkileyen ACE inhibitörleri ve anjiotensin II'nin antagonistleri kullanılır. Tedavide kullanılan ilaçlardan bazıları kapril, (kaptopril) (Şekil 7) ve Enarapril (enapril) olmakla beraber bu tezde L-NAME ile oluşturulmuş hipertansif deney hayvanlarının tansiyonlarını düşürmek için intraperitoneal yoldan (karın zarı boşluğuna) kapril enjekte edildi. Bu ilaçlar anjiotensin I'i anjiotensin II'ye çeviren enzimi bloke ederek vazodilatasyon (damar genişlemesi) oluşturur, aldesteron sekresyonunu ve Na⁺ ve su tutulumunu azaltarak tansiyon düşürmeye yardımcı olur. (URL-7)

1.7. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar & Hipertansiyonla İlişkisi

Dış orbitallerinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden atom ya da moleküllere ‘radikal’ denir ve yapının üzerine konan bir nokta (•) işareti ile gösterilir. Serbest radikaller oksijen veya nitrojen kaynaklı olabilir. Bunlardan reaktif oksijen türleri arasında süperoksit (O_2^{\bullet}), hidroksil (OH^{\bullet}), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksil ($RCOO^{\bullet}$) radikalleri sayılabilir. Reaktif nitrojen türlerini ise nitrik oksit (NO^{\bullet}) ve peroksinitrit (NO_2^{\bullet}) oluşturur (Karabulut ve Gülay, 2016). En tehlikeli radikal hidroksil radikali (OH^{\bullet}) olmakla beraber renksiz ve son derece zehirli bir gaz olan nitrik oksit (NO^{\bullet}) de küçük bir radikaldir ve yarı ömrü çok kısadır.

Oksidatif stres (reaktif oksijen türleri ile meydana gelen stres), çeşitli patolojik durumlarda bulunan vasküler disfonksiyon gelişiminde önemli bir sebeptir ve hiperkolesterolemi, ateroskleroz, diyabet, hipertansiyon, hipoksi, iskemi reperfüzyon hasarı ve kalp yetmezliği gibi birçok kardiyovasküler hastalığın patogeneğinde rol oynar (Arts ve Hollman 2005; Luangaram vd., 2007).

Reaktif oksijen türleri endotelyumdan vazodilatör moleküllerin (nitrik oksit, prostasiklin, endotel türevi hiperpolarizasyon faktörü veya EDHF) azalmasına ve vazokonstriksiyon hormonlarının salgılanmasının artmasına neden olur (endotelin-1, anjiyotensin II, ürotensin II, tromboksan A2, izoprostanlar) ve vazomotor tonusta bir değişikliğe yol açar (Rodrigo vd., 2013). Artan O_2^{\bullet} oluşumu NO^{\bullet} 'nun hızla azalmasını ve endotel disfonksiyonunun uyarılmasını tetikler (Ardanaz ve Pagano, 2006). Reaktif oksijen türlerinin yüksek konsantrasyonu vasküler düz kas hücrelerinin sayısını, kasılmasını, vasküler duvardaki iltihabı artırır ve lipit peroksidasyonuna ve proteinin hücre dışı matriste birikmesine neden olur (Touyz, 2005). Vasküler duvardaki bu değişikliklerin bir sonucu olarak, kan basıncı artar ve endotel disfonksiyonu meydana gelir. Endotelial disfonksiyon kardiyovasküler hastalıkların ilk aşaması olarak kabul edilir.

Radikallerin canlılarda meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Antioksidanlar, radikallerin etkisiyle meydana gelen oksidasyonu yavaşlatan veya durduran ya da oluşmasını engelleyen her türlü moleküle denilmektedir (Young ve Woodside, 2001).

Antioksidanlara genel olarak bakıldığında doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki başlık altında toplanabilirler. Bunlardan çok geniş bir aile olan doğal antioksidanlar ise enzimatik olanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılır (Tablo 1).

Tablo 1. Doğal antioksidanlar

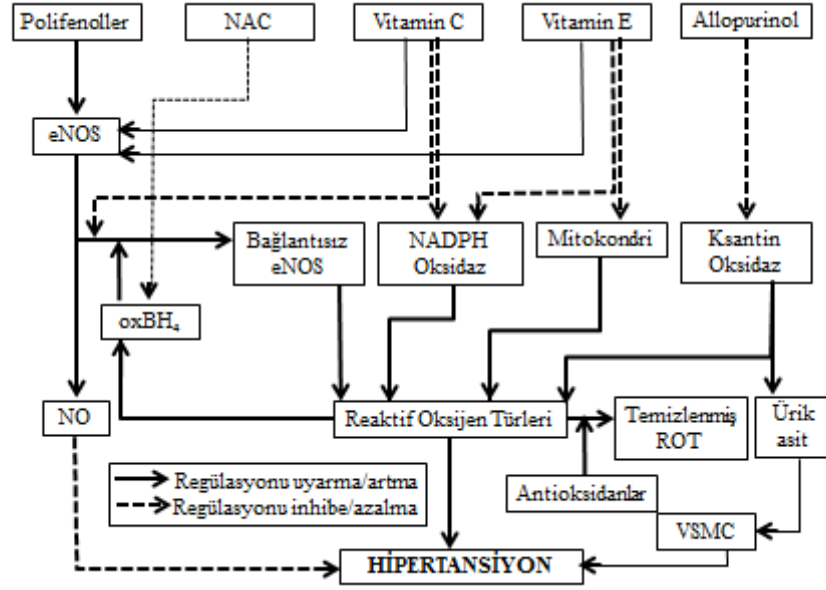
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	Endojen Antioksidanlar	Eksojen Antioksidanlar
Süperoksit Dismutaz		
Katalaz		
Glutasyon Peroksidaz	Glutasyon(GSH)	Askorbik Asit (C Vitamini)
Glutasyon Redüktaz	Ürik Asit	Tokoferoller
Glutasyon-S-Transferazlar	α -Lipoik Asit	Karotenoidler
Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz	Laktoferrin, Ferritin	Folik asit
	Bilirubin	Polifenoller
	Melatonin	

Oksidatif hasar miktarının doğrudan antioksidanların mevcudiyeti ile ilişkili olduğunu belirtmek önemlidir. Enzimatik olan antioksidanların en bilinenleri süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx) katalazdır. SOD'ların antioksidan savunma mekanizmasındaki rolü, süperoksit anyonunun moleküler oksijene ve H₂O₂'ye hücresele düzeyde dismutasyonunu katalize eden metaloenzimlerdir. Katalaz ise H₂O₂'yi iyi huylu oksijene ve suya dönüştürür, SOD ile birlikte çalışır (Naziroglu vd., 2012). Katalaz gibi, glutasyon peroksidaz da glutasyonun glutasyon disülfite oksidasyonu ile H₂O₂'yi temizler ve suya indirger. Ayrıca glutasyon peroksidaz lipit peroksidleri ve lipit alkollerini de azaltabilir. (Lane, 2012).

Enzimatik olmayan antioksidanlar da oksidatif stresle mücadelede çok önemlidir. Bunlar arasında endojen antioksidanlardan indirgenmiş glutasyon (GSH), bilirubin, ferritin, melatonin ve α -lipoik asit; eksojen kaynaklı antioksidanlardan ise askorbik asit, α - tokoferol, karotenoidler, polifenoller en çok bilinenlerdir. Bu antioksidanlar reaktif oksijen türlerine (ROT) ve zararlı etkilerine karşı önemli ölçüde koruma sağlar ve hipertansiyonu, oksidatif kaynaklı yeniden biçimlenmeyi ve ateroskleroza azalttığı literatürde belirtilmektedir.

Oksidatif stresin hipertansiyonun patofizyolojisinde rol oynadığı görüşünü destekleyen kapsamlı kanıtlar vardır. Antioksidanlar ile ROT arasındaki denge hastalıkların önlenmesi açısından çok önemlidir. Kardiyovasküler sistemde ROT yükselmesi endotel disfonksiyonu gibi zararlı etkilere yol açar (August ve Suthanthiran, 2006). Antioksidanların hipertansiyonda azalan endotel işlevlerini düzeltebilmesi, artan

oksidan stresin NO azalmasına neden olabileceğini akla getirmiştir. (Gürdal ve Ademoğlu - 2005, Onat vd., 2002). Bununla birlikte, antioksidanların ve polifenollerin diyetle tüketimi, yüksek tansiyonun birincil olarak önlenmesini veya azalmasını sağlayabileceği bildirilmektedir (Şekil 8), (Rodrigo vd., 2011).



Şekil 8. Ekzojen antioksidan mekanizmalarının anti-hipertansif etkilerinin şematik özeti (NO: nitrik oksit; eNOS: nitrik oksit sentaz; ROS: reaktif oksijen türleri; BH₄: tetrahidrobiopterin; oksBH₄: oksitlenmiş tetrahidrobiopterin; NAC: N-asetilsistein; VSMC: vasküler düz kas hücreleri) (Rodrigo vd., 2011).

Ekzojen antioksidanlardan biri olan polifenoller de birden fazla hidroksil kökü içermektedir. Polifenoller fenolik asitler, flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olarak üç alt grupta incelenebilir (Tablo 2).

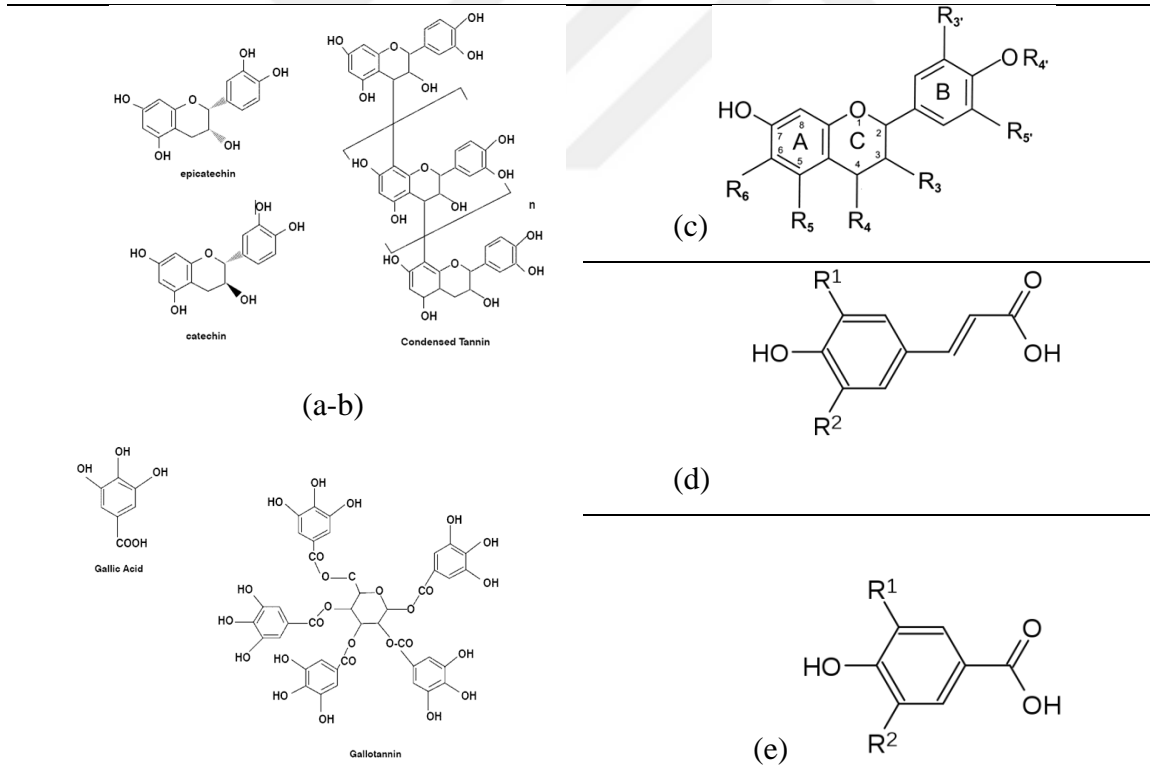
Polifenollerin işlevine bakıldığında molekülün yapısıyla antioksidan kapasite ilişkilidir. Fenolik bileşiklerin ihtiva ettiği -OH grubu sayısı; flavonoidlerin ise B halkasındaki gruplardan 5-OH, 3-OH ve 4-OH gruplarının bulunması antioksidan aktiviteyi artırma yönünde etki gösterir.

Tanenler ise çok sayıda hidroksil grubu ve fonksiyonel grup içermektedir (Şekil 9 (a-b)) (Cotella vd., 1996; Çimen, 1999). Antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikarsinojenik, antiviral bu metabolik üstünlüklerin sadece birkaçı olarak literatürde yerini almıştır (Ruiz-Ruiz vd., 2017; Ahmed ve Othman, 2013; Pasupuleti vd., 2017).

Tablo 2. Polifenollerin Sınıflandırılması

Polifenoller		
Flavonoid olmayan	Flavonoidler	Fenolik Asitler
Hidrolizlenebilir Tanenler	Flavonoller	Hidroksisinnamik asit türevleri
Kondanse Tanenler	Flavonlar	Hidroksibenzoik asit türevleri
	İzoflavonlar	
	Flavononlar	
	Antosiyaninler	
	Flavanoller	

Bahsi geçen metabolik üstünlüklerin sorumlu ajanları olarak bilinen bileşenler fenolik asitler ve flavonoidlerdir (Can vd., 2015).



Şekil 9. (a-b)kondanse ve hidrolizlenebilir tanenler, (c) flavonoidler, (d) hidroksisinnamik asit, (e) hidroksibenzoik asit genel yapıları

Yararlı bir besin maddesi olan balın kimyasal içeriği, bitki florası, iklim, yükselti, çevresel faktör gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Sahin, 2015).

Orman gülü bitkisinin ve balının hem fenolik bileşenlerce zengin olması hem de yapısında bulunan diterpenoidlerle (GTX) ve antioksidan bileşiklerle birklikte antioksidan, antiinflamatur ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu da bilinmektedir (Malkoç vd., 2016). Doğal ürünlerin TP'si antioksidan potansiyellerinin önemli bir göstergesidir. Sahin vd., (2014) on adet deli bal örneğinin toplam polifenol miktarı modifiye Folin-Ciocalteu testini kullanmış, toplam polifenol miktarının belirlenmesinin antioksidan aktiviteyi belirlemek için yeterli olmadığını belirten bu çalışma DPPH, FRAP gibi iyi bilinen bazı ek antioksidan analizler kullanmayı uygun görmüştür. Mahomoodally (2020) yaptığı çalışmada *R. luteum*'un etil asetat, metanol ve su özütleri hazırlamış, in vitro antioksidan özellikleri açısından araştırma yapmış ve *R. luteum*'un metanol ve su ekstraları en yüksek DPPH radikalini süpürme ve azaltma özelliklerine sahipken yine metanol ve su ekstralarının FRAP değerlerinin etil asetata göre yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğunu bildirmiştir.

Şahin (2014), altı adet bal örneğinde on yedi standart fenolik bileşeni RP-HPLC-UV kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak analiz etmiş genel manasıyla farklı oranlarda dokuz adet fenolik bileşene rastladığını ifade etmiştir. Bunlar p-OH benzoik asit ana fenolik bileşik olmak üzere gallik asit, kafeik asit, protokatekuik asit, vanilik asit, p-kumarik asit, apigenin, ferulik asit, kuersetindir.

Can vd., (2015), Türk ballarının incelenmesi çalışmasında kullandığı altı deli balın antioksidan kapasite testlerinde çalışmadaki açık renkli akasya ve yonca gibi çiçek balları gibi düşük fenolik içerik gösterdiğini belirlemiştir. Ayrıca toplam antioksidan kapasitenin ballarda bulunan münferit fenolik bileşiklerin güçlerin toplamı olduğunu öne sürmüştür. On sekiz standart fenolik bileşeni RP-HPLC-UV kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak analiz etmiş, ormangülü balının ana fenolik bileşenin p-OH benzoik asitken, p-kumarik asit, kafeik asit seviyelerinin daha düşük olduğunu tespit etmiştir.

DPPH• süpürme etkinliği, SC₅₀ olarak temsil edilen doğal ürünlerde bileşiklerin serbest radikal süpürme kabiliyetinin taranması için popüler bir yöntemdir ve radikallerin% 50'sinin süpürülmesini sağlayan ürün konsantrasyonunu temsil eder. Buratti (2006) yaptığı çalışmada on iki bal kullanmış, orman gülü balı olarak beş tane bal çalışmada yer almıştır. Deli balın diğer bal türleri arasında en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirilmiştir.

Bir stres faktörü olan hipertansiyon doku ve organlarda serbest radikal üretimi ve oksidatif strese sebebiyet verebilmektedir. Bu tür stres ürünlerinin etkileri endojen veya ekzojen antioksidan maddeler tarafından giderilebilir. Hipertansiyon etiyojisi henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte, sistemik olan bu rahatsızlığın tedavisindeki amaç kan basıncının düşürülmesi ile diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin ortadan kaldırılması, hedef organlardaki hasarların durdurulması veya yavaşlatılması, aterosklerozun önlenmesi ile birlikte insanların yaşam niteliklerinin artırılmasıdır (Mancia vd., 2007). Buna ek olarak oksidatif stres, hipertansiyon ve hipertansiyon ile ilişkili son organ hasarının patogenezinden sorumlu başka bir faktör olarak da literatürel bir konu hale gelmiştir (Lacy vd., 2000). ROT' un hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık ve böbrek hasarı gibi patofizyolojik durumların gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunduğu literatürde gösterilmektedir (De Cavanagh vd., 2007).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Yapılan analizlerde kullanılan cihazlar Tablo 3'te verildi.

Tablo 3. Kullanılan cihaz ve gereçler, marka/modelleri

Cihaz Adı	Marka/Model/Ülke
LC-MS/MS	Thermo Scientific Instrument, USA
LC-UV	Elite LaChrom, Hitachi, Japonya
Tansiyon Ölçüm Cihazı	Biopac Systems, MP150, USA
UV-GB Spektrofotometre	Thermo Scientific Evolution™ 201, UV-VIS Spectrophotometer, USA
Hassas Terazi	Presica LX 320 A, Dietikon, İsviçre
Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific™ U410,
Saf Su Cihazı	Direct – Q 3 UV.
Sıçan Terazisi	Kern-Sohn-GmbH, PCB-800-1, Balingen, Almanya
Hassas Terazi	Presica LX 320 A, Dietikon, İsviçre
Vorteks Karıştırıcı	Labnet VX100, MO BIO Laboratories, Inc., NJ, USA
Rotary Evaporatör	IKA®-Werke, RV 05 Basic, Staufen, Almanya
Etüv	Nüve, EN 400, Ankara, Türkiye
Magnetik Karıştırıcı	Heidolph MR HEI-Standard, Schwabach, Almanya
Yarı Otomatik Pipetler	Eppendorf Research® Plus Hamburg, Almanya
pH metre	Hannah Instrument
Kondüktometre	Hannah Instrument
Refraktometre	Atago, Almanya
Polarimetre	Beta PPP7 Optical Activity, İngiltere
Çalkalayıcı	Heidolph Promax 2020, Schwabach, Almanya
Santrifüj	Hettict Universal 320R, Almanya
Filtre	Whatman spartan 13/ 0,45 RC, Dassel, Almanya

2.2. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar ve satın alındığı firma Tablo 4'te verildi.

Tablo 4. Kullanılan kimyasallar ve satın alındığı firma

Kullanılan Kimyasal	Satın Alındığı Firma
Metanol-LC Saflıkta	Merck, Darmstadt, Almanya
Metanol-MS Saflıkta	Merck, Darmstadt, Almanya
Kateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
<i>p</i> -OH benzoik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Gallik Asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Vanilik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Şiringik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Kafeik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Epikateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
<i>p</i> -kumarik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Ferulik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Rutin	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
<i>t</i> -Sinnamik Asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Luteolin	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Vanilin	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
TPTZ	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
CH ₃ COOH	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
NaCH ₃ COO.3H ₂ O	Merck, Darmstadt, Almanya
Troloks [®]	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
FeCl ₃	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Folin-Ciocalteu's Phenol Reaktifi	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt, Almanya
NH ₄ CH ₃ COO	Merck, Darmstadt, Almanya
Al(NO ₃) ₃	Merck, Darmstadt, Almanya
Quercetin	Lancaster, Morecambe, İngiltere
K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O	Merck, Darmstadt, Almanya
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Merck, Darmstadt, Almanya
Dietil Eter	Merck, Darmstadt, Almanya

Tablo 4'ün devamı

Etil Asetat	Merck, Darmstadt, Almanya
Kaptopril (25mg) (Kapril-İlaç)	Mustafa Nevzat İlaç San.A.Ş., Türkiye
Serum fizyolojik	Polifarma, Turkey
L-NAME (<i>N</i> _ω -Nitro-L-arginin metil ester hidroklorür)	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Almanya
NaOH	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
NaNO ₂	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
VCl ₃	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Metafosforik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
KCl	Merck, Darmstadt, Almanya
TCA	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	Merck, Darmstadt, Almanya
NaCl	Merck, Darmstadt, Almanya
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
DNTB	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
TBA	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
BHT	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
Tetra Etoksi Propan	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya
C ₂ H ₅ OH	Sigma-Aldrich Chemie, Münih, Almanya

2.3. Numunelerin Temini ve Saklama Koşulları

Karadeniz Bölgesi'ndeki farklı lokalitelerden deli bal ve bitkisi toplandı. Bitkinin hem sarı çiçekli, hem de mor çiçekli kısımları alınarak örnekler toplamda 10 bitki çiçeği ve 10 baldan oluşmaktadır. Bal ve bitkiler 2018 yılında toplanan örneklerdir. Tüm ballar Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde palinolojik testlerden geçti. Kullanılan numunelerin kodları ve bilgileri Tablo 5 ve Tablo 6'daki gibidir. Kodlama prosedüründe bal örneklerinde MH kısaltması; bitki örneklerinde ise lokalite ve bitki rengi olarak orijinal haliyle kullanıldı.

Tablo 5. Bal numune kodu ve toplandığı bölge

Numune İsmi	Bölge		
MH 1	Artvin	MH6	Rize Güneysu
MH 2	Artvin Hopa	MH7	Rize Fındıklı
MH3	Artvin Borçka	MH8	Rize Fındıklı
MH4	Rize	MH9	Kastamonu
MH5	Rize İkizdere	MH10	Sakarya

Bitkiler direk güneş ışığı almayan ortamda kurutulup ($\pm 0,001g$ duyarlılıkla), öğütülüp; bal örnekleri ise orijinal şekliyle analizler için $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de buzdolabında muhafaza edildi.

Tablo 6. Bitki numuneleri ve bilgileri

Bitkiler	Bölge	Rakım	Renk
1.Trabzon, Akçaabat	Mersin	266 m	Mor
2.Trabzon, Köprübaşı	Madur Dağı	2742 m	Sarı
3.Rize, Çamlıhemşin	Şimşir Ormanı Yanı	1256 m	Sarı
4.Rize, Çamlıhemşin	Şimşir Ormanı Yanı	1256 m	Sarı
5.Gümüşhane, Kürtün	Kadırga Yaylası	2278 m	Beyaz
6.Giresun, Dereli	Kümbet Yaylası	1710 m	Sarı
7.Ordu, Şirinköy	Merkez	1057 m	Mor
8.Sinop, Türkeli	Merkez	206 m	Mor
9.Kastamonu, İnebolu	Merkez	10 m	Mor
10.Artvin, Borçka	Merkez	120 m	Sarı

Bitkiler Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden aldığımız 72784983-488.04-177033 sayılı numaralı bilimsel araştırma izin belgesi ile ekosistem bütünlüğüne zarar vermeden toplandı.

2.4. LC-MS/MS ile GTX-III Analizi

1 mg'lık hemi etil asetat formuyla satın alınan Grayanotoksin-III izoformu 1 mL MS saflıktaki metanolle kendi kabında çözülerek 1000 ppm'lik stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti +4 °C' de muhafaza altına alındı. Kullanım sırasında gerekli seyreltik konsantrasyonlar bu stok çözeltiden yararlanılarak hazırlandı. Analiz LC-MS/MS cihazında negatif iyon modunda ham bal ve bitki çiçeğinin metanolik ekstraktı örneklerine yapıldı. Analizler Rize Gıda Kontrol Laboratuvarı'nda yapıldı.

2.5. Ballarda Polen Analizi

Çalışmada uluslararası bir metod olarak kabul edilmiş olan 10 g bal içindeki polenlerden preparat yapılması yöntemi kullanıldı (Sorkun, 1985). Preparatlar, Wodehouse yöntemine göre daimi preparat haline getirildi.

Bu metodolojiye göre, beherlere konulmuş bal örnekleri bagetle iyice karıştırılıp homojen olmaları sağlandı. Kristalleşmiş olan ballar bir süre 40-45 °C'lik su banyosunda tutularak kristallerin çözünmesi sağlandı. Tamamen homojen hale gelmiş olan bal numunelerinden 10'ar g tartılıp santrifüj tüplerine konuldu. Üzerine 20 mL saf su eklenerek tüpler tıpası ile kapatıldı. Balın suda çözünmesi amacıyla öncelikle tüpler 40-45 °C'lik su banyosunda 10-15 dakika süresince bekletildi. Su banyosundan alınan ılınmış tüpler çalkalayıcıda çalkalanarak balın çözünmesi sağlandı. Sonrasında tüpler 3500 rpm'de 45 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlenen tüplerin süpernatant kısmı döküldü ve kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilerek bir süre bekletilir. İğne ucuna alınan bir miktar gliserin-jelatin tüp dibindeki çökeltiyeye bulaştırılarak, çökeltinin tamamı lama aktarıldı. Lama aktarılan çökeltiyeye bulaştırılacak gliserin-jelatinin, hot-plate üzerinde ısıtılarak erimesi sağlandı. Ardından üzeri lamelle kapatıldı. Etiket yapıştırılıp preparat ters çevrildi ve kuruması için bir gün bekletilen örnek mikroskopta incelenecek hale getirildi.

Polen teşhislerinde x10 ve x40 ve x100'lük objektif kullanılır. Taksonların, polen ortalamaları ve polen yüzdeleri belirlenir. Bu taksonlara ait polenlerin, çalışılan ballardaki katkıları saptandı. Sonrasında tüm preparat tarandıktan sonra balda bulunan bütün polenler teşhis edilirdi. Analiz Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

2.6. Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Antioksidan Analizleri

Balda yapılan fiziksel ve kimyasal analizlerle (polen analizi, nem, pH, renk değeri, prolin miktarı, diastaz aktivitesi, şeker oranları, hidrokümetilfurfural (HMF) değeri, elektriksel iletkenlik) balın doğallığı ve saflığı ortaya çıkarılmaktadır. Bu tezde deney hayvanlarına verilen balın kalitesini belirlemede kullanılan ve kimliklendirilmesini sağlayacak fiziksel parametrelerden polen analizi, optik çevirme açısı, %nem, %briks, elektriksel iletkenlik, pH, renk değeri, kimyasal parametrelerden; prolin ölçüldü. Antioksidan testlerden toplam fenolik madde tayini, toplam flavonoid tayini, FRAP testi, DPPH testi yapıldı ve fenolik bileşenlerin de içeriği kalitatif ve kantitatif olarak belirlendi.

2.6.1. Optik Çevirme Açısı [$^{20} [\alpha] D$] (α – Rotasyon)

Polarize ışığı çevirme açısı α -rotasyon değeri olarak ifade edilir. α -rotasyon değeri salgı ballarıyla çiçek ballarının ayırt edilmesinde kullanılan bir yöntem olmakla birlikte salgı ballarının optik çevirme açısı sağa yani pozitif (+) değer verirken çiçek ballarının ise sola yani negatif (-) değer vermektedir (Junk ve Pancoast, 1973). Optik çevirme açısı polarimetre kullanılarak tayin edildi. Bir bal numunesi için balon jodede 12 g bal tartılıp saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL Carrez I ve 10 mL Carrez II reaktifi ilave edildi. Hacmi 100 mL'ye tamamlandıp karıştırıldıktan sonra 24 saat beklemeye bırakıldı. Adı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü polarimetrenin ölçüm kabına onulup ölçümü yapılarak balın optik çevirme açısı belirlendi. Optik çevirme açısını belirlemek için hazırlanan çözeltiler Tablo 7'deki gibidir.

Tablo 7. Optik çevirme açısı için hazırlanan çözeltiler

Carrez I	10,56g $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$	tartılıp	100	mL'ye
				tamamlandı.
Carrez II	21,94g $ZnSO_4.7H_2O$ + 3mL asetik asit		100	mL'ye
				tamamlandı.

2.6.2. %Nem ve %Briks Değeri

Refraktometre kullanılarak ölçülen kırılma indisliyle % nem ve briks değerleri ifade edilir (Helrich, 1990). Bal numunesi 1:1 oranda saf suyla seyreltilip el refraktometresiyle okunur. Okunan %briks değeri seyreltme katsayısıyla (x2) çarpılıp 100'den çıkarılarak %nem hesaplanır.

2.6.3. Elektriksel İletkenlik

Elektriksel iletkenlik maddenin elektriksel akışı aktarabilme özelliğidir. Elektriksel iletkenlik ölçümü için 10 g bal tartılıp 100 mL saf suda çözülür. Hazırlanan bu karışımın elektriksel iletkenlik ölçer (kondüktometre) ile otomatik olarak ölçülen değerleri 25 °C sıcaklıktaki değerine çevirerek, elektriksel iletkenliği bulunur. 25 °C'de $\mu\text{S}/\text{cm}$ (mikrosimens/cm) veya $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ olarak ifade edilir.

2.6.4. pH Ölçümü

Balda pH iyonize asitlere ve mineral maddelerin oranına bağlıdır. Balın asitliği, mikroorganizmalara karşı kararlılığını arttırırken; aynı zamanda düşük pH değerinin sebebinin formik asit olabileceği bildirilmiştir. Bal gözleri sırlanmadan önce, arıların iğnesinden bu gözlere enjekte ettikleri formik asitten balın pH'sının asidik olabileceği ve formik asidin balın olgunlaşmasına yardım ettiği düşünölmektedir. Balda genelde pH 3,4-5,5 arasında değişim göstermektedir. 10 g bal tartılarak üzerine 10 mL saf su eklenip pH metrede direk ölçüm yapıldı.

2.6.5. Renk Tayini

Bal numunesinin renk ölçümü Hunter (L, a, b) sistemine göre Minolta cihazı ile ölçöldü. Okuma üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Sonuçların ortalaması alınıp ortalama renk değerleri belirlendi. Hunter sisteminde renk değerlerinden L değeri koyuluk/açıklık (0: siyah; 100:beyaz); a değeri (-a, yeşillik; +a, kırmızılık); b değeri (-b, mavilik; +b,

sarılık) olarak ifade edilir. Ölçülen koyu renkli numunelerin L değerleri düşük olmakla beraber doğal olarak yarı saydamdırlar (Anupama vd., 2003).

2.6.6. Prolin Miktarının Belirlenmesi

Tayin spektrofotometrik bir yöntem olup prolinin ninhidrine bağlanıp renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. 2-propanol eklenerek çözelti etkisizleştirilir, okuma yapılır ve absorbansa karşı konsantrasyon grafiği çizilir. Prolin miktarı grafikten hesaplanır (Ough, 1960). Satın alınmış prolinden 6,4 mg tartılıp 100 mL'de saf suda çözülür. 0,064 mg/mL'den başlanıp seyreltilerek (0,032-0,016-0,008-0,004 mg/mL) standart prolin çözeltileri hazırlanır. Hazırlanan çözeltilerden 100µL alınarak tüplere konulur. Üzerine 200 µL %80'lik formik asit ve 200 µL %3'lük ninhidrin çözeltisinden ilave edilip tüpler çalkalayıcıda 15 dk çalkalanır. Önce kaynar su banyosunda 15 dk, ardından 70°C'lik su banyosunda 10dk tutulur. Süre bitiminde tüplere 1 mL % 50'lik 2-propanol çözeltisi eklenir. Tüpler buz banyosunda bekletildikten sonra spektrofotometrede 510 nm'de okunur. Prolin amino asidini belirlemek için hazırlanan çözeltiler Tablo 8'deki gibidir.

Tablo 8. Prolin analizi için hazırlanan çözeltiler

Prolin	6,4 mg prolin tartıldı, saf suyla 100 mL'ye tamamlandı. Yarı yarıya seyreltme yapılarak 0,064-0,004 mg/mL arasında standart çözeltiler hazırlandı.
%3'lük ninhidrin	3 g ninhidrin tartılıp saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
%80'lik Formik Asit	80 mL %100'lük formik asit saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
%50'lik 2-propanol	50 mL %100'lük 2-propanol saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

2.6.7. Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin Antioksidan Özellikleri

Balın ve bitkinin antioksidan özelliğini belirleyen testlerden; demir (III) indirgeme antioksidan güç (FRAP), DPPH• radikalini temizleme aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı tayinleri yapıldı.

Bal ve bitki ekstraktı analiz için çalkalayıcıda 24 saat süreyle oda sıcaklığında metanolik olarak hazırlandı. Numuneler 24 saat sonunda adi süzgeç kağıdından süzüldü.

Ardından mavi bant süzgeç kağıdından berrak oluncaya kadar süzülme işlemine devam edildi. Ekstraktlarda nihai konsantrasyon bal için 10g/30mL; bitki için 1g/20mL olarak belirlendi ve 4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

Toplam fenolik madde tayini (Slinkard, 1977) fenolik bileşiklerin alkali ortamda sarı renkli Folin-Ciocalteu ayracının indirgendiği kendilerininse oksitlenmiş forma dönüştüğü redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu reaksiyonda Folin-Ciocalteu reaktifi oksitleyici bileşik olarak rol almaktadır. Reaksiyonun sonucunda indirgenmiş reaktifin oluşturduğu mavi rengin absorbansının ölçülmesiyle, analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarlarının hesaplanması mümkün olmaktadır. Standart grafiğin hazırlanmasında, fenolik bir bileşik olan gallik asit standardı (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125mg/mL) kullanıldı (Slinkard ve Singleton 1977). Numunenin 100 gramı başına, mg gallik asit eşdeğeri [mg GAE (Gallik Asit Eşdeğeri)/100 g] fenolik madde miktarı olarak bulundu. Hazırlanan çözeltiler Tablo 9’daki gibidir.

Tablo 9. Toplam fenolik madde miktarı için hazırlanan çözeltiler

0,5 N Folin Ciocalteu	2 N Folinden 1:4 oranında saf suyla seyreltilerek kullanıldı.
%10’luk Na ₂ CO ₃	10 g Na ₂ CO ₃ 90 mL suda çözüldü, 100 mL’ye tamamlandı.
GallikAsit (1 mg/mL)	Metanolle hazırlanan stok çözeltiden, 1-0,5-0,25-0,125-0,0625 mg/mL olacak şekilde yine metanolle seyreltilerek hazırlandı.

Oluşan mavi renkli kompleksin şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır, 760 nm’de absorbans verir. Pipetlemeler Tablo 10’daki gibidir.

Tablo 10. Toplam polifenol tayininde yapılan pipetleme işlemi

	Kör	Standart	Numune
Distile su	700 µL	680 µL	680 µL
Standart	-	20 µL	-
Bal numunesi	-	-	20 µL
0,5N Folin Reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL

Tablo 10'un devamı

Tüpler vortekslenir, 3 dakika sonra			
% 10 Na ₂ CO ₃	400 µL	400 µL	400 µL
eklenir. 760 nm'de suya karşı absorbands okunur.			

Toplam flavonoid madde miktarı tayini Fukumoto ve Mazza'ya (2000) göre bal ve bitki ekstraktlarına yapıldı. Metanolik olarak hazırlanmış ekstraktlar test için kullanıldı. Standart olarak kuersetinin farklı konsantrasyonları (1mg/mL'den başlanarak) kullanıldı (Tablo 11). Numunenin mg KE (Kuersetin Eşdeğeri)/100 g numune olarak flavonoid madde miktarı bulundu.

Tablo 11. Toplam flavonoid madde miktarı için hazırlanan çözeltiler

1M NH ₄ CH ₃ COO	7,7g NH ₄ CH ₃ COO 100 mL saf suda çözüldü.
%10 Al(NO ₃) ₃	1g Al(NO ₃) ₃ 10 mL saf suda çözüldü.
Kuersetin (1 mg/mL)	1 mg/mL'lik stok çözeltiden, 0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125 mg/mL'lik çözeltiler metanolle seyreltilerek hazırlandı.

Standarttan 0,5 mL alınarak, 4,3mL mutlak metanol; 100µL %10'luk Al(NO₃)₃; 100µL 1M NH₄CH₃COO ilave edildi, karıştırıldı. 40 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak 415nm'de absorbands değerleri okundu. Konsantrasyona karşı standart kalibrasyon grafikği çizildi. Yapılan çalışmada pipetleme işlemi Tablo 12'deki gibidir.

Tablo 12. Toplam flavonoid tayininde yapılan pipetleme işlemi

	Kör	Renk Körü	Standart	Numune
Numune	-	0,5 mL	-	0,5 mL
Standart	-	-	0,5 mL	-
Mutlak Metanol	4,8 mL	4,5 mL	4,3 mL	4,3 mL
%10 Al(NO ₃) ₃	0,1 mL	-	0,1 mL	0,1 mL
1 M NH ₄ .CH ₃ COO	0,1 mL	-	0,1 mL	0,1 mL
40 dk oda sıcaklığında inkübe edilir ve 415 nm'de absorbands okunur.				

Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Doğal ürünler ve arı ürünlerinin antioksidan kapasitenin ölçülmesinde FRAP (Ferric reducing antioksidant power) yöntemi en çok kullanılan yöntemdir (Benzie ve Strain, 1999). Çalışma eğrisi için Troloks[®] un değişen konsantrasyonları kullanılarak çalışma eğrisi hazırlandı. Sonuçlar standart bir antioksidan olan Troloks[®] la karşılaştırılmalı olarak bulundu ve µmol Troloks[®] eşdeğeri antioksidan güç/100 g numune olarak ifade edildi.

Tablo 13. Demir (III) indirgeme/ antioksidan güç FRAP için hazırlanan çözeltiler

HCl (40 mM)	50 mL kadar saf suyun üzerine % 37'lik HCl'den 340 µL eklendi ve saf suyla balon joje ile 100 mL'ye tamamlandı.
TPTZ (10 mM)	31,2 mg TPTZ tartıldı, 10 mL 40 mM'lık HCl içinde çözüldü.
FeCl ₃ (20 mM)	324,4 mg FeCl ₃ saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6)	2,325 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O üzerine 12 mL glasiel asetik asit eklendi. Saf suyla 750 mL'ye tamamlandı.
FRAP Reaktifi	300 mM, pH 3,6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl ₃ (10:1:1) oranında birleştirilerek taze hazırlandı.
Troloks [®] (1000µM)	25,31 mg troloks metanolle 100 mL'ye tamamlandı. Metanolle 500, 250, 125, 62,5 µM'a seyreltildi.

FRAP testinde Fe(III) iyonları TPTZ adı verilen ligant ile (Fe(III)-TPTZ-2,4,6-tris(2-pyridlyl)-S-triazin) kompleksini oluşturur. Test kompleksteki Fe(III) iyonunun antioksidan bir madde varlığında Fe(II)'ye indirgenmesi esasına dayanır. Antioksidanlar varlığında Fe(III), Fe(II)'ye indirgendiğinde oluşan mavi renkli kompleks (Fe(II)-TPTZ), 593nm'de maksimum absorbans verir (Benzie and Strain, 1999). Doğal ürünlerin antioksidan kapasitenin ölçülmesinde FRAP (Ferric reducing antioksidant power) yöntemi en çok kullanılan yöntemlerdendir (Benzie ve Strain, 1999). Çalışma grafiği için stok çözeltiden Troloks[®] un değişen konsantrasyonları (31,25-62,5-125-250-500-1000 µM) kullanıldı. Hazırlanan çözeltiler ve yapılan pipetleme işlemi Tablo 13 ve Tablo 14'teki gibidir.

Tablo 14. FRAP tayininde yapılan pipetleme işlemi

	Kör _(MeOH)	Numune	Renk Körü _(MeOH)	Troloks®
FRAP Reaktifi	3 mL	3 mL	-	3 mL
Numune	-	100 µL	100 µL	-
Troloks®(Değişen kons.)	-	-	-	100 µL
Saf Su	-	-	-	-
Metanol	100 µL	-	3 mL	-

4. dakikada 593 nm’de absorbans okunur.

Renk Körü_{test(met)}: Metanolde çözünen numune için renk körü

DPPH bileşiği ticari olarak satın alınabilen kararlı bir radikal olup denemelerde 100 µM’lık (4mg/100mL) metanolik çözeltisi kullanıldı (Tablo 15). Çalışma Yu vd., ‘e (2002) göre yapıldı. SC₅₀ değerleri mg/mL olarak hesaplandı. SC₅₀ değeri radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonunu ifade eder. SC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışılır. Be sebeple çalışmamızda altı farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Bal ve bitki numunelerinin uygun ve farklı konsantrasyonları hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı, standart olarak Troloks® kullanıldı.

Tablo 15. DPPH radikal temizleme aktivitesi için hazırlanan çözeltiler

DPPH Reaktifi (0,1 mM)	4mg DPPH tartıldı, 90 mL metanolla çözüldü, 100 mL’ye tamamlandı.
Troloks® (0,02 mg/mL)	10 mg troloks 10 mL metanolde çözümlenerek stok çözeltisi hazırlandı. 0,02 mg/mL’lik ara stok çözelti metanolla seyreltilerek hazırlandı.

Üç paralel halinde hazırlanan numuneden 750 µL, üzerine DPPH• radikal çözeltisinden de 750 µL eklenip oda sıcaklığında karanlıkta 50 dakika bekletildi (Tablo 15). Süre sonunda DPPH• radikalinin mor menekşe rengi pembeden sarıya doğru açılan renk tonları oluşturdu. DPPH• radikalinin maksimum absorbans verdiği 517 nm’de absorbanlar okundu.

Tablo 16. DPPH yöntemi için yapılan pipetlemeler

	Numune Tanık	Reaktif Tanık	Numune
	Tüpü	Tüpü	Tüpü
Numune (Değişen konsantrasyon)	750 µL	-	750 µL
Metanol	750 µL	750 µL	-
DPPH• (100 µM)	-	750 µL	750 µL

50 dk. süre sonunda 517 nm’de absorbans okunur.

Kör olarak DPPH• radikal çözeltisi (hesaplarken kullanıldı) ve numunenin çözüldüğü çözücü olan metanol (spektrofotometrede) kullanıldı. Absorbansa karşılık gelen konsantrasyon değerleri grafiğe geçirilerek SC₅₀ değerleri belirlendi. Pipetleme işlemi Tablo 16’daki gibidir (Yu vd., 2002).

2.6.8. HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini

Ekstraktların 15 mL’lik kısmı ayrılıp çözücüsü 45°C’deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve balondaki kalıntı pH’sı 2 olan 10 mL su eklenerek ultrasonik banyo yardımıyla çözüldü. Daha sonra 3’er defa 5 mL’lik önce dietileter sonra etilasetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sonunda elde edilen ekstraktların çözücüleri 45 °C’deki döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmak üzere evaporatör balonlarına alındı ve çözücüler uçuruldu (Şekil 10). Balondaki kalıntı 2 mL metanolla ultrasonik banyoda çözülerek ekstraktlar 0,45µm filtreden geçirildi. RP-HPLC-UV analizleri 280 nm’de ve 320 nm’de UV-VIS dedektör ile Elite LaChrom, Hitachi HPLC sisteminde Can’a (2015) göre yapıldı. Çalışma optimizasyonu Çakır vd., 2018’e göre ayarlandı.

Kullanılan fenolik bileşen standartları gallik asit, ferulik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, kafeik asit, şiringik asit, kateşin, epikateşin, *p*-kumarik asit, rutin, luteolin, myresetin, resveratrol, daidzein, *t*-sinammik asit, pinosembrin, hesperetin, krisin, kafeik asit fenil esteri (CAPE) olmak üzere 19 adettir.



Şekil 10. Ekstraktların süzülmesi ve evaporasyon sonrası görüntü

2.7. Deney Hayvanları Çalışması

2.7.1. Hipertansif Deney Hayvanı Modeli Oluşturma

Deneyde kullanılan hayvanlar Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Çalışma, KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 25.07.2018 toplantı tarihli, ve 2018/31 protokol numaralı etik kurul kararı doğrultusunda izin verilen “N- ω-Nitro L-Arginin Metil Ester (L-NAME) ile İndüklenmiş Deney Hayvanlarında Deli Bal ve Orman Gülü (*R. luteum*) Ekstresinin Anti-Hipertansif Etkisinin Araştırılması” adlı tez çalışmasının bir bölümü olarak gerçekleştirildi. Bu amaçla talep edilen 30 adet 180-220 g ağırlıklı Sprague Dawley tipi dişi sıçanların biyokimyasal verileri kullanıldı. Sıçanlar, tel kapaklı plastik standart kafeslerde, 22 ± 2 °C’de, nemi (%45-50), 12:12 saat aydınlık:karanlık ortamda barındırıldı. Sıçanlar standart olarak satılan sıçan yemi ve musluk suyuyla polikarbonat şeffaf kafeslerde beslenmiş olup yem ve su alımı serbest (*ad libitum*) bırakıldı. Hayvanlara verilmek üzere hazırlanan çözeltiler Tablo 17’deki gibidir.

Tablo 17. Hazırlanan çözeltiler

Hazırlanan Çözeltiler Hazırlama Şekli

Hipertansiyon Oluşturmak İçin

L-NAME Hayvan başına 40 mg/kg olacak şekilde serum fizyolojikte haftalık olarak hazırlandı. İkinci tartımdan sonra (15. gün) hayvanların ağırlıklarına göre doz 40 mg/kg olacak şekilde tekrar hesaplanıp çözelti hazırlandı (Gavaj hacmi 1 mL).

Tansiyon Düşürmek İçin Standat Grup

Kaptopril (Kapril) Hayvan başına 10 mg/kg olacak şekilde hazırlandı. Hayvanların ikinci tartımına (15. gün) göre hayvan başına miktar hesaplanıp dozu 10 mg/kg olacak şekilde serum fizyolojikte haftalık olarak hazırlandı (Gavaj hacmi 1 mL).

Tansiyon Düşürmek İçin Tedavi Grubu 1

Bal (gavaj için SF'te) 1:1 (w/v) oranında serum fizyolojik ile hazırlandı. 6 g bal : 6 mL serum fizyolojik ile çözüldü. Günlük aligotlara bölünmüş şekilde haftalık hazırlandı. -20 °C' de saklandı. Günlük çözülüp kullanıldı. (GTX-III konsantrasyonu 12,5 mg GTX-III/kg bal kullanıldı.) (Gavaj hacmi 1 mL).

Tansiyon Düşürmek İçin Tedavi Grubu 2

Bitki ekstraktı 3 g kuru bitki çiçeği tartılıp, oda sıcaklığında, metanolle 24 saat boyunca çalkalayıcıda çalkalanıp ekstrakte edildi. Partiküller adi ve mavi bant süzgeç kağıdı yardımıyla bertaraf edildi. Son hacmi 60 mL'ye tamamlandı. Hayvanlara verilecek sulu örnek bu ekstrakt kullanılarak hazırlandı (Gavaj hacmi 1 mL).

Bitki ekstraktı (gavaj için SF'te) Metanolik bitki ekstraktından 10 mL (1/20 g/mL'lik içerisinde) alınıp, evaporatörde uçuruldu (Şekil 10). Ultrasonik banyo yardımıyla 10 mL SF' te çözüldü (GTX-III konsantrasyonu 155,8 mg GTX-III/kg bitki olan örnek kullanıldı). (Gavaj hacmi 1 mL).



Şekil 11. Deney hayvanları ve intragastrik (gavaj) yoldan hayvanların beslenmesi

Tablo 18. Deney hayvanları grupları

Gruplar	Uygulama
Grup I	Kontrol Grubu
Grup II	Hipertansiyon Grubu
Grup III	Standart Grubu (Kapril)
Grup IV	Tedavi Grubu (Bal)
Grup V	Tedavi Grubu (Bitki)

	Serum fizyolojik: (1 mL/30 gün/g.v.)
	L-NAME: (40 mg/kg /30 gün/i.p)
	L-NAME: (40 mg/kg/30 gün/i.p)+Kapril: (20 mg/kg/ son 15 gün/g.v.)
	L-NAME: (40 mg/kg/30 gün/i.p)+Deli bal: (12,5mg/kg GTX-III/son 15 gün /g.v.)
	L-NAME: (40 mg/kg/30 gün/i.p)+Orman gülü çiçeği ekstraktı: (155,8 mg/kg, GTX-III/son 15gün/g.v.)

Kontrol grubuna serum fizyolojik; diğer tüm gruplara 15 gün boyunca tansiyonlarını yükseltmek (hipertansif sıçan modeli oluşturmak) için L-NAME i.p. (intraperitoneal) yoldan verildi. 15. gün sonunda kontrol grubu ve diğer grupların tansiyonları ölçüldü ve hayvanların tansiyonlarının kontrol grubuna göre yüksek olduğu anlaşıldı. 15.günden sonra bir standart grup ve iki tedavi grubuyla L-NAME enjeksiyonuna ilaveten 3 grupta gavaja

(Kapril (standart), Bal, Ekstrakt) devam edildi (Şekil 11). 30.günde 5 grubun da tansiyonları ölçüldü. Oluşturulan gruplar Tablo 18'deki gibidir.

2.7.2. Hayvanların Vücut Ağırlığının Takibi

Tüm sıçanlar 30 gün boyunca; 1.gün ve 30.gün olmak üzere 2 kez elektronik tartı ile gram cinsinden tartıldı.

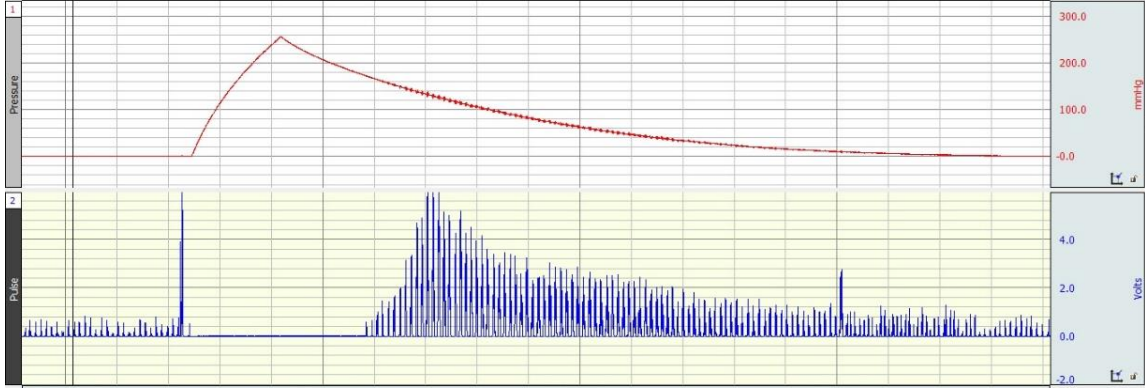
2.7.3. Hayvanların Tansiyonunun Ölçülmesi

Biopac Systems, MP150 sistemiyle 15. ve 30. günlerde ratların kuyruk arterlerinden Tail-cuff metoduyla tansiyon ölçümleri yapıldı. Bu sistemde hayvanların kuyruğuna takılan manşondan (plastik manşet) sinyaller alınıp bilgisayara aktarıldı (Şekil 12).



Şekil 12. Deney hayvanlarının tansiyonunun ölçülmesi

Halka şeklinde havayla şişirilebilen bir manşon (11mm, cuff) yardımıyla kuyruktaki arterlerden geçen kan akımı kısa bir süreliğine kesildi. İstenen basınç düzeyine ulaşıldıktan sonra manşon otomatik olarak yavaşça sistem tarafından söndürüldü. Bu esnada kan akımının tekrar başlaması sağlandı.



Şekil 13. Tansiyon ölçüm ekranı

Bilgisayar sisteminde oluşan ilk kan akışının olduğu yer yüksek tansiyon; en yüksek basıncın olduğu yer düşük tansiyon olarak sistemde grafiksel olarak yansdı (Şekil 13) ve grafik üzerinden hesaplandı. Her sıçan için en az 5 ölçüm 3'er dakika aralıklarla alındı. Belirlenen değerlerin ortalaması alınıp o günkü kan basıncı değeri olarak hesaplandı.

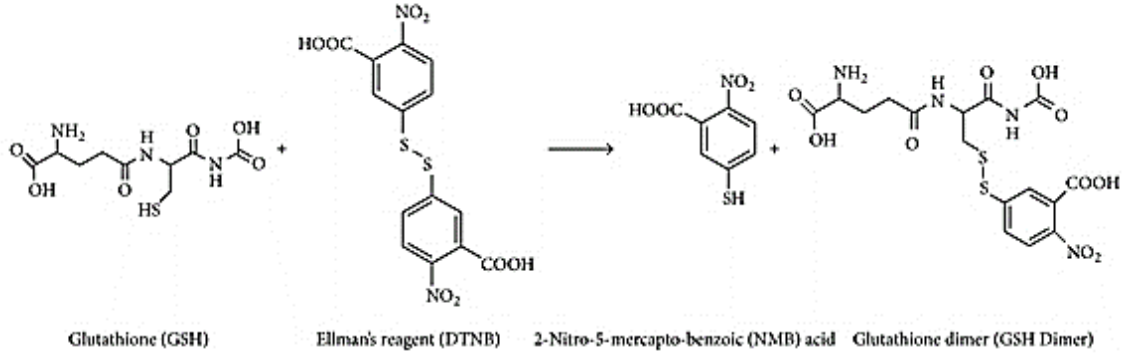
2.7.4. Dekapitasyon ve Serumda Bazı Biyokimyasal Analizler

30 günlük deney süresi sonunda bütün sıçanların dekapitasyon yöntemi ile yaşamları sonlandırıldı ve kanları sarı serum tüplerine alındı. 3000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Serumlar pastör pipeti yardımıyla ependorf tüplere aligotlar halinde alındı. Serumların bir kısmı hizmet alımı yoluyla biyokimyasal analizler (Glukoz, Aspartat Aminotransferaz, Alkale Fosfataz, Laktat Dehidrogenaz, Kreatin Kinaz, Kan Üre Azotu) için kullanıldı. Diğer aligotlar -80°C 'daki dondurucuda saklandı.

2.7.5. Dokuda Homojenatında Yapılan Analizler

2.7.5.1. Glutatyon (GSH) Düzeyinin Ölçümü

Tartımı alınmış olan ($\sim 0,3$ g) karaciğer ve böbrek dokularında glutatyon miktarı tayini için modifiye edilmiş Ellman metodu kullanıldı (Aykac vd., 1985).



Şekil 14. Alifatik tiyol bileşiklerinin 5,5'-ditiyobis-2- nitrobenzoik asit ile tepkimesi

Dokuda alifatik tiyol bileşiklerinin hafif bazik ortamda 5,5'-ditiyobis -2-nitrobenzoik asit (DTNB, Elman reaktifi) ile tepkimesi sonucu tiyol başına oluşan p-nitrofenol anyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır (Şekil 14).

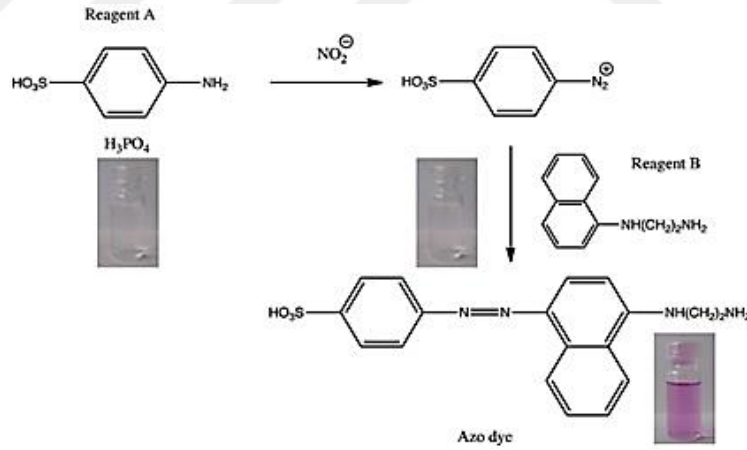
Tablo 19. GSH düzeyinin ölçümü için hazırlanan çözeltiler

Homojenizasyon için	1,12 g KCl 100 ml distile suda çözülür.
0,15M KCl:	
Çöktürme çözeltisi:	1,67 g metafosforik asit + 0,2 g EDTA + 30 g NaCl bir miktar saf suda çözülür. Bu çözeltiler birleştirilip son hacim 100 mL'ye tamamlanır.
%1 Sodyum sitrat çözeltisi:	1 g trisodyum sitrat tartılıp 100 mL distile suda çözülür. Belirtme reaktifinin hazırlanmasında kullanılır.
Sekonder sodyum fosfat çözeltisi:	10,65 g Na ₂ HPO ₄ distile suda çözülür ve son hacim 250 mL'ye tamamlanır.
Belirtme reaktifi:	0,4 g DTNB önceden hazırlanmış olan %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır. (Taze hazırlanmalıdır.)
Fosfat tamponu (0,1 M, pH:7,4):	3,4 g KH ₂ PO ₄ tartılıp 250 mL distile suda çözülür; 4,35 g K ₂ HPO ₄ tartılıp 250 mL distile suda çözülür. K ₂ HPO ₄ çözeltisine azar azar KH ₂ PO ₄ çözeltisinin eklenmesinden sonra pH metrede pH 7,4'e ayarlanır.

Doku örnekleri tartılıp 0,15 M soğuk KCl içerisinde (1:9 olacak şekilde) homojenize edildi. 0,5 mL homojenata 0,75 mL reaktif karışımı (30 g NaCl + 1,67 g metafosforikasit + 0,2 g EDTA / 100mL su) eklendikten (deproteinizasyon) sonra, +4 C de 2000 xg' de 20 dk santrifüj edildi. Ardından 0,5 mL süpernatant üzerine 0,3M, 2 mL Na_2HPO_4 ve 0,2 mL (%1'lik sodyum sitrat içinde 0,4 mg/mL DNTB) DNTB çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında 5- 10 dk bekletildikten sonra karışımın absorbansı spektrofotometre yardımıyla köre karşı (su) 412 nm'de ölçüldü. Örneklerdeki GSH konsantrasyonu standart kalibrasyon grafiği kullanılarak $\mu\text{mol/g}$ doku olarak hesaplandı. Hazırlanan çözeltiler Tablo 19'daki gibidir.

2.7.5.2. Nitrik Oksit (NO) Düzeyinin Ölçümü

Vücut sıvılarındaki ve doku homojenatlarındaki NO düzeylerinin belirlenmesi için nitrik oksit oksidasyonunun son ürünleri olan nitrit ve nitratın ölçülmesi esasına dayanır (Şekil 15) (Cortas & Wakid, 1990).



Şekil 15. Griess reaksiyonu

Alınan (0,3 g) kalp, karaciğer ve böbrek dokusu örneklerindeki NO_x konsantrasyonu Griess metoduna uygun şekilde yapıldı (Miranda vd., 2001). Dokular 0,1 M sodyum fosfat tamponu içerisinde (pH:7), (1:9) homojenize edildi. Ardından homojenat 3500 rpm' de 15 dk santrifüj edildi. Ölçüm hassasiyetine olumsuz etkide bulunabilecek proteinler için deproteinizasyon işlemi yapıldı. Bunun için 0,5 mL süpernatana 0,3 M NaOH'tan 0,25 mL

eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. ardından 0,25 mL ZnSO₄ ilave edilip 3000 RPM de +4 C'de 20 dk santrifüj edildi. Deproteinizasyondan sonra ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi amacıyla eşit miktarda VCl₃ (200µL: 200µL) eklendi ve 37 °C' de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 600 µL tampon ve aynı miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktiflerinden 1000 µL eklendi. 37 °C' de 10 dk inkübasyondan sonra spektrofotometrede köre karşı (1000 µL tampon: 1000 µL Griess reaktifi), 540 nm'de okundu. 6,4 mM' lık stok sodyum nitrit (NaNO₂) standartı günlük olarak 50 kat (200 µL stok standart + 9,8 mL distile su) dilüe edilerek oluşan 128 µM'lık çözeltilerden yarıyarıya seyreltilerek oluşturulan 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 µM konsantrasyonlarda standart çözeltiler elde edildi. Buradan hazırlanan standart eğriden örneklerdeki NO_x konsantrasyonu µmol/g doku olarak hesaplandı. Hazırlanan çözeltiler Tablo 20'deki gibidir.

Tablo 20. NO_x düzeyinin ölçümü için hazırlanan çözeltiler

Fosfat tamponu (0,1 M, pH:7,4):	3,4 g KH ₂ PO ₄ tartılıp 250 mL saf suda çözülür. 4,35 g K ₂ HPO ₄ tartılıp 250 mL saf suda çözülür. K ₂ HPO ₄ çözeltisi üzerine KH ₂ PO ₄ çözeltisi eklenir, pH'sı pH metrede 7,4'e ayarlanır.
0,3 M NaOH:	1,2 g NaOH tartılır 100 mL' ye tamamlanır.
%5'lik ZnSO ₄ :	5 g ZnSO ₄ tartılır. 100mL'ye tamamlanır.
VCl ₃ :	400 mg VCl ₃ 50 mL 1M HCl içerisinde hazırlanır.
Griess I	%2'lik NEDD hazırlanır.
Griess II	%2'lik sülfanil amid %3'lük H ₃ PO ₄ içerisinde hazırlanır.
6,4 mM'lık stok NaNO ₂ :	0,0442g sodyum nitrit tartılır. Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

3. BULGULAR

3.1. LC-MS/MS ile GTX-III Analizi Sonucu

LC-MS/MS ile GTX-III analizi yapılan örneklem türleri öncelikle bal ve bitki grubu adı altında derlenerek kategorize edildi. Bal örneklemelerinin başlıkları bölge ve GTX-III olarak oluşturulurken; bitki örneklerine dair alt başlıklar bölge, rakım, renk, GTX-III miktarı ($\mu\text{g GTX-III/g bal}$) şeklinde oluşturuldu. Yapılan kromatografik analiz sonucunda numunelerdeki GTX-III miktarı $\mu\text{g GTX-III/ g (ppm)}$ numune olarak tayin edildi (Tablo 21).

Tablo 21. Balların GTX-III analizi sonuçları

Kod	Bölge	GTX-III ppm
MH 1	Artvin	6,42
MH 2	Artvin, Hopa	24,94
MH3	Artvin, Borçka	5,87
MH4	Rize	0,78
MH5	Rize, İkizdere	5,41
MH6	Rize, Güneysu	9,07
MH7	Rize, Fındıklı	15,65
MH8	Rize, Fındıklı	5,70
MH9	Kastamonu	4,08
MH10	Sakarya	T.E.

T.E.:Tespit Edilmedi

Tablo 21'deki ölçüm sonuçlarına göre MH2 kodu ile analiz edilen Artvin menşeli bal örneği 24,94 $\mu\text{g GTX-III/ g}$ numune ölçüm değeri ile kendi grubundaki 11 örneklem arasında en yüksek GTX-III oranına sahip olduğu görüldü. Sakarya yöresinden edinilen bal örneğindeki GTX-III tespit edilmedi.

Orman gülü bitkisinin çiçeğinden elde edilen sonuçlara göre mor çiçekli bitkilerin, sarı çiçekli bitkidekinden düşük oranda GTX-III içerdiği ve hatta mor çiçekli bitkilerin

birinde (Ordu, Şirinköy) toksik izomer tespit edilmedi. Bulgular sarı çiçekli orman gülü bitkilerinin mor çiçekli orman gülü bitkilerine nazaran daha fazla toksik izomer barındırdığı gösterdi. Özellikle sarı renkli örnek olan Giresun, Dereli örneğinin en düşük GTX-III'e sahip mor çiçekli örnekten (Akçaabat, Mersin) 11,6 µg GTX-III/g numune yaklaşık 25 kat olduğu görüldü (Tablo 22).

Tablo 22. Bitkilerin GTX-III analizi sonuçları

Bitkiler	Bölge	Rakım (m)	Renk	GTX-III (ppm)
1.Trabzon, Akçaabat	Mersin	266 m	Mor	11,60
2.Trabzon, Köprübaşı	Madur Dağı	2742 m	Sarı	155,80
3.Rize, Çamlıhemşin	Şimşir Ormanı	1256 m	Sarı	146,60
4.Rize, Çamlıhemşin	Şimşir Ormanı	1256 m	Sarı	123,40
5.Gümüşhane, Kürtün	Kadırga Yaylası	2278 m	Beyaz	7,60
6.Giresun, Dereli	Kümbet Yaylası	1710 m	Sarı	291,80
7.Ordu, Şirinköy	Merkez	1057 m	Mor	T.E.
8. Sinop, Türkeli	Merkez	206 m	Mor	86,20
9.Kastamonu, İnebolu	Merkez	10 m	Mor	27,20
10.Artvin, Borçka	Merkez	120 m	Sarı	96,00

T.E. :Tespit Edilmedi

3.2. Polen Analizi Sonuçları

Çalışmada kullanılan çeşitli bölgelere ait 10 bal numunesinin polen analizleri hizmet alımı şeklinde yapıldı.

Ballar arıcılardan kendi beyanları doğrultusunda deli bal (orman gülü balı) olarak toplandı. Yapılan polen analizi sonucunda balların bir tanesinde orman gülü poleni bulunamazken diğer ballar düşük polen yüzdesine sahipti. Çalışılan tüm deli balların polen sayım sonuçları Tablo 23'te yer almaktadır. Çalışmada kullanılan balların polen yüzdeleri %0,1 ile %10 arasındadır.

Tablo 23. Ballardaki polen yüzdeleri

Kod	Bölge	% Polen
MH 1	Artvin	10
MH 2	Artvin Hopa	6
MH3	Artvin Borçka	5
MH4	Rize	0,1
MH5	Rize İkizdere	10
MH6	Rize Güneysu	8
MH7	Rize Fındıklı	10
MH8	Rize Fındıklı	10
MH9	Kastamonu	2
MH10	Sakarya	T.E.

T.E.:Tespit Edilmedi

3.3. Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Antioksidan Analizlerinin Sonuçları

Deney hayvanlarına verilecek bal numunesi en çok GTX-III içeren bal, MH2 Artvin, Hopa (24,94 ppm), olarak seçildi. Bu balda bazı fiziksel ve kimyasal parametreler bakıldı. Balın kimliklendirilmesini sağlayacak fiziksel parametrelerin polen analizi, optik çevirme açısı, %nem, %briks, elektriksel iletkenlik, pH, renk değeri, kimyasal parametrelerden; prolin sonuçları Tablo 24'teki gibidir.

3.3.1. Optik Çevirme Sonucu [$^{20} [\alpha] D$] (α – Rotasyon)

Optik çevirme değeri polarimetre cihazı (Beta PPP7 Optical Activity, İngiltere) kullanılarak tayin edildi (Junk ve Pancoast, 1973). Polarize ışığı çevirme açısı olan α -rotasyon değeri salgı ballarının çiçek ballarından ayırt edilmesini sağlamaktadır. Çiçek balları negatif, bir değer iken salgı balları pozitif değere sahiptir (White, 1989). Çiçek balı olan ormangülü balında numunenin optik çevirme açısı -2,15 olarak elde edildi. Sonuçlar aşağıdaki tabloda (Tablo 24) verildi.

3.3.2. Nem Analiz Sonucu

Baldaki nem içeriği, standart referans bir metot (TS 3036, 2002) olan refraktometre (Atago, Almanya) yardımıyla balın kırılma indisinden faydalanılarak % nem içeriği ve % briks değerleri olarak belirlendi. Belirlenen değerler Tablo 24'te gösterildi. Baldaki nem miktarı; balların raf ömürlerinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Yüksek nem içeriği balın olgunlaşmadığını (erken hasat edildiğini) göstermekle beraber balda fermantasyon olmasına, bu sebeple erken bozunmasına ve kristalizasyona neden olmaktadır. Aynı zamanda nem miktarı balın toplandığı bölgenin coğrafik özelliklerine, hasat zamanına ve biçimine göre de değişim gösterir (Oddo ve Piro 2004; Bogdanov vd., 2004). Balda nem içeriği Türk Gıda Kodeksine (TGK) göre en fazla % 20 olmalıdır. Deney hayvanlarına verilmek üzere kullanılan ormangülü balının nem içeriği % $19,00 \pm 0,50$ 'dir. Refraktometre ile %briksi okunup %nemi hesaplandı.

3.3.3. Elektriksel İletkenlik Analiz Sonucu

Bir maddenin elektriği taşıma yeteneği olan elektriksel iletkenlik değeri balda mineral madde içeriğine dayanmaktadır (Andrade vd., 1997a). TSE standartlarına göre baldaki elektriksel iletkenlik değerleri çiçek balında 0,8 milisiemens/cm'den ($800 \mu\text{S}/\text{cm}$) fazla olmamalıdır. Çalışmamızda kullanılan ormangülü balının elektriksel iletkenlik değerleri $0,557 \pm 0,012$ milisiemens/cm'dir (Tablo 24).

3.3.4. pH Ölçüm Sonucu

Balın pH değerleri değişik şartlar altında 3,4 ile 5,5 arasında olabileceği gibi ortalama 3,9'dur. Ormangülü balı için ölçülen pH değerleri $4,20 \pm 0,02$ 'dir. Sonuçlar Tablo 24'teki gibidir.

3.3.5. Renk Analiz Sonucu

Balın renk değeri önemli bir fiziksel parametredir ve bitki florasın, mineral madde miktarı, içerdiği vitamin, pigment, fenolik madde miktarı ve ısıtma işlem etkisi, balın uzun süre bekletilmesi, içerdiği HMF miktarından etkilenmektedir. Bitkide bulunan klorofil, karoten, ksantofil türü bileşenler sarı-yeşil renk verirler (Ulusoy ve Kolaylı, 2013). Bal numunesinin rengi, Hunter L,a,b renk ölçüm sisteminde Konica Minolta aygıtı ile ölçüldü. Renk değerleri 3 okuma değerinin ortalaması alınarak belirlendi. Okunan değerlerin ortalama ve standart sapmaları Tablo 24’te verilmektedir.

Tablo 24. Deli balın optik çevirme, nem, briks, iletkenlik, pH, renk ve prolin sonuçları

Fiziksel parametre		Değer
Optik Çevirme [20 $[\alpha]$ D]		-2,15±0,05
%Nem		19,00±0,50
%Briks		81,00± 0,50
pH		4,20±0,05
İletkenlik (mS/cm)		0,557±0,00
Renk	L	81,53±0,75
	a	27,43±0,42
	b	72,65±1,28
Prolin		853,5 mg/kg

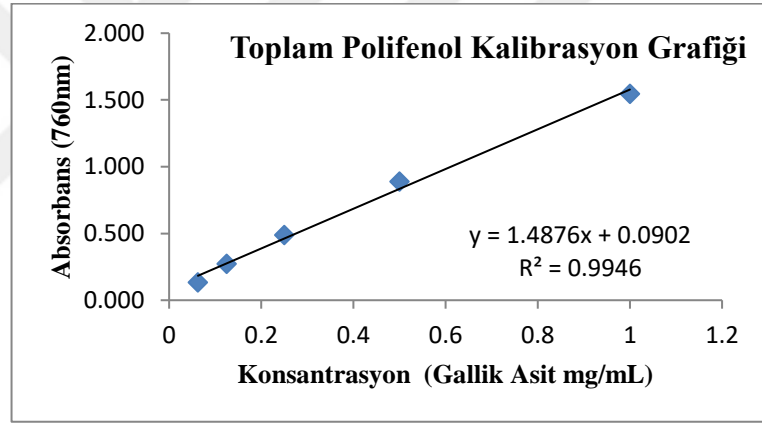
Hunter metounda L,a,b renk değerleri: L; koyuluk/açıklık (0: siyah; 100:beyaz), a; (-a, yeşillik; +a, kırmızılık) ve b; (-b, mavilik; +b, sarılık) anlamına gelmektedir (Yıldız ve Alpaslan 2011).

3.3.6. Prolin Tayini Sonucu

Tayin prolinin ninhidrin ile renkli kompleks oluşturup spektrofotometrik bir metotla baldaki prolin miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. Prolinin standart olarak kullanıldığı çalışma grafiği yardımıyla baldaki prolin miktarı gerekli katsayılarla (örnek bal genelde 2 kat seyletilir) çarpılarak mg/kg cinsinden hesaplandı. Balın prolin değerinin 853,5 mg/kg olduğu analiz edildi (Tablo 24).

3.3.7. Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin Antioksidan Özellikleri

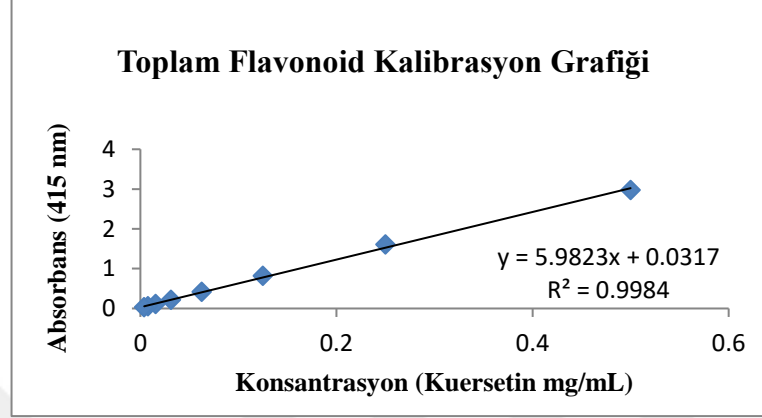
Toplam fenolik madde testi sonucu için bal ve kuru bitki örneklerinin metanolik ekstraktları hazırlanarak toplam fenolik madde miktarı gallik asit standardına göre tayin edildi. 760 nm'deki elde edilen absorbans değerleri y-ekseninde; standartların konsantrasyon değerleri x-ekseninde yazılarak standart çalışma grafiği hazırlandı. Hazırlanan standart çalışma grafiğine göre absorbans değerleri konsantrasyonla doğru orantılı olup elde edilen doğru denklemi $y=1,4876x+0,0902$ olarak tespit edildi (Şekil 16). Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g balda ve 1 g kuru bitkide toplam fenolik madde miktarı mg gallik asit cinsinden belirlendi. Örneklerin toplam fenolik madde miktarları Tablo 26'daki gibidir. Bitkideki değer bala göre daha yüksek bulundu.



Şekil 16. Toplam polifenol kalibrasyon grafiği

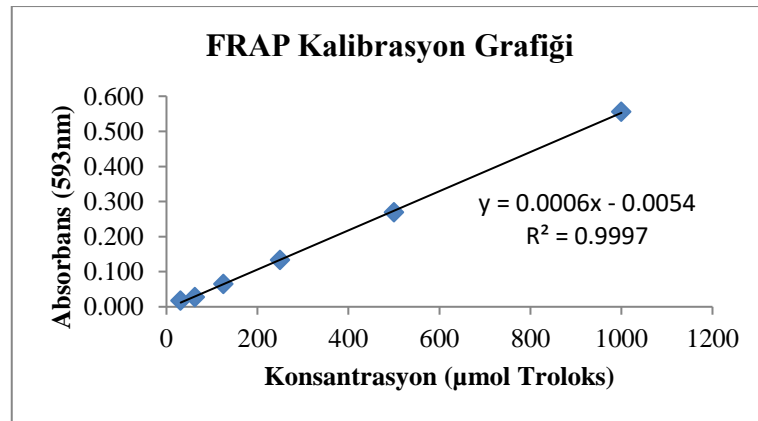
Toplam flavonoid madde testi sonucu için metanolik olarak hazırlanmış olan bal ve bitki örneklerinde toplam flavonoid madde miktarları kuersetin standardına göre hesaplandı. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart kuersetin çözeltileri yardımıyla toplam flavonoid madde miktarları tayin edildi. Elde edilen 415 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde; konsantrasyon değerleri x-eksenine yazılıp bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen doğru denklemi $y=5,9823x+0,0317$ olarak tespit edilip (Şekil 17) bu denklemden faydalanılarak 1 g balın ve 1 g kuru bitkinin mg kuersetin cinsinden toplam flavonoid madde miktarı hesaplandı. Toplam flavonoid madde miktarı

balda 0,010; bitki ekstraktında 0,053 mg QE/g numune olarak hesaplandı. Sonuçlar Tablo 25'teki gibidir.



Şekil 17. Toplam flavonoid madde kalibrasyon grafiği

FRAP yöntemi ile $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Troloks® eşdeğeri, demir (III)'ü indirgeme yeteneğine sahip antioksidanların konsantrasyonu belirlenir. Standart çalışma grafiği için Troloks®'un farklı konsantrasyonlarıyla oluşturulan standart kalibrasyon grafiği aşağıda verildi (Şekil 18) Balın FRAP sonuçları Tablo 25'teki gibidir.



Şekil 18. FRAP kalibrasyon grafiği

DPPH testinde üç paralel halinde hazırlanan numuneden $750 \mu\text{L}$, üzerine DPPH• radikal çözeltisinden de $750 \mu\text{L}$ eklenip oda sıcaklığında karanlıkta 50 dakika bekletilip

süre sonunda DPPH• radikalinin mor menekşe rengi pembeden sarıya doğru açılan renk tonları oluşturdu.

Tablo 25. Toplam polifenol, toplam flavonoid, FRAP ve DPPH testleri sonucu

	FRAP			
	TP mg GAE/g numune	TF mg KE/g numune	μ mol FeSO ₄ .7H ₂ O/g numune	DPPH• SC ₅₀ (mg/mL)
Deli Bal	16,10±0,40	1,00±0,00	3,30±0,54	25,960±0,69
Orman				
Gülü	57,40±1,80	5,30±0,20	132,00±0,03	0,200±0,01
Ekstraktı				

Rhododendron çiçeği ekstraktının ve bal ekstraktının antioksidan analiz sonuçları Tablo 25'teki gibidir. Bitkideki değerler bala kıyasla daha yüksek bulundu.

3.3.8. Deney Hayvanlarına Verilen Örneklerin HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini Sonucu

19 fenolik bileşenle (Şekil 19) gerçekleştirilen ormangülü balı örneğinin analizinde balda bulunan major bileşenlerin protokatekuik asit ve rutin olduğu tespit edildi. Orman gülü çiçeği ise fenolik bileşimi zengin bir bitkidir ve fenolik bakımından major bileşenleri protokatekuik asit, kateşin ve myrecetindir (Şekil 21). Balın ve bitki ekstraktının fenolik bileşen sonucu μ g fenolik bileşen/g numune cinsinden Tablo 26'daki gibidir.

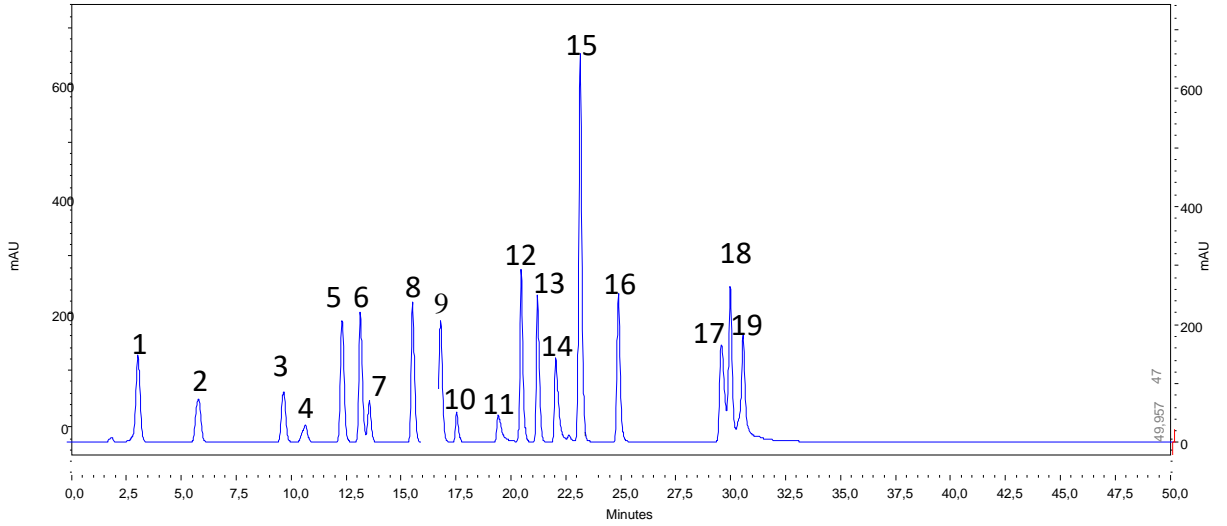
Tablo 26. Bal ve *Rhododendron luteum* çiçeğinin fenolik bileşen kompozisyonu

	Standartlar	μ g fenolik bileşen /g bal)	μ g fenolik bileşen /g kuru bitki)
1	Gallik Asit	T.E.	T.E.
2	Protokatekuik Asit	21,46±0,00	971,30±0,00
3	<i>p</i> -OH benzoik Asit	1,98±0,00	27,86±0,00
4	Kateşin	T.E.	1105,97±0,00
5	Kafeik asit	0,87±0,00	14,88±0,00

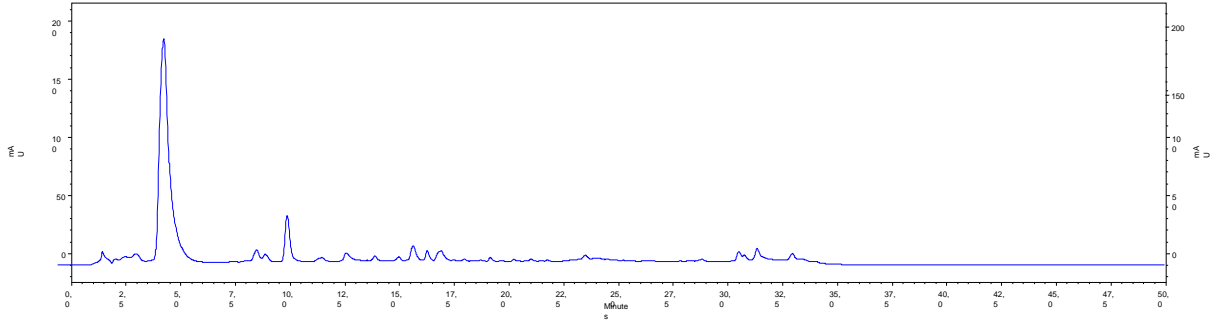
Tablo 26'nın devamı

6	Şiringik Asit	T.E.	51,15±0,00
7	Epikateşin	T.E.	14,19±0,00
8	<i>p</i> -kumarik Asit	0,36±0,00	69,47±0,00
9	Ferulik Asit	1,50±0,00	23,24±0,00
10	Rutin	7,79±0,00	74,09±0,00
11	Myeresetin	T.E.	318,99±0,00
12	Resveratrol	T.E.	85,75±0,00
13	Daidzein	T.E.	T.E.
14	Luteolin	T.E.	T.E.
15	<i>t</i> -sinnamik Asit	0,17±0,00	26,47±0,00
16	Hesperetin	T.E.	T.E.
17	Krisin	2,35±0,00	43,31±0,00
18	Pinosembrin	0,24±0,00	6,08±0,00
19	CAPE	1,40±0,00	15,61±0,00

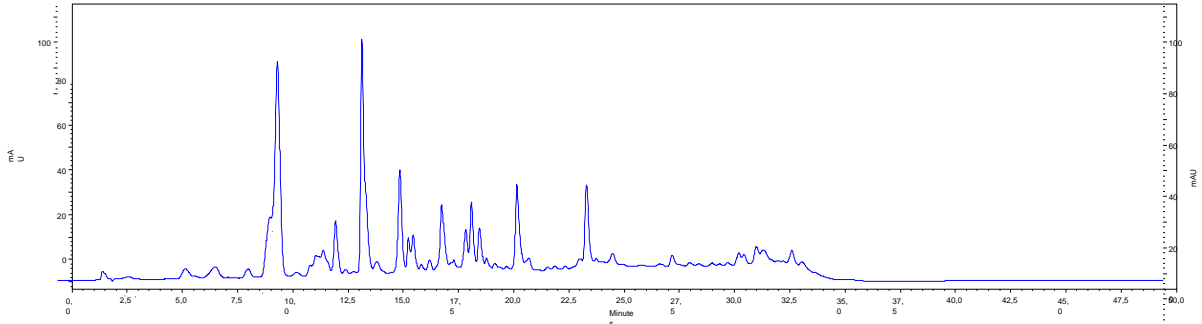
T.E. : Tespit Edilmedi



Şekil 19. HPLC-UV ile standart fenolik bileşenlerin kromatogramı. (1)gallik asit, (2)protokatekuik asit, (3)*p*-OH benzoik asit, (4)kateşin, (5)kafeik asit, (6)şiringik asit, (7)epikateşin, (8)*p*-kumarik asit, (9)ferulik asit, (10)rutin, (11)myeresetin, (12)resveratrol, (13)daidzein, (14)luteolin, (15)*t*-sinammik asit, (16)hesperetin, (17)krisin, (18)pinosembrin, (19)kafeik asit fenil esteri (CAPE).



Şekil 20. Deli balın HPLC-UV kromatogramı



Şekil 21. *Rhododendron* çiçeğinin HPLC-UV kromatogramı

3.4. Deney Hayvanları Çalışması Sonuçları

Deney hayvanları çalışmasında bir bal ve bir bitki numunesi kullanıldı. Bu numuneler içerisinde barındırdığı GTX-III miktarına göre seçildi. Bal numunelerinin GTX-III konsantrasyonları düşük olduğu için en yüksek GTX-III konsantrasyonuna ait bal (MH2 Artvin, Hopa (24,94 ppm)); bitkilerden ise toksik olmaması açısından ortalama GTX-III konsantrasyonuna sahip bitki (Trabzon, Köprübaşı, Madur Dağı (155,8 ppm)) seçildi.

3.4.1. Deney Hayvanlarının Tansiyon Ölçüm Sonuçları

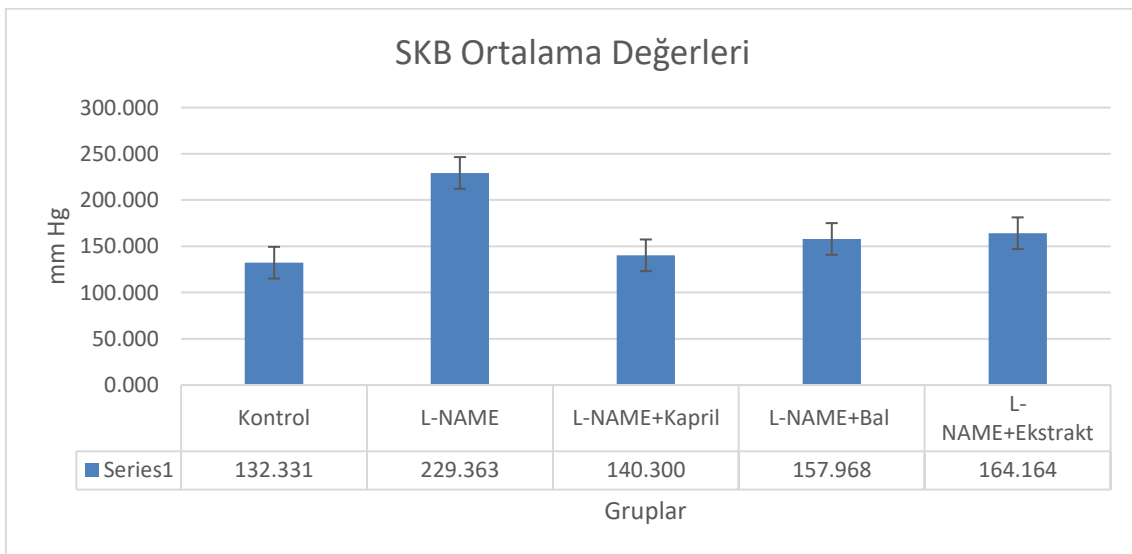
Kontrol grubuna serum fizyolojik; diğer tüm gruplara 15 gün boyunca tansiyonlarını yükseltmek (hipertansif sıçan modeli oluşturmak) için L-NAME i.p. (intraperitoneal) yoldan verildi. 15.gün sonunda kontrol grubu ve diğer grupların tansiyonları ölçüldü ve

hayvanların tansiyonlarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu anlaşıldı. 15.günden sonra bir standart grup ve iki tedavi grubuyla L-NAME enjeksiyonuna ilaveten bu 3 grupta gavaja (Kapril (standart), Bal, Ekstrakt) devam edildi. 30.günde 5 grubun da tansiyonları ölçüldü. Sonuçlar Tablo 27'deki gibidir.

Tablo 27. Sistolik ve diastolik kan basıncı ortalama sonuçları ve standart sapmaları

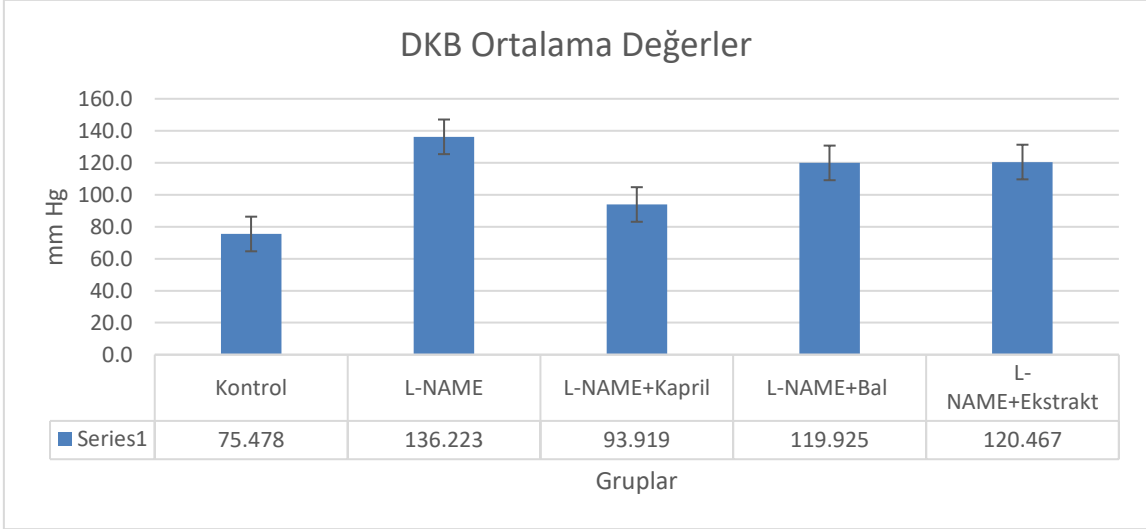
Gruplar	Sistolik kan basıncı	Diastolik kan basıncı
Kontrol	132,331±7,630 ^a	75,478±8,439 ^a
Hipertansiyon Grubu (L-NAME)	229,363±6,372 ^c	136,223±7,270 ^d
Standart Grubu (Kapril)	140,300±6,457 ^b	93,919±6,686 ^b
Tedavi Grubu (Bal)	157,968±9,504 ^c	119,925±9,536 ^c
Tedavi Grubu (Ekstrakt)	164,164±8,116 ^d	120,467±7,946 ^c

L-NAME ile 15.güne kadar tansiyonları yükseltilen hayvanların sonuçlara göre 30. günde tansiyonlarının daha düşük sayısal veriler olduğu kaydedildi. Bu sayısal verileri eki anlamlandırmak için tek yönlü varyans analizi (Oneway ANOVA) testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi. $p < 0.001$ ve $p < 0.05$ düzeyindeki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm veri analizleri IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Statistics 21 paket programları ile yapıldı.



Şekil 22. Hayvanların 30 gün sonundaki sistolik kan basıncı ortalamaları

Yaptığımız çalışmada; Kontrol grubuyla L-NAME grubu arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,001$). Ayrıca L-NAME grubunda sistolik basıncının 229,363 olarak ölçüldüğü (Şekil 22) ve L-NAME'ye kıyasla tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azalma olduğu görüldü ($p<0.001$).

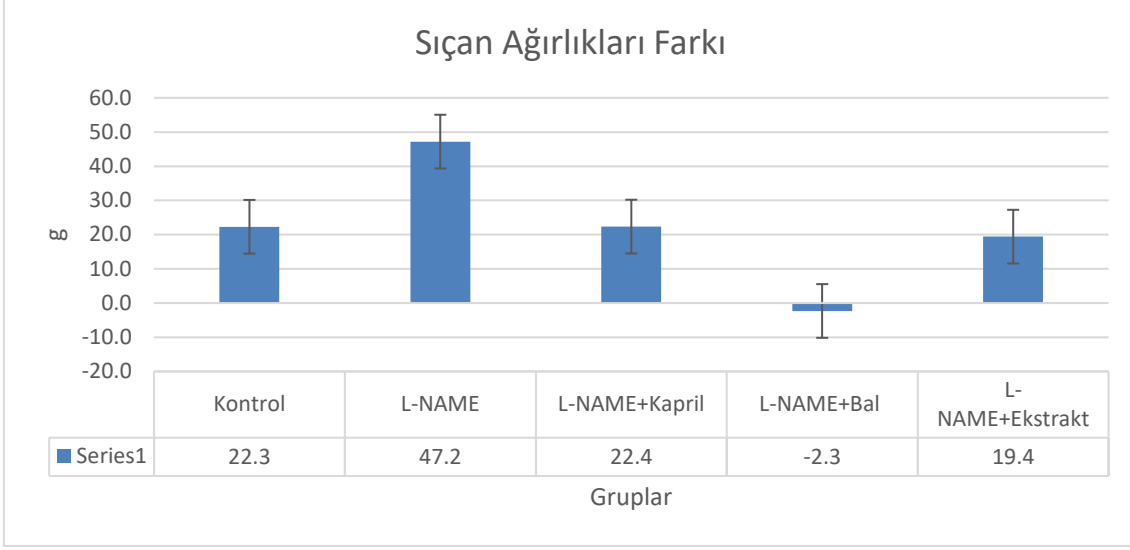


Şekil 23. Hayvanların 30 gün sonundaki diastolik kan basıncı ortalamaları

Bu çalışmada; Kontrol grubuyla L-NAME grubu arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,001$). Ayrıca L-NAME grubunun diastolik basıncının 136,223 olarak ölçüldüğü ve L-NAME'ye kıyasla tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azalma olduğu görüldü ($p<0.001$) (Şekil 23).

3.4.2. Hayvanların Vücut Ağırlığının Takibi

Sıçanlar 1 ay boyunca; 1.gün ve 30.gün olmak üzere 2 kez elektronik tartı ile tartıldı. Sıçanların ağırlık farkları ortalaması gram cinsinden Şekil 24'teki gibidir.



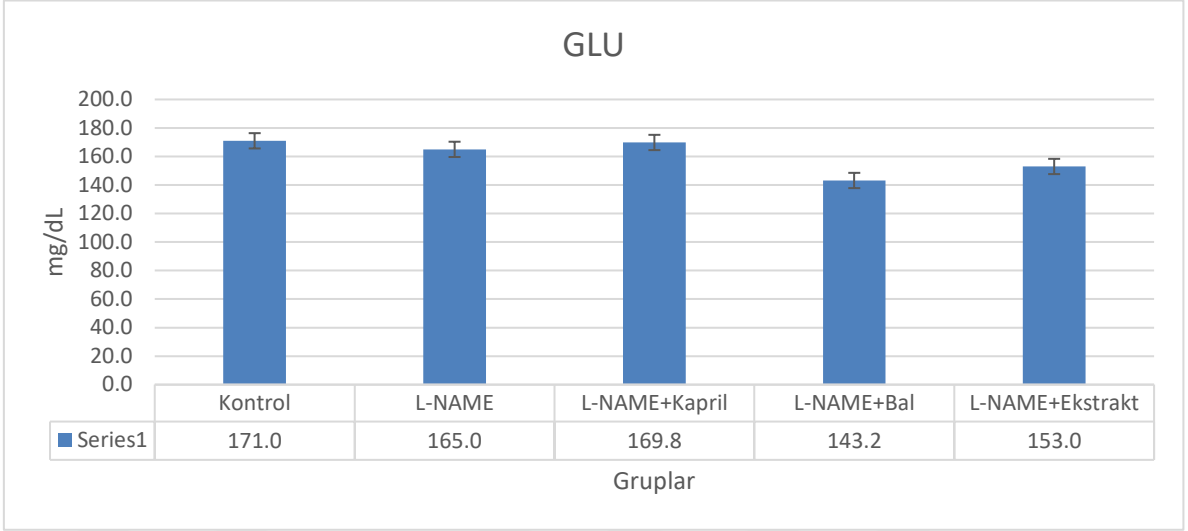
Şekil 24. Sıçanların 30. gün ve 1.gün ortalama ağırlıkları farkı

Grafiğe bakıldığında sadece L-NAME alan hayvanların kilolarında artış görülürken, tansiyon düşürücü ilaç olarak kapril alan grup (standart grup) ve tedavi gruplarında (bal, ekstrakt) kilo kaybının olduğu görülmektedir. Ancak istatistiksel olarak bakıldığında L-NAME grubuna göre (Tedavi) Bal ve (Tedavi) Ekstrakt gruplarında anlamlı bir düzeyde kiloda azalma olduğu ($p < 0.05$); kontrol ve kapril gruplarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p > 0.05$).

3.4.3. Dekapitasyon ve Serumda Bazı Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları

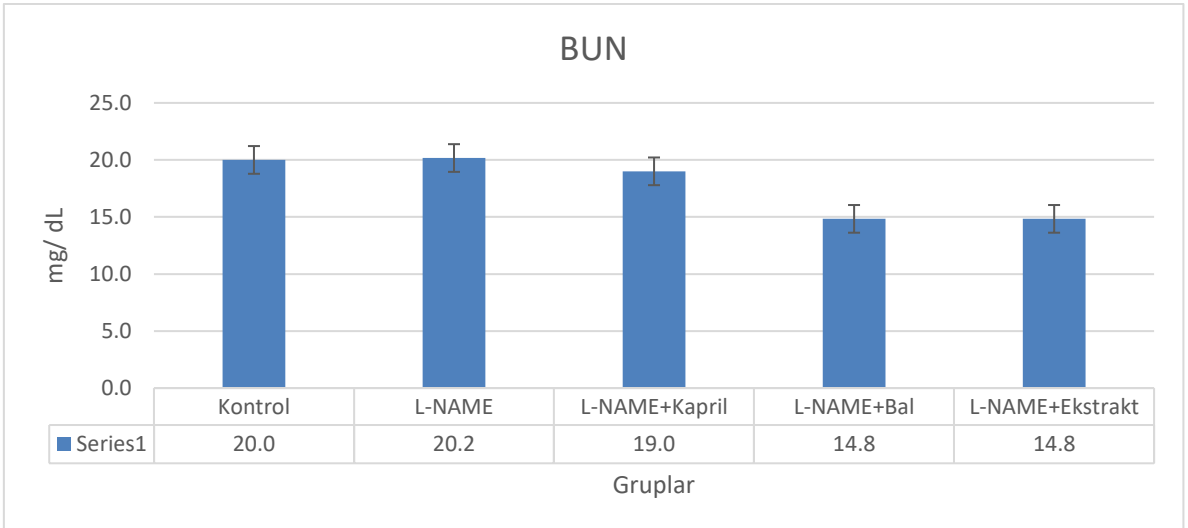
Mevcut tez çalışmasında biri kontrol olmak üzere 5 farklı grup (L-NAME, Kapril, Bal, Ekstrakt) oluşturuldu. Otuz günlük besleme sonucunda dekapite edilen sıçanların serumları alındı ve bir kısmı hizmet alımı yoluyla biyokimyasal analizler (Glukoz, Aspartat Aminotransferaz, Alkalen Fosfataz, Laktat Dehidrogenaz, Kreatin Kinaz, Kan Üre Azotu) için kullanıldı. Diğer kısmı aligotlar halinde -80°C 'daki dondurucuda saklandı. Tablo 28'de serumda biyokimyasal analizi yapılan parametrelerin ölçüm sonuçları ortalama ve standart sapma olarak verildi.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi (Oneway ANOVA) kullanıldı ve $p < 0.05$ düzeyindeki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 25. Glukoz sonuçları ve karşılaştırılması

Glukoz miktarı ortalama sonuçları istatistiksel olarak L- NAME grubuyla tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir fark olduğunu, tedavi gruplarındaki serumdaki glukoz miktarının anlamlı bir düzeyde azaldığını göstermektedir ($p < 0.05$) (Şekil 25).

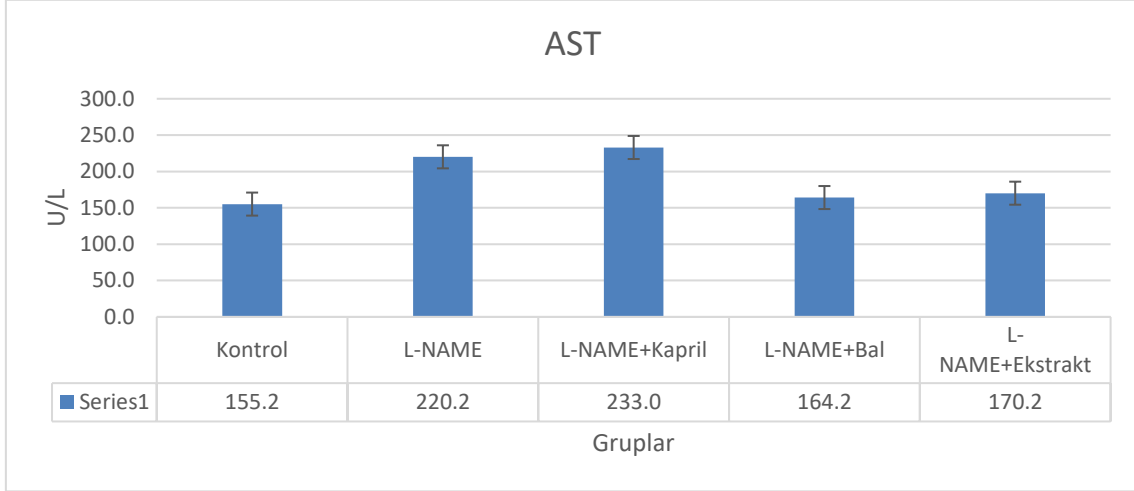


Şekil 26. BUN sonuçları ve karşılaştırılması

Tablo 28. Deneysel hayvanların serum parametreleri ölçüm sonuçları

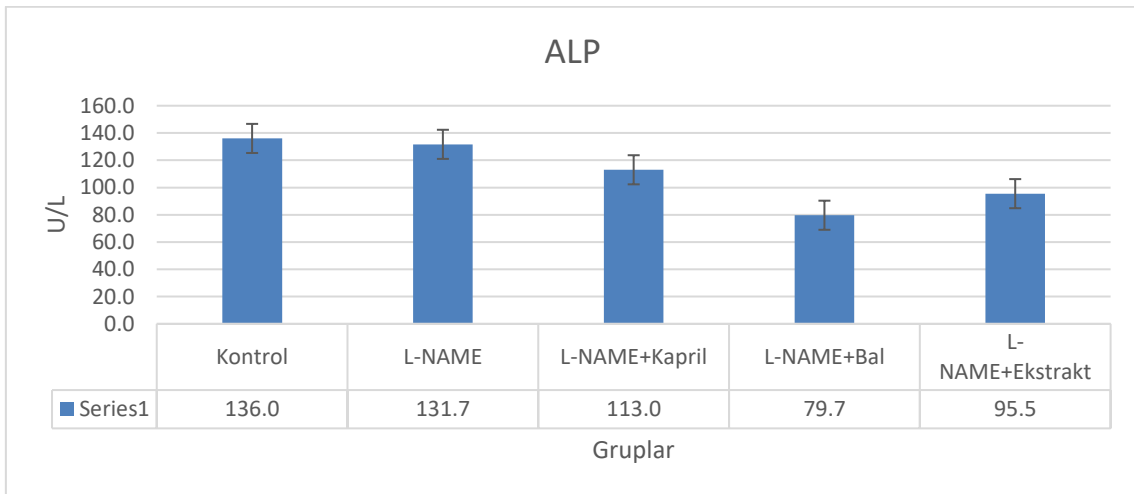
Gruplar	Biyokimyasal Parametreler					
	Glukoz	BUN	AST	ALP	CK	LDH
Kontrol Grubu	171,00±3,29 ^d	20,00±2,37 ^b	155,17±5,12 ^a	136,00±1,26 ^e	5554,00±15,14 ^b	537,67±9,63 ^a
Hipertansiyon Grubu	165,00±3,35 ^c	20,17±0,75 ^b	220,17±7,55 ^c	131,67±2,88 ^d	8167,50±68,61 ^c	655,00±9,25 ^b
Standart Grup	169,83±4,58 ^d	19,00±1,10 ^b	233,00±5,40 ^d	113,00±4,00 ^c	12135,50±89,58 ^e	535,67±3,01 ^a
Tedavi Grubu(Bal)	143,17±3,87 ^a	14,83±1,47 ^a	164,17±1,33 ^b	79,67±1,63 ^a	8835,83±32,69 ^d	758,17±1,72 ^c
Tedavi Grubu(Biüki)	153,00±2,90 ^b	14,83±0,75 ^a	170,17±4,12 ^b	95,50±2,26 ^b	3158,17±22,86 ^a	648,33±9,75 ^b

BUN ortalama sonuçlarına istatistiki anlamda bakıldığında L- NAME ve tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir fark olduğu ve istatistiksel anlamda bir düşüş olduğu bulundu ($p<0.05$) (Şekil 26).



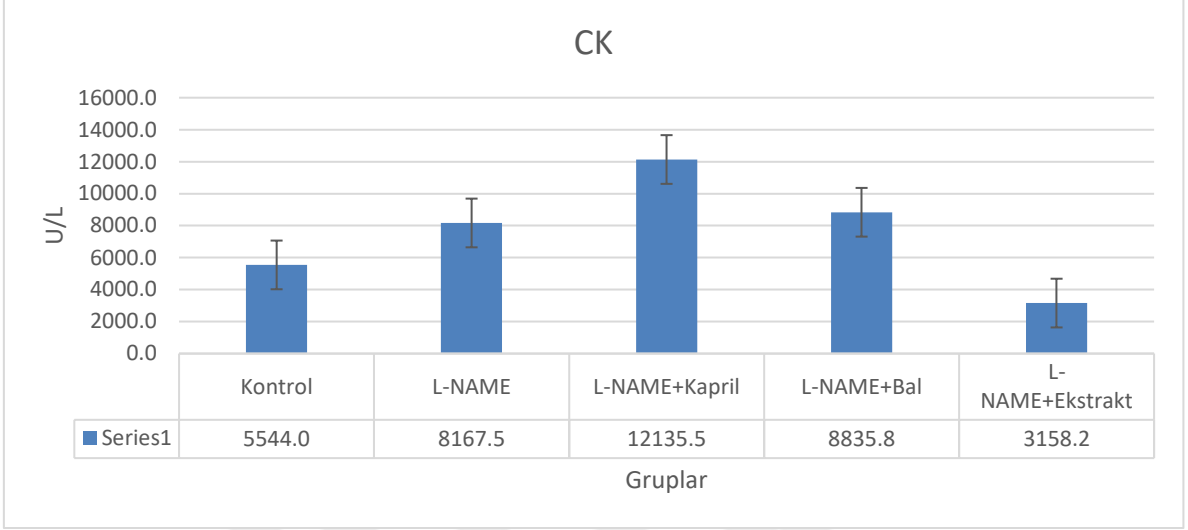
Şekil 27. AST sonuçları ve karşılaştırılması

AST sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuyla L-NAME grubu arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0.05$) (L-NAME grubundaki anlamlı artış.). Ayrıca L- NAME ve tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir azalış olduğu görüldü ($p<0.05$) (Şekil 27).



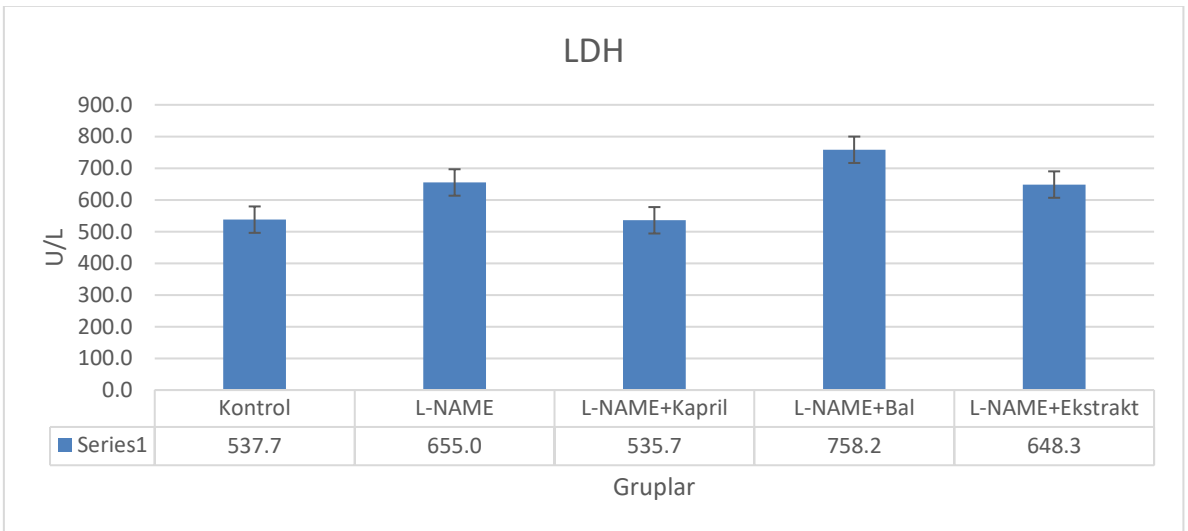
Şekil 28. ALP sonuçları ve karşılaştırılması

ALP sonuçlarında istatistiki olarak L- NAME ve tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir düzeyde azalma bulunmaktadır ($p<0.05$) (Şekil 28).



Şekil 29. CK sonuçları ve karşılaştırılması

CK sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuyla L- NAME grubu arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0.05$). Ayrıca L- NAME ve tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0.05$) (Şekil 29).



Şekil 30. LDH sonuçları ve karşılaştırılması

LDH sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuyla L- NAME grubu arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0.05$). Ayrıca L- NAME grubuna göre tedavi gruplarında (Bal, Ekstrakt) anlamlı bir düzeyde fark olduğu görüldü ($p<0.05$) (Şekil 30).

Sonuç olarak serumda yapılan tüm biyokimyasal analizler (Glukoz, Aspartat Aminotransferaz, Alkalen Fosfataz, Laktat Dehidrogenaz, Kreatin Kinaz, Kan Üre Azotu) sonucunda L- NAME grubuna göre tedavi gruplarında (Bal, Ekstrakt) anlamlı bir düzeyde fark olduğu görüldü ($p<0.05$).

3.4.4. Doku Homojenatlarında Yapılan Analizlerin Sonuçları

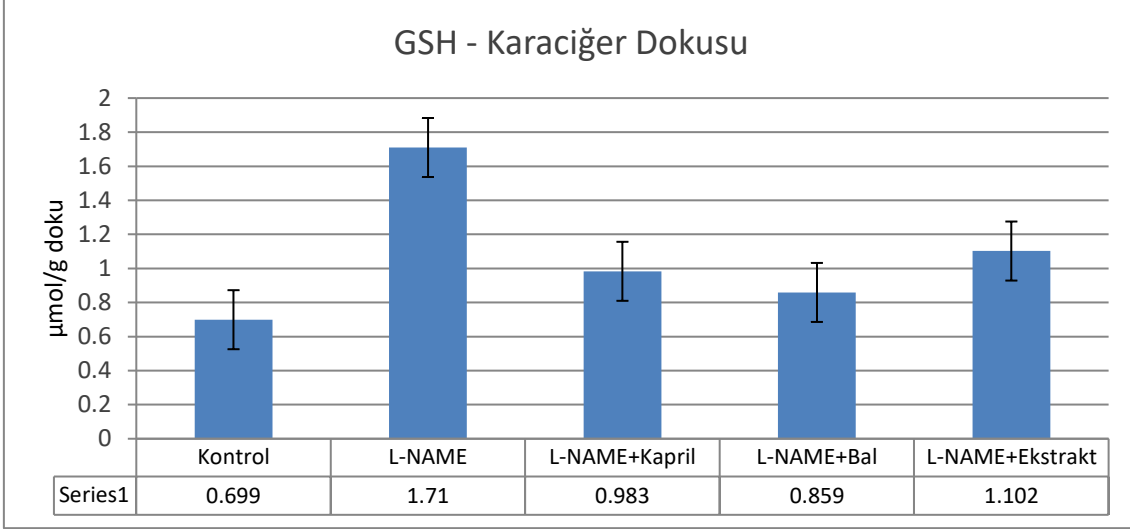
3.4.4.1. Doku Homojenatlarında GSH Bulguları

Karaciğer ve böbrek dokularında GSH düzeylerinin sonuçları ($\mu\text{mol/g}$ doku) Tablo 29'da değerlendirildi (ortalama \pm standart sapma).

Tablo 29. Karaciğer ve böbrek dokularındaki GSH testi bulguları

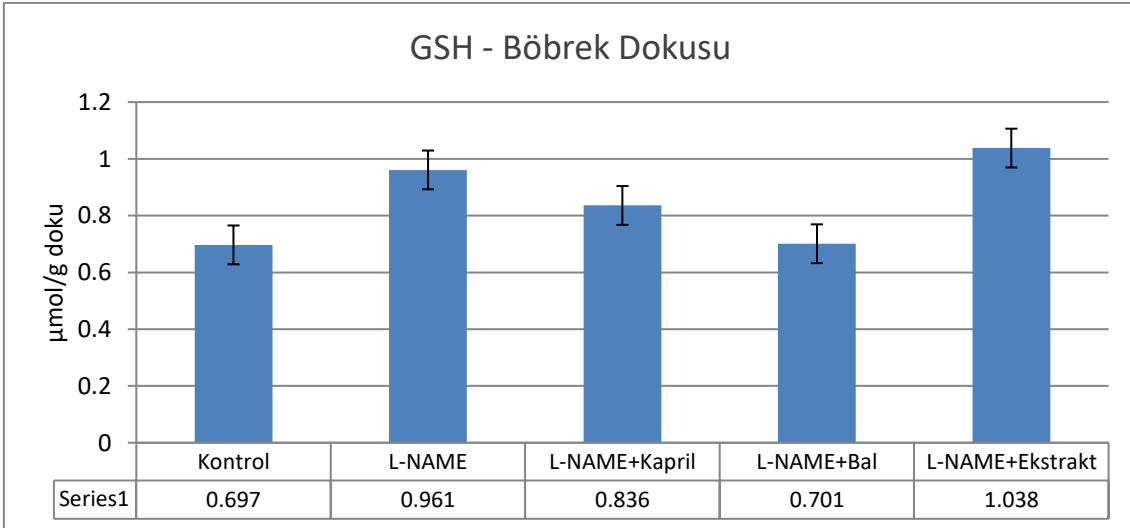
Gruplar	Karaciğer	Böbrek
Kontrol Grubu	0,699 \pm 0,110 ^a	0,697 \pm 0,052 ^a
Hipertansiyon Grubu	0,983 \pm 0,135 ^b	0,836 \pm 0,066 ^b
Standart Grup	0,859 \pm 0,058 ^a ^b	0,701 \pm 0,051 ^a
Tedavi Grubu(Bal)	1,710 \pm 0,316 ^c	0,961 \pm 0,014 ^c
Tedavi Grubu(Bitki)	1,038 \pm 0,073 ^b	1,102 \pm 0,190 ^d

Karaciğer dokusunda L-NAME ve bal grubu arasında anlamlı bir fark bulunduğu tespit edildi ($p< 0.05$), (Şekil 31).



Şekil 31. Karaciğer dokusundaki GSH sonuçları ve karşılaştırılması

Böbrek dokusunda L-NAME ile kapril, bal ve ekstrakt grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p < 0.05$), (Şekil 32).



Şekil 32. Böbrek dokusundaki GSH sonuçları ve karşılaştırılması

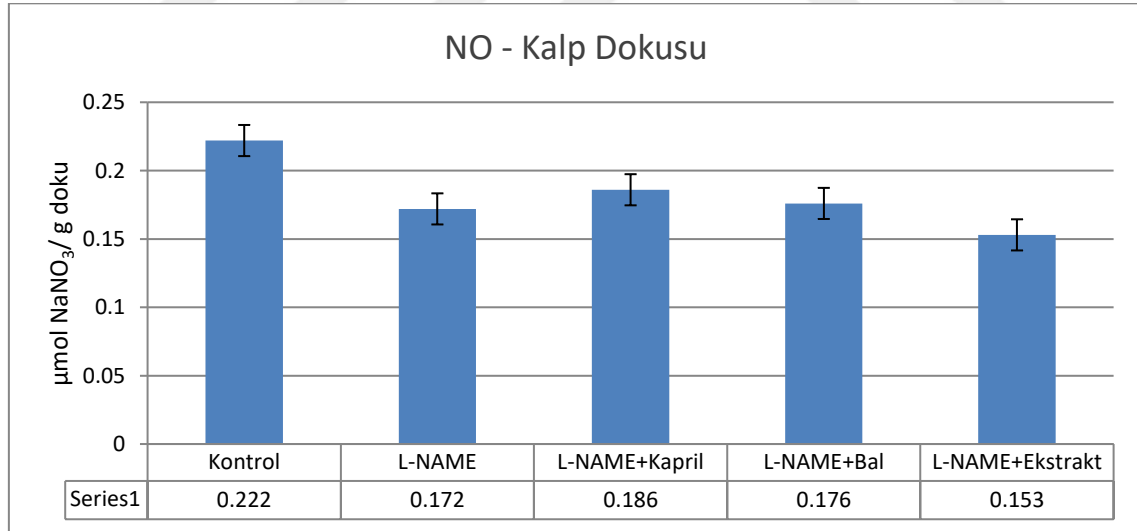
3.4.4.2.Doku Homojenatlarında NO Bulguları

Kalp, karaciğer, böbrek doku homojenatlarında NO düzeylerinin sonuçları ($\mu\text{mol NaNO}_3/\text{g doku}$) istatistiksel olarak Tablo 30'da değerlendirildi (ortalama \pm standart sapma).

Tablo 30. Kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki NO testi bulguları

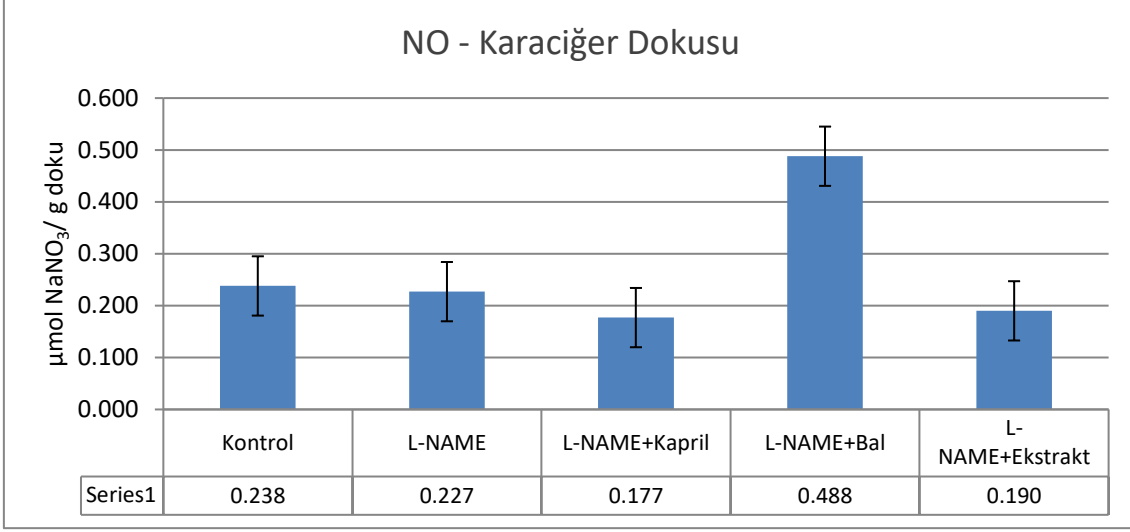
Gruplar	Kalp	Karaciğer	Böbrek
Kontrol Grubu	0,222 \pm 0,030 ^d	0,238 \pm 0,056 ^b	0,218 \pm 0,012 ^{ab}
Hipertansiyon Grubu	0,172 \pm 0,023 ^{ab}	0,227 \pm 0,049 ^{ab}	0,274 \pm 0,031 ^c
Standart Grup	0,186 \pm 0,009 ^{bc}	0,177 \pm 0,023 ^a	0,204 \pm 0,037 ^a
Tedavi Grubu(Bal)	0,176 \pm 0,021 ^{cd}	0,488 \pm 0,046 ^c	0,236 \pm 0,029 ^b
Tedavi Grubu(Bitki)	0,153 \pm 0,009 ^a	0,190 \pm 0,038 ^{ab}	0,192 \pm 0,032 ^a

Kalp dokusunda gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0.05$) (Şekil 33).



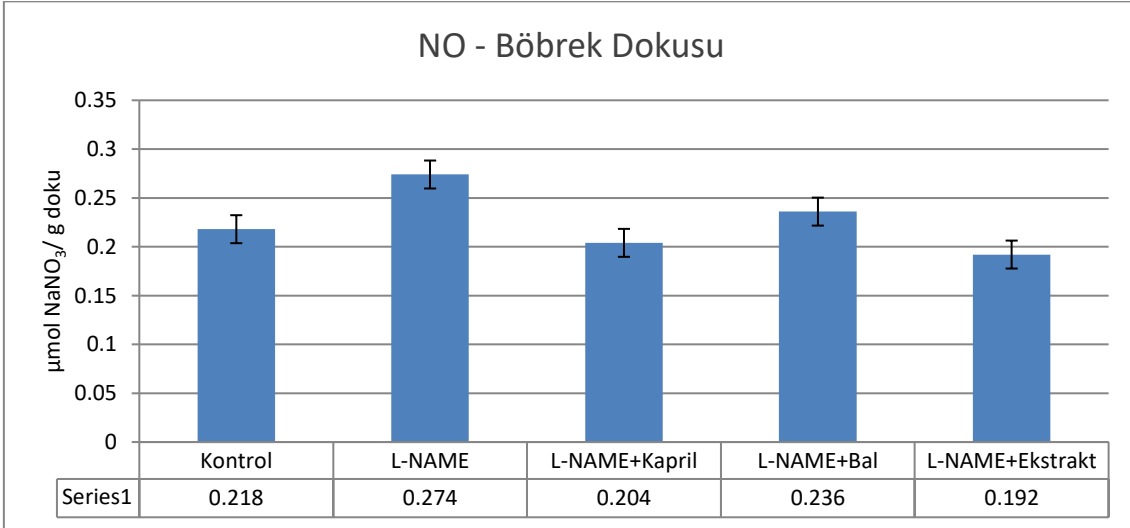
Şekil 33. Kalp dokusundaki NOx sonuçları ve karşılaştırılması

Karaciğer dokusunda L-NAME grubu ile bal grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmaktadır ($p<0.05$) (Şekil 34).



Şekil 34. Karaciğer dokusundaki NOx sonuçları ve karşılaştırılması

Böbrek dokusundaki NO düzeylerine istatistiki olarak bakıldığında L-NAME ile tedavi grubu olan ekstrakt ve kapril grupları arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0.05$) (Şekil 35).



Şekil 35. Böbrek dokusundaki NOx sonuçları ve karşılaştırılması

4. TARTIŞMA

Türkiye bulunduğu coğrafik konumundan dolayı dünyadaki en zengin bitki florasına sahip ülkelerden biridir. Orman gülü bitkisi Karadeniz yöresinde yetişen çalı tipinde bir bitki olup *Rhododendron ponticum* (mor çiçekli, komar çiçeği), *Rhododendron luteum* (sarı çiçekli, zifin çiçeği) türleri ile bölgeye endemiktirler. Bu zengin floranın bize bir armağanı da ülkemizdeki bal çeşitliliğinin çok fazla olmasıdır. Balın bileşimi, arıların ziyaret ettiği çiçeklere ve balın toplandığı alanın hava koşullarına büyük ölçüde bağlıdır (Sahin vd., 2015). Bahsi geçen her iki bitkiden nektar ve polen alan bal arısının ürettiği ballar, içerisinde bulunan grayanotoksin (GTX) bileşiklerinden dolayı zehirlidir ve deli bal olarak tanınır. Efsanelere konu olmuş deli balın tüketilmesi ile birlikte oluşan zehirlenmede özellikle kardiyovasküler sistemle ilgili bradikardi, hipotansiyon başta olmak üzere miyokard enfarktüsü, kalp ritm bozuklukları gibi bulgular ortaya çıkabilmektedir. Mide bulantısı, kusma, baş dönmesi, göz kararması, bulanık görme, hipotansiyon, tükürük salgılanması, şuur kaybı ve bayılma gibi şikayetlerle sağlık kuruluşlarına hastalar başvurmaktadır (Gunduz vd., 2006; Gunduz vd., 2007; Gunduz vd., 2008; Gunduz vd., 2008a). Halk arasında damar genişletici özelliğinden dolayı içerdiği GTX miktarına göre toksisitesi değişen bu bal tansiyon düşürücü olarak kullanılmaktadır. Ancak GTX-III miktarı bilinen ballarla yapılmış bilimsel bir araştırmaya literatürde rastlanamadı. Tıbbi bal niteliği taşıyan bu Türk balının hipertansiyonu düşürücü etkisinin deneysel olarak belirlenmesi durumunda çalışma başka araştırmalar için de ışık tutucu olacaktır. Balın ve *Rhododendron* bitkisinin gelecekte doğal tansiyon düşürücü ilaç/takviye edici besin olma niteliği bilimsel olarak da ispatlanmış olacaktır. Kardiyovasküler sistem problemlerine ait sorunların giderilmesinde destek tedavi amaçlı kullanılmasının yanısıra ve ayrıca orman gülü balının üretiminin yaygınlaştırılmasına ve arı üreticilerini de bu balın üretimine teşviğine yönelik araştırmalar yapılacak olması bu tezi özgün kılmaktadır.

Bu çalışma ile L-NAME ile hipertansiyon oluşturulan deney hayvanları modelinde, GTX içeren sarı renkli orman gülü çiçeğinin ekstresi ve deli balın oral yolla (gavaj) deney hayvanlarına verilerek tansiyonları takip edilerek deney hayvanlarında anti-hipertansif etkilerinin olup olmadığı ortaya çıkarılmaya çalışıldı. Buna ek olarak deney hayvanlarının kan serumundaki bazı biyokimyasal parametreler ve oksidatif stres üzerinden bazı dokularındaki biyokimyasal değişiklikler incelendi.

Balın saflığı ve doğallığı gıda kodekslerine (TSE, TGK vb.) bakıldığında fiziksel olarak; nem, iletkenlik, renk değeri (L,a,b), asitlik, pH, kül miktarı, kimyasal olarak; şeker oranı, (%C4/C13), prolin içeriği, diastaz aktivitesi, hidroksimetilfurfural değeri (HMF), mineral içeriği ve çözünmeyen maddeler gibi kriterler kullanılarak belirlenmektedir (Molina, 1989; White, 1978; Can vd., 2015). Balın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi yardımıyla saflığı ve doğallığı belirlenmektedir.

Sadece hayvan testlerinde kullanılan balın kimliğinin detaylandırılması için diğer fiziksel ve kimyasal parametrelerine bakıldı. Fiziksel testlerden; polen analizi, optik çevirme açısı, %nem, %briks, elektriksel iletkenlik, pH, renk değeri, kimyasal parametrelerden; prolin içeriği belirlendi.

Bu çalışmada 2018 yılına ait toplam 10 deli bal toplandı. Deli ballar yerel arıcıların kendi beyanları doğrultusunda “Orman gülü balı” olarak toplandı. Ancak polen analizi yapılarak örneklerdeki orman gülü poleni yüzdesi ve diğer polenlerin yüzdeleri belirlendikten sonra balın ismi belirlenebilir. Çalışılan tüm orman gülü ballarının polen sayım sonuçları Tablo 23’te yer almaktadır. Polen analizi sonucuna göre balların polen yüzdesi %0,1-%10 aralığında değişmektedir. Böylece tezde çalışılan ballardan dört balda yüzde 10; bir balda da yüzde 0,1 lik orman gülü değerleri bulunurken, diğer balların % polen miktarları bu değerler arasında bulundu. Sayım sonucuna göre bala kaynak oluşturan bitkilerin polen oranları % 45 ve üzerinde olmadığından orman gülü balı olarak kabul edilememektedir. Ancak bu ballar içerisinde grayanotoksin bulunduklarından numuneler “Deli Bal” olarak adlandırıldı.

Rhododendron bitkisi ile kestane ağaçları aynı dönemde çiçek açmaktadır ve genelde aynı bölge içerisinde yetişmektedirler. Arılar o mevsimde yaygın olan çiçekli kestane ağaçlarını ziyaret etmeyi öncelikle tercih eder. Ancak arılar yeterli nektar bulamadıklarında ormangülü bitkisine konmaktadır. Bu sebeple balda kestane çiçeği polen yüzdesi yüksek çıkabilirken, diğer yandan orman gülünden nektar toplamış olabileceklerinden yüksek oranda orman gülü poleni içeren deli bal bulmak çok yaygın değildir. Bu nedenle genelde bu balları karışım olarak almak yani bazen orman gülü balı yerine kestane balı ağırlıklı bir orman gülü balı satın almak daha mümkün olmaktadır. Silici vd., (2010) 50 orman gülü balı örneği olarak belirttiği ballarla yaptığı çalışmada polen yüzdesini %2,34 ile %65,62, arasında bulmuş ve düşük polen sıklığının kısa çiçeklenme döneminden ve *Rhododendron* bitkilerinin büyük polen tanelerinden kaynaklandığını ifade etmiştir. Ayrıca Silici vd.,

(2015) toplanan örneklerin neredeyse yarısının çok çiçeksi özellikler gösterdiği belirtilmiştir. Diğer bir çalışma olan Can vd., (2015) yaptığı Türk ballarının incelenmesi çalışmasında on üç çeşit unifloral bal kullanmıştır. Kullandığı *Rhododendron* çeşidine ait altı orman gülü balının fiziko-kimyasal özelliklerini belirlemek üzere polen yüzdelere bakılmış ve yüzde 54 -75 arasında açık renkli ballar olduğu belirlendiğini ifade etmiştir.

Optik rotasyon metodunda ile salgı ballarının optik çevirme açısı sağa (+) çevrilirken, çiçek balların ki ise sola (-) yönelmektedir (Junk ve Pancoast, 1973). Deli balın optik çevirme açısı polarimetre cihazı kullanılarak (Beta PPP7 Optical Activity, İngiltere) tayin edildi. Balda ayrıca optik rotasyona sebebiyet verebilecek olan proteinlerin çökmesi Carrez-I ve Carrez-II reaktifleriyle sağlandı ve ölçüm çöktürme sonrası yapıldı. Cavarar vd., (2013) farklı kalitede Türk ballarının fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması çalışmasında kestane balının optik rotasyonun negatif olduğunu tespit etmiştir. Malkoç vd., (2019) *Rhododendron* balıyla yaptığı çalışmada optik rotasyon değerini -2,19 olarak belirlemiştir. Ayrıca Can vd., (2015) altı orman gülü balının optik çevirmesinin $(-1,65 \pm 0,55)$ ortalama ve standart sapması olduğunu belirlemiştir. Mevcut çalışmadaki deli balın da literatürle uyumlu olduğu ve -2,15 olduğu bulundu (Tablo 24).

Balda nem tayini pratik bir yöntem olan balın kırılma indisinden faydalanılarak el refraktometresi kullanılarak ölçüldü. 100 - % briks (% kuru madde) değerinden de % nem değerleri hesaplandı. Yüksek nem içeriğinin mikrobiyal bozunmaya ve de kristalizasyona neden olduğu bilinmektedir (Tosi vd., 2002). Erken hasat edilen balda olgunlaşma tam gerçekleşemediğinden balın nemi yüksek bulunmaktadır. Bu nedenle baldaki nem miktarı önemlidir ve istisnai durumlar haricinde balın olgunlaşmadığını göstermektedir. Türk Gıda Kodeksinde (TGK) göre çiçek ve salgı balında nem içeriği en fazla % 20 olmalıdır (URL-8). Malkoç vd., (2019), nem miktarını %18,69; Can'ın (2015) monofloral ballarla yaptığı çalışmada ise altı tane orman gülü balının nem içeriğinin ortalamasını $19,50 \pm 1,20$ olarak tespit etmiştir. Küçük vd., (2007) üç çeşit balın karşılaştırmasını yaptığı bir çalışmada *Rhododendron* balının nemini $19,00 \pm 1,3$ olarak bulmuştur. Mevcut çalışmada ise nem içeriği Türk Gıda Kodeksi ve literatürle ile uyum içerisinde olup $19,00 \pm 0,50$ olarak hesaplandı (Tablo 24).

Bal standartlarına göre (TGK, 2019) ballarda elektriksel iletkenlik değeri çiçek balında 0,8 mikrosiemens/cm'den fazla olmamalıdır. Mevcut çalışmadaki balın elektriksel iletkenlik değeri 0,557 mikrosiemens/cm olup Tablo 24'teki gibidir. Elektriksel iletkenlik

elektron hareketliliğinin bir özelliğidir ve ballardaki mineral tuzlar, organik asit ve protein seviyeleri ile büyük ölçüde ilişkilidir (Alqarni vd., 2014). Aynı zamanda çiçek ve salgı ballarını (salgı balı için en az 0,8 mS/cm olmalı) ayırt etmek için yaygın olarak kullanılan bir parametredir (Kolaylı vd., 2018). Malkoç vd., (2019) yaptığı çalışmada *Rhododendron* balındaki elektriksel iletkenliği 0,46 mS/cm olarak bulmuştur. Can vd., (2015) ise altı balın iletkenliğinin ortalama ve standart sapmasını $0,34 \pm 0,12$ olarak ölçtüğünü belirtmiştir. Bu tezde bulunan değerler literatürle uyum içerisinde ve olması gereken değer aralığında olduğu görülmektedir.

Mevcut çalışmadaki pH değeri $4,20 \pm 0,05$ 'dir. Balın pH değeri ortalama olarak 3,9'dur, değişik şartlar altında 3,4 ile 5,5 arasında değişmektedir (Aydın vd., 2008; Kahraman vd., 2010). Malkoç vd., (2019) *Rhododendron* balıyla yaptığı çalışmada balın pH'sını 5,20 olarak tespit etmiştir. Balın pH'sının literatürde verilen değerlerle uyum içerisinde olduğu bulundu (Tablo 24).

Bir diğer kimliklendirme parametresi olan özellik de balın rengidir. Bala renk veren maddeler bitki pigmentleridir (Ulusoy ve Kolaylı, 2013). Balların renk sonuçları (L, a, b) Tablo 24'teki gibidir. L değeri koyuluk/açıklık (0: siyah; 100:beyaz); a değeri(-a, yeşillik; +a, kırmızılık); ve b değeri (-b, mavilik; +b, sarılık) olarak ifade edilmektedir. Açık renkli balların L değerinin, koyu renkli olan ballara göre daha yüksek olduğu görülmüş, Literatürde *Rhododendron* balının renk değerleri L: $79,52 \pm 1,21$; a: $7,50 \pm 0,08$; b: $69,82 \pm 5,16$ olarak bulunmuştur (Can vd., 2015). Mevcut tezdeki sonuçlar (L: $81,53 \pm 0,75$; a: $27,43 \pm 0,42$; b: $72,65 \pm 1,28$) literatürdekiyle uyumludur. Çalışılan deli balın L değeri hafif koyu renkli bir bal olduğunu; a değeri hafif derecede kırmızılık karakteri olduğunu; b değeri de sarılık karakteri yüksek bir bal olduğunu göstermektedir. Renk analizi, görsel görünümü nedeniyle balın önemli bir parametresidir ve çoğunlukla nektar kaynağına ve polen içeriğine bağlıdır. Bal rengi ayrıca pigmentlerin, özellikle klorofiller, karotenoidler, flavonoidler ve polifenollerin varlığı ile de ilişkilidir (Kolaylı vd., 2018; Cotte vd., 2004).

Balda bulunan prolin amino asidi, çiçeklerden nektarın bala dönüşmesi sırasında temel olarak arı tarafından bala katılan tek aminoasit olup baldaki toplam aminoasitlerin %50-85' ini oluşturmaktadır (Hermosín vd., 2003). TGK'ya göre çiçek ballarındaki prolin miktarı en az 300 mg/kg olmalıdır (TGK, 2019). Prolin arı tarafından bala katılan tek amino asit olduğu için prolin miktarı balın kalitesinin bir göstergesi olabilir. Çalışmadaki deli balın prolin değeri bir kilo gram başına 853,5 mg (mg prolin/kg bal) olarak bulundu.

Malkoç vd., (2019), *Rhododendron* balının prolin miktarını 586 mg/kg olarak; Can vd., (2015) yaptığı Türkiye florasına ait monofloral balların araştırılması çalışmasında orman gülü balındaki prolin miktarının ortalamasını 746 mg/kg olduğunu tespit etmiştir. Mevcut çalışmadaki deli balın bu bağlamda literatürdeki baldan kısmen daha yüksek prolin içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Prolin değerinin yüksek çıkmasının sebebinin ise fazla yağışla birlikte arıların daha çok çalışması, uçması sonucunda olabileceği düşünülmektedir. Bunun sebebinin literatürde prolinin nektar dönüşümü sırasında bal arısı tarafından bala eklenen ve balın derecesini gösteren bir amino asit olduğu bildirilmektedir (Kolaylı vd., 2018). Yıllık yağışın fazla olmasıyla arılar daha çok çalışır. Bala geçen prolin miktarı da arının uçmasıyla doğru orantılı olduğu için bala geçen prolin miktarı artmaktadır. Balın derecesi yükselmektedir. Prolin miktarı ayrıca balın toplam amino asit içeriğini yansıtmaları açısından da önemli bir kriterdir. Bunlara ek olarak baldaki prolin miktarının yüksek çıkması balın arılar tarafından üretildiğini (bazı tağşiş edilmiş ballara prolin ilavesi yapılabilmekte) ve sükroz ve glukoz oksidaz miktarlarıyla ters orantılı olabileceğine literatürde yer verilmiştir (Kolaylı vd., 2018).

Ayrıca literatürde bir konu daha dikkat çekmektedir. Prolince zengin bir yılan zehri peptidi olan BPP 10c'nin, kaptoprille beraber hayvanlara verildiğinde sadece kaptopril verilen hayvanlara göre tansiyon değişiminde etkileri olduğu ve BPP 10c'nin anti-hipertansif etkilerinin sadece kaptopirildeki gibi sACE inhibisyonuna bağlı olmadığını ifade etmiştir (Silva vd., 2008). Buna ek olarak *Bothrops jararaca* zehrinde bulunan prolince zengin peptit olan Bj-PRO-10c'nin argininosüksinat sentazı düzenleyerek nitrik oksit (NO) oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. Bu da anti-hipertansif etki gösterebileceğinin işaretidir. (de Olivera vd., 2010).

Bahsedilen fiziko-kimyasal kriterler balın sadece saflığını ve doğallığını ortaya çıkarmakla beraber, gerçek kalitesini tam olarak yansıtamamakta ve balın biyoaktivite potansiyeli (vücuda yararlılığı) hakkında bilgi verememektedir. Balın esas kalitesini belirleyen faktör balda % 1–2 oranı kadar bulunabilen, ikincil metabolitler olarak adlandırılan çeşitli uçucu bileşenler ve fenolik maddelerdir (Bogdanov vd., 2004; White, 1979). Balda bulunan bu ikincil metabolitler genellikle fenolik yapıya haiz ajanlardır. Bu tür kalite parametreleri Türk Gıda Kodeksi'nde bulunmamaktadır. Oysa ki balın fenolik içerdiği ile antioksidan kapasitesi arasında pozitif ilişki olduğu yapılan araştırmalarda ortaya çıkarılmıştır (Küçük vd., 2007; Can vd., 2015; Kolaylı vd., 2018).

Farklı bal türlerinin fenolik profilinin değerlendirilmesi, son yıllarda balın antioksidan gücü fenolik profiliyle ilişkili olduğu için çok önemli bir konudur. Ek olarak fenolik bileşikler, balların botanik kökenli tespiti için uygun markerler olabileceği konusuna literatürde yer verilmiştir (Pulcini vd., 2006) Ayrıca, balların sınıflandırılması için flavonların, flavanonların, izoflavonların ve diğer polifenollerin kullanıldığı bildirilmiştir (Ferrerres vd., 1993).

Bal ve orman gülü çiçeği içerisindeki ikincil metabolitlerin ortaya çıkarılması için 19 standart fenolik bileşiklerle RP-HPLC-UV kullanılarak fenolik bileşen analizi yapıldı. Çalışmada kullanılan deli balın ana fenolik bileşeni protokatekuik asit (21,46 µg fenolik bileşen /g bal); orman gülü bitkisinin ise kateşin (1105,97 µg fenolik bileşen /g kuru bitki) olduğu tespit edildi. Balda öne çıkan diğer fenolik bileşenler rutin (7,79 µg/g); krisin (2,35 µg/g) ve CAPE (1,40 µg/g)'dir. Bitkide diğer öne çıkan fenolik bileşikler ise protokatekuik asit (971,30 µg/g), miyeresetin (318,09 µg/g)'dir. Bitkideki fenolik içeriğin bala kıyasla bir hayli fazla miktarda tespit edildiği görülmektedir.

Can vd., (2015) on sekiz standart fenolik bileşeni RP-HPLC-UV kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak analiz etmiş, ormangülü balının ana fenolik bileşeni p-OH benzoik asitken, p-kumarik asit, kafeik asit ve kuersetin diğer öne çıkan fenolik bileşikler olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma ile çalışmamız bakılan tüm fenolikler açısından karşılaştırıldığında iki çalışmada da balda protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asidin kalitatif olarak ortak bulunan bileşikler olduğu tespit edildi. Silici vd. (2014) *Rhododendron* ballarında yirmi fenolik standart bileşik kullanarak fenolik bileşen analizi yapmış, yirmi fenolik bileşikten dokuz tanesinin *Rhododendron* balında bulunduğunu ve klorojenik, kumarik, ferulik ve gallik asitlerin orman gülü balındaki ana fenoller olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışma ile çalışmamız karşılaştırıldığında gallik asit, kateşin ve kafeik asit, ferulik asidin farklı oranlarda da olsa kalitatif olarak balda ortak tespit edilen fenolikler olduğu görülmektedir.

Şahin vd., (2014), RP-HPLC-DAD ile tüm bal örneklerinde p-OH benzoik asidin (18,992-2,351 µg/g numune) yanında gallik asit 0,032-0,233 µg/g numune; kafeik asit 0,304-5,971 µg/g numune; p-kumarik asit 3,081-6,422 µg/g numune ve ferulik asit 0,272-2,614 µg/g numune aralığında tayin etmiştir. Bileşen zenginliği açısından numuneler irdelendiğinde; bir bal numunesinin bakılan 17 fenolik bileşenden içeriğinde barındırdığı 9 fenolik bileşenle öne çıktığı görüldü. Bu çalışma ile çalışmamız karşılaştırıldığında altı

fenolik bileşenin gallik asit, protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asidin farklı oranlarda da olsa balda ortak olarak tespit edildiği görülmektedir.

Şahin (2014), yine aynı çalışmada *Rhododendron* bitkisinin sarı ve mor renkli çiçeklerinde fenolik bileşen analizi yapmıştır. Bitkinin çiçek kısmının fenolik bileşen analizinde kateşin bileşiği en yüksek oranda tespit edilirken, genel anlamda miktar açısından değişen oranlarda olmakla birlikte numunelerde kateşinin yanında; gallik asit, epikateşin, p-kumarik asit, ferulik asit varlığı da tespit edilmiştir. Analizleri gerçekleştirilen sarı çiçekli orman gülünde ve mor çiçekli orman gülünde bulunan ortak fenolik bileşenler protokatekuik asit, kateşin, epikateşin, p-kumarik asit, ferulik asidin olduğunu ifade etmiştir. Mevcut çalışmada analizi yapılan sarı çiçekli orman gülündeki majör fenolik bileşiğin kateşin olması ve bitkinin ihtiva ettiği protokatekuik asit, epikateşin, p-kumarik asit, ferulik asit literatürle uyum içerisindedir. Aynı zamanda kateşinin birçok *Rhododendron* türünde varlığı bilimsel çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Jaiswal vd., 2012).

Ayrıca literatürde fenolik bileşenlerin hipertansiyon üzerinde etkisi olup olmadığı incelendiğinde arpa protein fraksiyonlarından ekstre edilmiş fenoliklerin toplam fenolik içeriği, antioksidan aktivitesi ile ACE inhibe edici aktivitesi arasında zayıf korelasyonlar olduğu elde edildi. Fenolik bileşiklerin tansiyon üzerinde ACE inhibitörleri üzerinden etkisinin zayıf olduğu anlaşılmaktadır (Alu'datt vd., 2012).

Canlı organizmalarda oksidasyonu önleyen ve halihazırda oluşturulmuş oksidasyonu azaltan veya tamamen ortadan kaldıran moleküller antioksidanlar olarak bilinir (Can vd., 2015). İçindeki ikincil metabolitler nedeniyle, arı ürünleri ve bitkiler iyi birer antioksidandır.

Mevcut çalışmada hayvan çalışmalarında kullanılan balın ve bitkinin metanolik ekstraktlarının kullanıldığı spektrofotometrik olarak yapılan *in vitro* antioksidan analizler için toplam polifenol (TP), toplam flavonoid (TF), demir(III) indirgeme gücü (FRAP), DPPH• radikalini temizleme aktivitesi (DPPH) testleri uygulandı. Balda TP 16,1 mg GAE / 100g bal; TF 1,00 mg KE/100g bal; FRAP 3,30 µmol FeSO₄.7H₂O/g numune; DPPH 25,960 mg/mL olarak bulundu. Bitkide TP 57,4 mg GAE/100 g kuru bitki; TF 5,3 mg KE/100g bal; FRAP 132 µmol FeSO₄.7H₂O/g numune; DPPH 0,200 mg/mL olarak bulundu (Tablo 26).

Literatüre bakıldığında *Rhododendron* balının TP miktarları Malkoç vd., (2019), *Rhododendron* balıyla yaptığı çalışmada TP 33,5; Can vd., (2015) altı balla yaptığı çalışmada ortalama ve standart sapma olarak $23,55 \pm 10,22$; Sahin vd., (2015) 13,4 ile 60,6 aralığında; Silici vd., (2010) 0,24 ile 109,19 mg GAE/100g bal aralığında literatürde bulunan değerleridir. Bu bağlamda çalışmamızda yapılan TP testi sonucu literatüre göre düşük bulunmuş ve Sahin vd., (2015)' in çalışmasına yakın değerdir.

Ballara uygulanan TF testi sonucu; Malkoç vd., (2019)'da 2,05 mg KE/100g bal, Can vd., (2015), altı balla yaptığı çalışmada ortalama ve standart sapma olarak $0,92 \pm 0,39$; mg KE/100g bal olarak bulmuştur. Literatürle kıyaslandığında bulunan değer düşük ve Can vd., (2015) ile uyum içerisindedir.

Ballara uygulanan FRAP testi sonucu; Malkoç vd., (2019) 840 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/100\text{g}$ numune; Can vd., (2015) altı balla yaptığı çalışmada ortalama ve standart sapma olarak FRAP $0,67 \pm 0,22$ $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ bal olarak tespit etmiştir. Yapılan çalışmalara göre tezdeki değer literatüre göre düşük bulunmuştur. FRAP testinin sonucu toplam antioksidan kapasiteyi belirler ve ballarda bulunan münferit fenolik bileşiklerin güçlerinin toplamıdır (Küçük vd., 2007). Şahin (2014), FRAP sonuçları 0,619 ile 1,616 $\mu\text{mol Trolox} / \text{g}$ balı arasında; DPPH radikalini temizleme aktivitesi SC_{50} değerleri 0,030-0,097 g / mL arasında olduğunu bildirmiştir. Ayrıca en yüksek toplam polifenol miktarını içeren balın FRAP, ve DPPH değerleriyle en iyi antioksidan kapasiteye sahip olduğunu belirtmiştir.

Ballara uygulanan DPPH testi sonucu; Malkoç vd., (2019) SC_{50} değerini 48,2 mg/mL; Can vd., (2015) altı balla ait SC_{50} değerinin $78,06 \pm 28,65$ mg/ mL ortalama sonuçların ve standart sapmalarının olduğunu; Sahin vd., (2015) SC_{50} : 30-97 mg/mL aralığında; Tezcan vd., (2011) 224,86-770,5 mg/mL; Buratti vd., 2006 IC_{50} olarak ifade etmiş ve değerlerin 5,7-15,5 mg/mL arasında bulunduğu kaynaklar tarafından belirlenmiştir. Mevcut çalışma literatürle kıyaslandığında uyumlu olduğu görülmektedir (Tablo 26).

Şahin (2014), sarı çiçekli *Rhododendron* bitkisine yaptığı TP testi sonucunu 4,551-17,185 mg GAE/g numune aralığında ve DPPH testi sonucunu 0,135- 0,797 mg/mL arasında olduğunu tespit etmiştir. Mahommoodally vd., (2020)'nin çalışmasında *Rhododendron luteum* bitkisinin toplam polifenol miktarı 105,47 mg GAE/g ekstrakt, DPPH 480,07 mg TE/g ekstrakt, FRAP 348,37 mg TE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

Mahommoodally vd., (2020)'nin çalışmasında olduğu gibi *Rhododendron* bitkisine, TP, TF, FRAP, DPPH testleri açısından literatürde çok fazla rastlanmamıştır veya kullanılan standartlar mevcut çalışmadakinden farklı olduğu için kıyaslama yapılamamıştır. Ancak *Rhododendron* bitkisindeki antioksidan gücün yadsınamaz bir gerçek olduğu da yapılmış çalışmalarla ortaya çıkmaktadır.

Orman gülü bitkisinin ve balının fenolik bileşenlerce zengin olmasının yanı sıra yapısında diterpenoidleri de (GTX) bulundurmaktadır (Malkoç vd., 2016). İçindeki bileşiklerle birlikte antioksidan, antiinflamatur ve antimikrobiyal aktivitelerin yanı sıra da sahip olduğu GTX le beraber tansiyon düşürücü olduğu da bildirilen vakalarla bilinmektedir (Gunduz vd., 2007). Deli bal zehirlenmesi Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olarak görülmekle birlikte bradikardi ve hipotansiyon gibi ciddi kardiyak yan etkiler fazla miktarda *Rhododendron* balının tüketimi ile görülebilir. Özellikle kardiyovasküler tesirleri nedeniyle bu tür gıda zehirlenmeleri yaşamı tehdit edici olabilir (Cetin, 2009). *Rhododendron* türlerinin barındırdığı toksik bileşenler *R. luteum* ve *R. ponticum*da fazlasıyla görülmektedir (Gunduz vd., 2007).

Mevcut çalışmada kullanılan 10 adet deli bal ve 10 adet *Rhododendron* bitkisinde bulunan GTX-III miktarları LC-MS/MS ile ölçüldü. Tablo 22'de ki ölçüm sonuçlarına göre MH2 kodu ile analiz edilen Artvin menşeli bal örneği 24,94 µg GTX-III/ g numune ölçüm değeri ile kendi grubundaki 10 örnek arasında en yüksek GTX-III oranına sahip olduğu görüldü. Ayrıca Sakarya yöresinden edinilen bal örneğinde GTX-III tespit edilemedi. Literatürde Sahin vd., (2015) yaptığı çalışmada deli balın GTX miktarlarını aynı metotla analiz etmiş ve 0,701 ile 68,754 µg GTX-III/g bal aralığında olduğunu bulmuştur. Değerler literatürle uyum içerisindedir.

Orman gülü bitkisinin çiçeğinden elde edilen sonuçlara göre mor çiçekli bitkilerin, sarı çiçekli bitkidekinden daha düşük oranda GTX-III içerdiği görülmektedir ve hatta mor çiçekli bitkilerin birinde (Ordu, Şirinköy) toksik izomer tespit edilemedi. Bulgular sarı çiçekli orman gülü bitkilerinin mor çiçekli orman gülü bitkilerine nazaran daha fazla toksik izomer barındırdığı gösterdi. Özellikle sarı renkli örnek olan Giresun, Dereli (291,8 µg GTX-III/g) örneğinin en düşük GTX-III'e sahip mor çiçekli örnekten (Akçaabat, Mersin (11,6 µg GTX-III/g)) yaklaşık 25 kat fazla GTX-III içerdiği görüldü. Şahin (2014), yaptığı çalışmada yomra lokalitesinden topladığı mor çiçekli *Rhododendron*'un GTX-III değerini 0 ile 22,891(µg GTX-III/g) arasında; sarı çiçeği 1,740-760,435 (µg GTX-III/g) arasında

bulduğunu ifade etmiştir. Verilerimizle bu çalışma uyum içerisinde ancak çalışmamızdaki sarı çiçek değeri 2,5 kat daha az bulundu.

Rhododendron balının ve bitkisinin toksik etkisi bilinse bile muhtelif amaçlarla kullanımını yaygındır. Bu alanda yapılmış pek fazla çalışmaya rastlanmamıştır. “Deli Balın Sıçanlarda Antihipertansif Olarak Kullanımı” olarak literatüre kazandırılan bir çalışmada sıçanlarda L-NAME ile deneysel hipertansiyon oluşturulmuş, sonrasında 14 gün boyunca sıçanlara GTX miktarı bilinmeyen ancak deli bal olduğu bilinen baldan (10 ve 50 mg/kg doz) intragastrik yoldan verilmiş ve deli balın kontrol grubuna göre kan basıncını ve kalp hızını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak deli balın antihipertansif etkisinden dozu belirlendikten sonra yararlanılabileceği ifadesine yer verilmiştir (Oztasan ve Songur 2007). Bu mevcut durumun ortaya koyduğu literatür eksikliğinden yola çıkılarak kurgulanan mevcut tez çalışmasında LC- MS/MS metodolojisi ile deli bal olduğu düşünülen ve temin edilen balların ve *Rhododendron* bitkilerinin GTX-III miktarları belirlendi. Ardından 6 sıçandan oluşan 5 deney grubu oluşturuldu. Bu gruplardan kontrol grubuna serum fizyolojik; diğer tüm gruplara 15 gün boyunca tansiyonlarını yükseltmek (hipertansif sıçan modeli oluşturmak) için L-NAME i.p. (intraperitoneal) yoldan enjekte edildi. 15. gün sonunda kontrol grubu ve diğer grupların tansiyonları ölçüldü ve hayvanların tansiyonlarının kontrol grubuna göre yüksek olduğu anlaşıldı. Böylelikle deneysel kronik hipertansiyon modeli oluşturulmuş oldu. 15.günden sonra bir standart grup (kapril-ilaç), bir bal grubu ve bir bitki ekstraktı grubuyla L-NAME enjeksiyonuna ilaveten 3 grupta gavaja devam edildi. 30.günde 5 grubun da tansiyonları ölçüldü. Ölçülen değerlere göre L-NAME'nin 15 gün boyunca enjeksiyon yoluyla verilmesi sistolik basıncın ($p<0,001$) ve diastolik basıncın ($p<0,001$) anlamlı düzeyde yükselmesine neden oldu. Kapril, bal ve ekstraktın gruplara verilmesi ile de gruplardaki tansiyonların L-NAME grubuna göre anlamlı düzeyde düştüğü belirlendi ($p<0,001$). Sonuçlar Tablo 28'deki gibidir. Buna ilaveten bal ve ekstraktın hipertansiyon üzerine etkisinin olup olmadığının araştırılması amacıyla yürütülen çalışmada, 15 gün sürede Bal ve Ekstrakt uygulanan grupların (tedavi gruplarında) sistolik ve diastolik kan basınçlarının birbirinden farklı olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$).

Gruplar arasındaki son ve ilk gün ağırlık farkının istatistiksel olarak L-NAME grubuna göre (Tedavi) Bal ve (Tedavi) Ekstrakt gruplarında anlamlı bir düzeyde kiloda azalma olduğu ($p<0,05$); kontrol ve kapril gruplarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü

($p>0,05$) tespit edildi. Literatürde benzer çalışmaya rastlanmadığından kıyaslama yapılamadı.

Mevcut tez çalışmasında 30 günlük besleme sonucunda dekapite edilen sıçanların serumları alındı ve bir kısmı hizmet alımı yoluyla biyokimyasal analizler (Glukoz, Aspartat Aminotransferaz, Alkalen Fosfataz, Laktat Dehidrogenaz, Kreatin Kinaz, Kan Üre Azotu) için kullanıldı. Literatürde birçok deli bal zehirlenmesi vakasında ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda serumda biyobelirteç parametrelerinde değişiklikler gözlenmiş; karaciğer enzimleri üzerinde ve kardiyak enzimler üzerindeki etkilerine yer verilmiştir.

Kan şekeri birçok hücre için önemli bir enerji kaynağı olmakla beraber aynı zamanda merkezi sinir sistemi için zorunlu bir yakıttır. Sonuç olarak, normal kan şekeri konsantrasyonunun korunması beyin dokusunun hayatta kalması için gereklidir (Harper 1983). Silici vd., (2015), kan şekeri seviyesinin kontrol grubunda 295 mg/dL, sadece GTX verilen hayvan grubunda glukoz seviyesinin 333 mg/dL, 0,1, 0,5 ve 2,5 g / kg / bw dozlarda *Rhododendron* balı verilen gruplarda sırasıyla 229, 246, 325 mg/dL olduğunu tespit etmiştir. 0,1, 0,5 g / kg / bw verilen gruplarla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken 2,5 g / kg / bw verilen grupta kan şekeri seviyesinin yüksek olması daha yüksek karbonhidrat içeriği ile açıklanabileceğini ifade etmiştir. Salman ve Akbas (2010), grayantoksinin hipoglisemiye neden olabileceğini bildirmiştir. Ayrıca Uzun vd., (2013), orman gülü balı zehirlenmesi olan bir çocuğun kan şekerinin normal seviyenin altında olduğunu bildirmiştir. Bu tezdeki kandaki glukoz konsantrasyonunun istatistiksel olarak L-NAME grubuyla Tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir fark olduğunu, tedavi gruplarındaki serumdaki glukoz miktarının anlamlı bir düzeyde azaldığı görülmektedir ($p<0.05$).

Sahin vd., (2015) orman gülü balı tüketen sıçanların kan serumundaki bazı biyokimyasal parametrelerin dinamik değişikliklerini belirlemek istemiştir. 5 grup oluşturmuş; kontrol ve 0,3, 0,6, 1,2 ve 2,4 mg / g vücut ağırlığı / gün dozlarında orman gülü balı ekstreğini ($39,949 \pm 0,020$ mg GTX-III / g bal) 8 gün boyunca oral gavaj yoluyla vermiştir. Biyokimyasal analizlerden test edilen parametrelerin artan bal konsantrasyonu ile kontrol grubuna göre anlamlı ve önemli bir yükselme gösterdiğini, sonuç olarak, artan *Rhododendron* bal konsantrasyonlarının kullanımının enzimatik semptomların kaynağı olduğunu bildirmiştir. Çalışmadaki sonuçları çalışmamızla karşılaştırabilmek çalışmanın

planlanmasının farklı olması açısından pek mümkün olmasa da iki çalışmada da AST ve ALP kontrol değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Ayrıca çalışmamızdaki AST sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuyla L-NAME grubu arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0.05$) (L-NAME grubundaki anlamlı artış.). Ayrıca L- NAME ve Tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir azalış olduğu görüldü ($p<0.05$). ALP sonuçlarında istatistiki olarak L- NAME ve tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir düzeyde azalma bulunmaktadır ($p<0.05$). ALP sonuçları ise istatistiki olarak L- NAME ve Tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir düzeyde azalma bulunduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Çalışmamızdaki CK ve LDH değerlerinin ise literatürle uzak olduğu görülmektedir (Sahin vd., 2015). Bunun sebebi çalışmamızdaki L-NAME enjeksiyonunun kardiyovasküler sistemi daha çok etkilemesine bağlanabilir. Çalışmamızda, istatistiksel kanıtlar ışığında, CK sonuçlarının değerlendirilmesinde kontrol grubundaki sıçanlarla L-NAME grubu arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$); ayrıca L-NAME ve Tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında da anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0.05$). LDH sonuçlarına bakıldığında kontrol grubuyla L- NAME grubu arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$); buna ek olarak L- NAME grubuna göre Tedavi gruplarında (Bal, Ekstrakt) anlamlı bir düzeyde fark olduğu görüldü ($p<0.05$). Kontrol grubu ile L-NAME arasındaki anlamlı artış farkı ($p<0.05$) bir kalp krizi (miyokard enfarktüsü) meydana geldiğinde, LDH enziminin kan akışındaki anormal yükselmesi zaman zaman markör olması varsayımına dayanabilir. Ayrıca bazı hipoksi vakalarında da yüksek LDH seviyesi görülebilir (Yaylacı vd., 2011; Okuyan vd., 2010; Sahin vd., 2015).

Silici vd., (2015) yaptığı çalışmada bir grup sıçana GTX-III vermiş, diğer gruplara da GTX-III miktarı bilinen ballar vermiş ve direkt GTX-III almakla bal tüketimi arasındaki farkı ortaya koymak için yaptığı çalışmada kontrol grubuna göre GTX-III ve yüksek doz bal grubunda glukoz ve BUN seviyelerinde anlamlı bir artış olduğunu belirlemiştir ($p>0.05$). Mevcut çalışmadaki BUN ortalama sonuçlarına istatistiki anlamda bakıldığında L- NAME ve Tedavi grupları (Bal, Ekstrakt) arasında anlamlı bir fark olduğu ve istatistiksel anlamda bir düşüş olduğu bulundu ($p<0.05$).

Bir vaka makalesi olan Cetin vd., (2009) Karadeniz bölgesinden getirilen bal yeme sonrası terleme ve gastro intestinal şikayetleri ile başvuran bir kişinin hepatotoksisite olgusu ile ilgili parametrelerine bakmıştır. 43 yaşındaki erkek hasta sıkıştırıcı göğüs ağrısı

ve terleme, bulantı, kusma şikayeti ile acil servise başvurdu. AST ve ALT düzeylerini sırasıyla 1175 U / L ve 479 U / L olarak bildirmiştir. Bu normal serum seviyelerine kıyasla yaklaşık 40 ila 100 kat daha fazladır. ALP seviyesi 174 U/L (normal değer: 40-150 U/L) ;LDH seviyesi 851 U/L (normal değer: 150-290 U/L) olarak bulunmuştur.

Yine bir vaka makalesinde 15 yaşındaki hasta ani baş dönmesi ve halsizlik yakınmaları ile hastaneye başvurdu. İki saat önce çok miktarda deli bal (150 ml) yediği öğrenildi. Kardiyak hastalığı, travması veya herhangi bir ilacı tüketmesi öyküsü yoktu. Acil serviste yapılan fizik muayenede vücut ağırlığı 65 kg (> 97 persentil), kan basıncı 75/50 mmHg ve nabız 45/dk olarak bulundu. Laboratuvar bulguları şöyledi: üre: 21,4 mg / dL, kreatinin: 0.9 mg / dL, sodyum: 140 mmol / L, klorür: 104 mmol / L, potasyum: 4,2 mmol/L, kan şekeri: 85 mg/dL, alanin aminotransferaz: 30 U/L, aspartat aminotransferaz: 25 U/L, kreatinin kinaz: 120 U/L, kreatinin kinaz-MB: 6 U/L. Tam kan sayımı ve akciğer grafisi normal bulundu. 400 mL/m² izotonik sıvı ve intravenöz 0,5 mg atropin enjeksiyonundan (on dakikalık aralıklarla iki doz) sonra kan basıncı 120/80 mmHg ve kalp hızı 73/dakika oldu. Hastanın şikayetleri ve hemodinamik durumu bir saat içinde düzeldi. Koroner yoğun bakım ünitesinde takip edilen hasta bir gün sonra taburcu edildi (Uzun vd., 2013a).

Bir stres faktörü olan hipertansiyon, doku ve organlarda serbest radikal üretimi ve oksidatif strese sebep olabilir. Bu tür stres etkileri endojen veya ekzojen antioksidan moleküller tarafından giderilebilir. Serbest radikal hasarını engellemeye çalışan antioksidanların bir kısmı enzim, bir kısmı ise enzim olmayan moleküllerden oluşmaktadır (Harrison vd., 2007). Dokudaki GSH konsantrasyonu ve hücresele glutatyondaki sülfidril grubunun disülfide yükseltgenme hızı oksidatif stresin durumu hakkında bilgi verir. Vücuttaki oksidatif strese yönelik doku örneklerine yapılan GSH seviyesinin belirlenmesi sonucunda karaciğer dokusunda L-NAME ve bal grubu arasında; böbrek dokusunda L-NAME ile kapril, bal ve ekstrakt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu (p<0.05).

L-Argininden NO oluşum reaksiyonu üzerinde çalışmalar devam ederken L-Arginin analoglarının bu reaksiyonu inhibe ettiği görülmüş ve literatürde de en çok kullanılan inhibitör L-NAME'dir. Kontrol grubuna göre diğer gruplarda (her gruba L-NAME enjeksiyonu yapıldı) genel olarak NO düzeylerinde azalma görüldü. Böbrekte

hipertansiyon ve tedavi (bal) grubu; karaciğerde tedavi grubu bal grubu bu genellemenin dışında kaldı.

NO'nun sebep olduğu oksidatif stresin belirteçlerinden olan GSH seviyesinin NO miktarının artması ile ters orantılı olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Schild vd., 2003). Mevcut çalışmada da literatürle eşleşen karaciğer ve böbrek dokularında kontrol grubuna kıyasla tedavi (bitki) grubu ve standart grubunda artan GSH miktarının NO miktarıyla ters orantılı olduğu görüldü.



5. SONUÇLAR

Orman gülü balının halk arasında tansiyon düşürücü olarak fayda sağladığına inanılmaktadır, ancak bu konuyu bilimsel olarak ele alan geniş kapsamlı bir deneysel çalışmaya literatürde rastlanamadı. Balın tansiyon düşürücü etkisini deneysel olarak açığa çıkarılması için yapılan bu tezin sonucunda Karadeniz Bölgesi'nden toplanan:

- Bal örneklerinin % polen miktarları belirlendi. Ballardaki polen miktarının %0,1-10 arasında değiştiği bulundu.

- LC-MS/MS ile bal ve bitki örneklerinde bulunan GTX-III' ün değişik miktarlarda olduğu belirlendi ve balların bu bileşence zengin olmadığı bitkilerin ise göreceli olarak zengin olduğu literatür yardımıyla yorumlandı.

- Deneysel hayvanları çalışmasında kullanılan bal örneğini (Artvin, Hopa) kimliklendirmek adına bazı fiziksel ve kimyasal parametreleri belirlendi. Literatürle kıyaslandı ve uyumlu olduğu görüldü.

- Deneysel hayvanları çalışmasında kullanılan bal ve bitki örneklerinin antioksidan özellikleri ve RP-HPLC-UV ile fenolik bileşenleri belirlendi. Literatürle uyumlu olduğu ve bitki ekstraktının bala göre daha fazla fenolik içeriğe sahip olduğu görüldü.

- Deneysel hayvanlarının son gün – ilk gün kilo ölçümlerinde L-NAME grubuna göre (Tedavi) Bal ve (Tedavi) Ekstrakt gruplarında anlamlı bir düzeyde kiloda azalma olduğu ($p < 0,05$) görüldü ($p > 0,05$).

- Deli balın ve *Rhododendron* çiçeğinin hipertansif sıçanlarda kardiyovasküler sistem ve oksidatif stres üzerinde tıbbi potansiyel etkisi olduğu ortaya çıkarılmış oldu. Tıbbi bal niteliği taşıyan bu Türk balının hipertansiyonu düşürücü etkisi deneysel veriler ışığında istatistiksel olarak belirlendi. Deneysel hayvanları ile yapılan tansiyon ölçümleri sonucunda sistolik ve diastolik basınçlarda L-NAME'ye kıyasla tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azalma olduğu görüldü ($p < 0,001$).

- Serumda yapılan tüm biyokimyasal analizler (Glukoz, Aspartat Aminotransferaz, Alkalen Fosfataz, Laktat Dehidrogenaz, Kreatin Kinaz, Kan Üre Azotu) sonucunda L-NAME grubuna göre Tedavi gruplarında (Bal, Ekstrakt) anlamlı bir düzeyde fark olduğu görüldü ($p < 0,05$).

- Karaciğer ve böbrek dokuda homojenatlarında yapılan GSH düzeyinin sonucunda:

- Karaciğer dokusunda L-NAME ve bal grubu arasında anlamlı bir fark olduğu,

- Böbrek dokusunda L-NAME ile kapril, bal ve ekstrakt grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0.05$).

- Kalp, karaciğer ve böbrek dokuda homojenatlarında yapılan NO düzeyinin sonucunda:

- Kalp dokusunda gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi anlamlı bir farklılık bulunmadığı ($p>0.05$),

- Karaciğer dokusunda L-NAME grubu ile bal grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunduğu ($p<0.05$),

- Böbrek dokusundaki NO düzeylerine istatistiki olarak bakıldığında L-NAME ile tedavi grupları olan kapril ve ekstrakt grupları arasında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Toksik etkisi bilinen orman gülü balı alternatif tıp ürünü olarak halk arasında kullanılmaktadır. Ancak “Bu besin maddesi ne sıklıkla tüketilmelidir?”, “Balın veya bitkinin içerdiği GTX-III miktarı ne kadar olmalı ki tüketildiğinde tansiyonu ideal seviyeye indirsin?” ve “Metabolizma için öldürücü doz nedir?” gibi klinik bazı problemlerin çözümü bu çalışma ile tam olarak çözüme kavuşturulamadı. Dolayısıyla örneklerin içerdiği GTX miktarının LC-MS/MS dışında rutin bir ölçüm yöntemi geliştirilip tespit edilebilmesi önemlidir ve klinik problemlerin çözümleri yeni çalışmalarla açığa kavuşturulmalıdır.

Hazırlanan bitki ekstraksiyonunun bala kıyasla GTX-III içeriğine göre tansiyonu beklenen orantıda düşürmediği bu sebeple ekstraksiyondan sonraki aşamada yapılan işlemlerde GTX-III’ün tansiyon düşürücü etkisini kaybetmiş olabileceği veya çözünürlüğünün azalmış olabileceğinden dolayı numunenin hazırlanma prensibi değiştirilip yeniden hayvanlar üzerinde denemesi yapılabilir.

Aynı zamanda literatürde prolin ağırlıklı peptidlerin anti-hipertansif olduğu yapılan in vitro çalışmalarla bildirilmiştir ve bunun belirlenmesinde prolin için de deney hayvanlarında kontrol grubu oluşturulabilir. Bal grubuyla kıyaslama yapılabilir. Böylece prolinin deney hayvanları üzerindeki tansiyon düşürücü etkisi açığa çıkarılmış olacaktır.

Bunlara ek olarak deli balın üretiminin yaygınlaştırılması ve arı üreticilerinin de bu balın üretimine teşviği için bu konuda seminerler düzenlenmesi önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Aekthammarat, D., Pannangpetch, P., ve Tangsucharit, P., 2019. Moringa oleifera leaf extract lowers high blood pressure by alleviating vascular dysfunction and decreasing oxidative stress in L-NAME hypertensive rats. Phytomedicine, 54, 9-16.
- Ahmed, S., ve Othman, N. H. 2013. Honey as a potential natural anticancer agent: a review of its mechanisms. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013.
- Alqarni, A., S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A., ve Hannan, M. A., 2014. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. Journal of Saudi Chemical Society, 18, 5, 618-625.
- Alu'datt, M.H., Ereifej, K., Abu-Zaiton, A., Arababah, M., Almajwal, A., Rababah, T., ve Yang, W., 2012. Arpa protein fraksiyonlarından ekstrakte edilmiş fenoliklerin ve hidrolize peptitlerin anti-oksidan, anti-diyabetik ve anti-hipertansif etkileri. Uluslararası Gıda Özellikleri Dergisi, 15, 4, 781-795.
- Alwi, N., Karim Z., Nordin A., ve Ugasman, A., 2018. Antihypertensive Effect of Piper sarmentosum in L-NAME-Induced Hypertensive Rats. Sains Malays, 47, 2421-2428.
- Anderson, N. H., Devlin, A. M., Graham, D., Morton, J. J., Hamilton, C. A., Reid, J. L., ve Dominiczak, A. F., 1999. Telemetry for cardiovascular monitoring in a pharmacological study: new approaches to data analysis. Hypertension, 33, 1, 248-255.
- Andrade, P., Ferreres, F. ve Amaral, M.T., 1997. Analysis of Honey Phenolic Acids by HPLC, Its Application to Honey Botanical Characterization, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 20, 2281-2288.
- Anupama, D., Bhat, K.K. ve Sapna, V.K., 2003. Sensory and Physico-Chemical Properties of Commercial Samples of Honey, Food Research International, 36, 183-191.
- Ardanaz, N., ve Pagano, P., J., 2006. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. Experimental biology and medicine 231, 3, 237-251.
- Arts, I., C., ve Hollman, P., C., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. The American journal of clinical nutrition, 81, 1, 317S-325S.
- August, P., ve Suthanthiran, M., 2006. Transforming growth factor β signaling, vascular remodeling, and hypertension. The New England journal of medicine, 354, 25, 2721-2723.

- Aydın, B. D., Sezer, Ç., ve Oral, N. B. 2008. Kars' ta satışı sunulan süzme balların kalite niteliklerinin araştırılması. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 14, 1, 89-94.
- Aykac, G., Uysal, M., Yalçın, A. S., Koçak-Toker, N., Sivas, A., ve Öz, H., 1985. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. Toxicology, 36, 1, 71-76.
- Benzie, I.F.F. ve Strain, J.J., 1999. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration, In Methods In Enzymology, 299, 15-27.
- Biberoglu, S., ve Biberoglu, K. Komsuoglu B., 1988. Mad Honey. Journal of American Medicine. Association 259, 1943-1945.
- Bogdanov, S., Ruoff, K. ve Oddo, L.P., 2004. Physico-Chemical Methods for the Characterisation of Unifloral Honeys: A Review, Apidologie, 35,1.
- Bruhwyler, J., Chleide, E., Liégeois, J. F., ve Carreer, F., 1993. Nitric oxide: a new messenger in the brain. Neuroscience ve Biobehavioral Reviews, 17, 4, 373-384.
- Buege, J. A., ve Aust, S. D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. In Methods in enzymology Academic Press. 52, 302-310.
- Buratti, S., Benedetti, S., ve Cosio, M. S., 2007. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. Talanta, 71, 3, 1387-1392.
- Cavrar, S., Yıldız, O., Sahin, H., Karahalil, F. ve Kolayli, S., 2013. Comparison of Physical and Biochemical Characteristics of Different Quality of Turkish Honey, Uludag Bee Journal, 13,2, 55-62.
- Cetin, N. G., Marçıl, E., Kıldırın, M., ve Öğüt, S., 2009. Hepatotoxicity with mad honey, Turk J Emerg Med 9, 2, 84-86.
- Cortas, N., K., ve Nabll W. W., 1990. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method, Clinical chemistry 36(8), 1440-1443.
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery J., Wallet, J.C. ve Gaydou, E.M., 1996. Antioxidant Properties of Hydroxy-Flavones. Free Radical Biology and Medicine, 20, 01, 35-43.
- Cotte, J.F., Casabianca, H., Giroud, B., Albert, M., Lheritier, J., ve Grenier-Loustalot, M.F., 2004. Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity, Analytical and bioanalytical chemistry 378, 5, 1342-1350.

- Çakır, H. E., Şirin, Y., Kolaylı, S., ve Can, Z., 2018. Validation methods for phenolic components with RP-HPLC-UV in various Obee products. Apiterapi ve Doğa Dergisi, 1, 1, 13-19.
- Çekmen, M. B., Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, A. D., ve Gözükara, E. M., 2001. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri, Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics 10, 4, 226-235.
- Çimen, M.B.Y., 1999. Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 19, 296-304.
- De Cavanagh, E. M. V., Inserra, F., Ferder, M., ve Ferder, L., 2007. From mitochondria to disease: role of the renin-angiotensin system. American journal of nephrology 27, 6, 545-553.
- De Oliveira, E.F, Guerreiro, J.R, Silva, C.A, de Souza Benedetti, G.F, Lebrun, I., Ulrich, H., Camargo, A.C., 2010. Astroglioma hücrelerinde sitrülün-nitrik oksit döngüsünün Bothrops jararaca zehirinden elde edilen prolin bakımından zengin peptid-10c ile güçlendirilmesi. Beyin Araştırması, 1363, 11-19.
- Ferreres, F., García-Viguera, C., Tomás-Lorente, F., ve Tomás-Barberán, F. A., (1993). Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. Journal of the Science of Food and Agriculture 61, 1, 121-123.
- Forstermann, U., ve Thomas M., 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. Circulation 113, 13, 1708-1714.
- Fukumoto, L.R. ve Mazza, G., 2000. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds, Journal Agriculture Food Chemistry, 48, 3597-3604.
- Furchgott, R. F., ve John V. Z., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288, 5789, 373-376.
- Gardiner, S. M., Kemp, P. A., Bennett, T., Palmer, R. M., ve Moncada, S., 1992. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. European journal of pharmacology, 213, 3, 449-451.
- Gulhan, M. F., 2019. Therapeutic potentials of propolis and pollen on biochemical changes in reproductive function of L-NAME induced hypertensive male rats. Clinical and Experimental Hypertension, 41,3, 292-298.
- Gunduz A, Tatlı O ve Turedi S., 2008. Mad honey poisoning from the past to the present. Turk J Emerg Med, 8,46-9.

- Gunduz A., Turedi S., Russell R.M. ve Ayaz F.A., 2008a. Clinical Review of Grayanotoxin/Mad Honey Poisoning Past and Present, Clinical Toxicology, 46, 437-442.
- Gunduz A., Turedi S., Uzun H. ve Topbaş M., 2006. Mad Honey Poisoning, American Journal of Emergency Medicine, 24, 59, 595–598.
- Gunduz, A., Bostan, H., Turedi, S., Nuhoglu, I. ve Patan, T., 2007, Wild flowers and mad honey, Wilderness Environ Med. 18, 1, 69-71pp.
- Gunduz, A., Turedi, S., ve Oksuz, H. 2011. The honey, the poison, the weapon. Wilderness ve environmental medicine, 22, 2, 182-184.
- Gün, Y., ve Korkmaz, M. 2014. Hipertansif hastaların tedavi uyumu ve yaşam kalitesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi, 7,2.
- Gürdal, F., ve Ademoğlu E., 2005. Biyokimya. Nobel Kitap Evi, 746-747.
- Harper AH 1983) Review of Bio Chemistry. 20 th ed. Lange Medical Publications Co, 1012.
- Harrison, D. G., Gongora, M. C., Guzik, T. J., ve Widder, J., 2007. Oxidative stress and hypertension. Journal of the American Society of Hypertension, 1, 1, 30-44.
- Helrich, K., 1990. Journal Association of Official Analytical Chemists, Volume One. USA.
- Izzo, J. L., 2003. Stress responses and blood pressure reactivity. Hypertension primer. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams ve Wilkins, 126-9.
- Jaiswal, R., Lalith J., ve Nikolai K., 2012. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the Rhododendron genus (Ericaceae) by tandem LC–MS. Journal of Mass Spectrometry 47, 4, 502-515.
- Junk, W.R., ve Pancoast, H.M., 1973. Handbook of Sugars for Processors, Chemists and Technologists, 327, 08-705-51337.
- Kahraman, T., Buyukunal, S. K., Vural, A., ve Altunatmaz, S. S. 2010. Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. Food Chemistry, 123, 1, 41-44.
- Karabulut, H., ve Gülay M., Ş., 2016. Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 4.1.
- Knowles, R. G., ve Moncada, S., 1994. Nitric oxide synthases in mammals. Biochemical Journal, 298, 2, 249.
- Kolay, Y., 2011. L-Name Hipertansif Ratlarda Ace İnhibitörü ile Birlikte L-Karnitin ve Co-enzim Q10 Verilmesinin Total Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri Üzerine

Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars.

- Kolaylı, S., Can, Z., Çakır, H. E., Okan, O. T., ve Yıldız, O. 2018. An investigation on Trakya region Oak (*Quercus* spp.) honeys of Turkey: Their physico-chemical, antioxidant and phenolic compounds properties. Turkish Journal of Biochemistry, 43, 4, 362-374.
- Kurtoglu, A.B., Yavuz, R., ve Evrendilek, G.A., 2014, Characterisation and fate of grayanotoxins in mad honey produced from *Rhododendron ponticum* nectar, Food Chemistry, 161, 47-52.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C. ve Candan, F., 2007. Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types From Anatolia, Food Chemistry, 100, 526–534.
- Lacy, F., Kailasam, M. T., O’connor, D. T., Schmid-Schönbein, G. W., ve Parmer, R. J., 2000. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity. Hypertension, 36, 5, 878-884.
- Lampe K.F. 2009. *Rhododendrons, Mountain Laurel, and Mad Honey*, Journal of the American Medical Association, 1988, 259.
- Lane, N. J. (2012). *Effects Of Heme-L-Arginate on L-NAME Induced Hypertension*. University of Saskatchewan. College of Medicine, Canada.
- Li, Y., Liu, Y. B., ve Yu, S. S. 2013. Grayanoids from the Ericaceae family: structures, biological activities and mechanism of action. Phytochemistry reviews, 12, 2, 305-325.
- Luangaram, S., Kukongviriyapan, U., Pakdeechote, P., Kukongviriyapan, V., ve Pannangpetch, P., 2007. Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats. Food and chemical toxicology, 45, 3, 448-455.
- Maejima, H., Kinoshita, E., Seyama, I., ve Yamaoka, K., 2003. Distinct sites regulating grayanotoxin binding and unbinding to D4S6 of Nav1.4 sodium channel as revealed by improved estimation of toxin sensitivity. Journal of Biological Chemistry, 278, 11, 9464-9471.
- Mahomoodally, M. F., Sieniawska, E., Sinan, K. I., Picot-Allain, M. C. N., Yerlikaya, S., Baloglu, M. C. ve Zengin, G., 2020. Utilisation of *Rhododendron luteum* Sweet bioactive compounds as valuable source of enzymes inhibitors, antioxidant, and anticancer agents. Food and Chemical Toxicology, 135, 111052.
- Malkoç, M., Laghari, A. Q., Kolaylı, S., ve Can, Z., 2016. Phenolic composition and antioxidant properties of *Rhododendron ponticum*: Traditional nectar source for mad honey. Analytical Chemistry Letters, 6, 3, 224-231.

- Malkoç, M., Yaman, S. Ö., Imamoğlu, Y., İnce, İ., Kural, B. V., Mungan, S., ve Orem, A. 2019. Anti-inflammatory, antioxidant and wound-healing effects of mad honey in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Apicultural Research, 1-11.
- Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., ve Narkiewicz, K. 2007. Arteriyel hipertansiyon tedavisi 2007 kılavuzu. Türk Kardiyol Dern Arş, 35, 1-75.
- Maneesai, P., Prasarttong, P., Bunbupha, S., Kukongviriyapan, U., Kukongviriyapan, V., Tangsucharit, P. ve Pakdeechote, P., 2016. Synergistic antihypertensive effect of *Carthamus tinctorius* L. extract and captopril in L-NAME-induced hypertensive rats via restoration of eNOS and AT1R expression. Nutrients, 8, 3, 122.
- Marletta, M. A., 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Masutani, T., Seyama, I., Narahashi, T., ve Iwasa, J., 1981. Structure-activity relationship for grayanotoxin derivatives in frog skeletal muscle. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 217, 3, 812-819.
- Miranda, K. M., Espey, M. G., ve Wink, D. A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric oxide, 5, 1, 62-71.
- Moncada, S., ve Higgs, E. A., 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. European journal of clinical investigation, 21, 4, 361-374.
- Naziroğlu, M., Dikici, D. M., ve Dursun, Ş., 2012. Role of oxidative stress and Ca²⁺ signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. Neurochemical research, 37, 10, 2065-2075.
- Ohgaki, T., Meguri, H., Ogita, K., ve Yoneda, Y., 1987. Tetrodotoxin-insensitive central depression by grayanotoxin-III in mice. Brain research, 425, 2, 364-368.
- Okuyan, E., Uslu, A., ve Ozan Levent, M., 2010. Cardiac effects of mad honey: a case series. Clinical Toxicology, 48, 6, 528-532.
- Onat, T., Emerk, K., ve Sözmen, E. Y., 2002. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık. Ankara, 711s.
- Ough, C., 1960. Rapid Determination of Proline in Grapes and Wines, Journal of Food Science, 34, 228.
- Oztasan, N., ve Songur, A., 2007. The use of Mad Honey as an antihypertensive agent in rats-a preliminary study. Kocatepe Tıp Dergisi, 8, 1.

- Önal, E., Tümerdem, E., ve Halk Sağlığı Anabilim, İ. T. F. H., 2001. Yaşlılıkta hipertansiyon. Turkish Journal of Geriatrics, 4, 4, 141-145.
- Özhan, H., Akdemir, R., Yazici, M., Gündüz, H., Duran, S., & Uyan, C. 2004. Cardiac emergencies caused by honey ingestion: a single centre experience. Emergency medicine journal, 21, 6, 742-744.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., ve Gan, S. H. 2017. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017.
- Pulcini, P., Allegrini, F., ve Festuccia, N., 2006. Fast SPE extraction and LC-ESI-MS-MS analysis of flavonoids and phenolic acids in honey. Apiacta, 41, 21-27.
- Rodrigo, R., J. Gonzalez, ve F. Paoletto 2011. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. Hypertens Res. 34, 4, 431-40.
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliú, F., ve Hasson, D., 2013. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. Disease markers, 35, 6, 773-790.
- Ruiz-Ruiz, J. C., Moguel-Ordoñez, Y. B., ve Segura-Campos, M. R. 2017. Biological activity of Stevia rebaudiana Bertoni and their relationship to health. Critical reviews in food science and nutrition, 57, 2, 2680-2690.
- Sahin, H., Can, Z., ve Kolayli, S., 2017. Bazı ormangülü ballarının fenolik içerik kompozisyonu. Arıcılık Araştırma Dergisi, 9, 2, 40-46.
- Sahin, H., Yildiz, O., ve Kolayli, S., 2015. Effects of mad honey on some biochemical parameters in rats. Journal of evidence-based complementary ve alternative medicine, 21, 4, 255-259.
- Sakuma, I., 1995. A chronic model of hypertension with increased sympathetic drive in the rat by inhibition of nitric oxide synthase. Biology of Nitric Oxide, 3, 245-248.
- Salman, C., ve Akbaş, M. 2010. Grayanotoksin (Andromedotoxin) İntoksikasyonundan Kaynaklanan Bradikardi, Hipotansiyon ve Hipoglisemi. Türkiye Klinikleri Journal of Anesthesiology Reanimation, 8, 1, 64-68.
- Schild, L., Reinheckel, T., Reiser, M., Horn, T. F., Wolf, G., ve Augustin, W., 2003. Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. The FASEB journal, 17,15, 2194-2201.
- Silici S., Enis, Y. M., Hüseyin, S., Timucin, A. A., ve Duran, O., 2014. Analysis of grayanotoxin in Rhododendron honey and effect on antioxidant parameters in rats. Journal of ethnopharmacology, 156, 155-161.

- Silici, S., Doğan, Z., Sahin, H., Atayoğlu, T., ve Yakan, B., 2015. Acute effects of grayanotoxin in rhododendron honey on kidney functions in rats. Environmental Science and Pollution Research, 23, 4, 3300-3309.
- Silici, S., Sagdic, O., ve Ekici, L., 2010. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. Food Chemistry, 121,1, 238-243.
- Silici, S., Sarioglu, K., Dogan, M., ve Karaman, K., 2014. HPLC-DAD analysis to identify the phenolic profile of rhododendron honeys collected from different regions in Turkey. International journal of food properties, 17,5, 1126-1135.
- Silici, S., ve Atayoglu, A. T. 2015. Mad honey intoxication: A systematic review on the 1199 cases. Food and chemical toxicology, 86, 282-290.
- Silva, C.A., Portaro, F.C., Fernandes, B.L., Ianzer, D.A., Guerreiro, J.R., Gomes, C.L., Camargo, A.C., 2008. Bothrops jararaca'nın güçlü bir prolin açısından zengin anti-hipertansif peptidi olan BPP 10c'nin farelerinde doku dağılımı. Toxicon, 51, 4, 515-523.
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L., 1977. Total Phenol Analyses: Automation and Comparison with Manual Methods, American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55.
- Sorkun, K., 1985. Balda Polen Analizi. Teknik Arıcılık Dergisi, 1, 28-30.
- Stevens P.F., 1978. Rhododendron L. In: Davis PF, editor. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh: Edinburgh University Press, 90-94.
- Şahin, H., 2014. Orman Gülü Balı ve Bitkisindeki Grayanotoksin-III (GTX-III) İzofromunun LC-MS/MS ile Analizi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Tata, C. M., Sewani-Rusike, C. R., Oyedeji, O. O., Gwebu, E. T., Mahlakata, F., ve Nkeh-Chungag, B. N., 2019. Antihypertensive effects of the hydro-ethanol extract of Senecio serratuloides DC in rats. BMC complementary and alternative medicine, 19, 1, 52.
- Terzioğlu, S., Merev, N., ve Anşin R. 2001. A Study on Turkish Rhododendron L.(Ericaceae). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 25, 5, 311-317.
- Tezcan F., Kolayli S., Sahin H., Ulusoy E. ve Erim F.B., 2011. Evaluation of organic acid, carbohydrate composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys, Journal of Food and Nutrition Research, 50, 33-40.
- Tosi E., Ciappini M., Re E. ve Lucero H., 2002. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content, Food Chemistry, 77, 71-74.

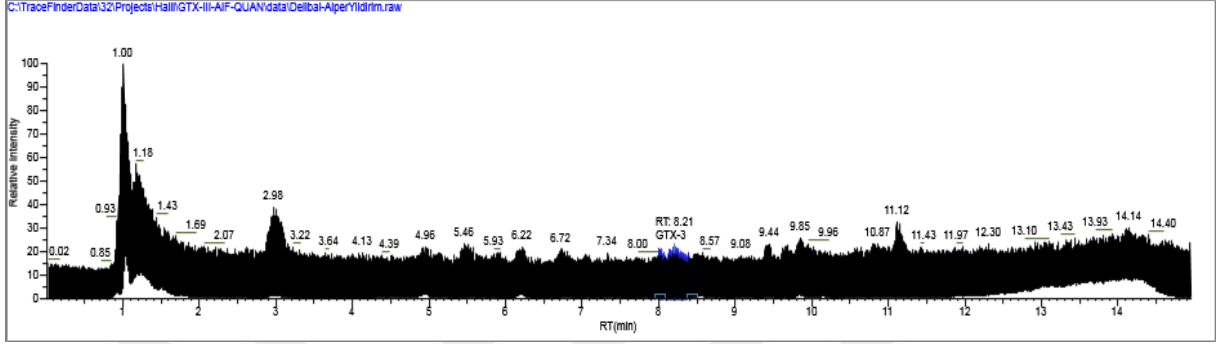
- Touyz, R., M., 2005. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. Antioxidants ve redox signaling 7, 9-10, 1302-1314.
- TTB, İzmir Tabip Odası, Tıpta Temel Bilimler Kolu, Sonbahar Okulu. ENDOTEL, 16-21 Ekim, 1994. Seferhisar, İzmir.
- Ulusoy, E. ve Kolayli, S., 2013. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Anzer Bee Pollen. Journal of Food Biochemistry, 1745-4514.
- URL-1, <https://patents.google.com/patent/CN105503778A/zh?q=cn105503778>
- URL-2, <https://patents.google.com/patent/CA3067067A1/en?q=ca3067067A>
- URL-3, <https://patentimages.storage.googleapis.com/c5/21/0d/666aea37348fcb/WO2018002292A1.pdf>
- URL-4, https://www.youtube.com/watch?v=3Wj_t4v-KP0vet=16s
- URL-5, https://www.who.int/health-topics/hypertension/#tab=tab_1.
- URL-6, https://en.wikipedia.org/wiki/Nitric_oxide_synthase
- URL-7, https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/2917/mod_resource/content/0/6.%20Hifta%20Hipertansiyon%20tedavisinde%20kullan%4%B1lan%20ila%3%A7lar.pdf Hiperetansiyon Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.01 Mayıs 2020.
- URL-8, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm>
- Uzun, H., Narci, H., Tayfur, I., Karabulut, K. U., ve Karcioğlu, O. 2013. Mad honey intoxication: what is wrong with the blood glucose? A study on 46 patients. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 17, 20, 2728-31.
- Uzun, H., Sari, I., Gunes, C., & Kocabay, K. 2013a. A child with bradycardia and hypotension related to mad honey intoxication. Turkish Archives of Pediatrics, 48, 1, 53-54.
- White, J.W., 1979. Composition of Honey. Crane E. (Ed.), Honey: A Comprehensive.
- Wong, J., Youde, E., Dickinson, B. ve Hale, M., 2002. Report on the *Rhododendron* feasibility study. School of Agriculture and Forest Sciences, University of Wales, Bangor.

- Yaylacı, S., Ösken, A., Olt, S., Temiz, T., Tamer, A., ve Gündüz, H., 2011. Mad honey poisoning accompanied by hypotension and bradycardia. Sakarya Medical Journal, 1, 2, 73-5.
- Yildiz, O., ve Alpaslan, M. 2012. Properties of rose hip marmalades. Food Technology and Biotechnology, 50, 1, 98-106.
- Young, I.S. ve Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in Health and Disease, Journal of Clinical Pathology, 54, 3, 176-186.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. ve Quian, M., 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts, Journal Of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1619-1624.
- Zatz, R., ve Baylis, C. (1998). Chronic nitric oxide inhibition model six years on. Hypertension, 32, 6, 958-964.

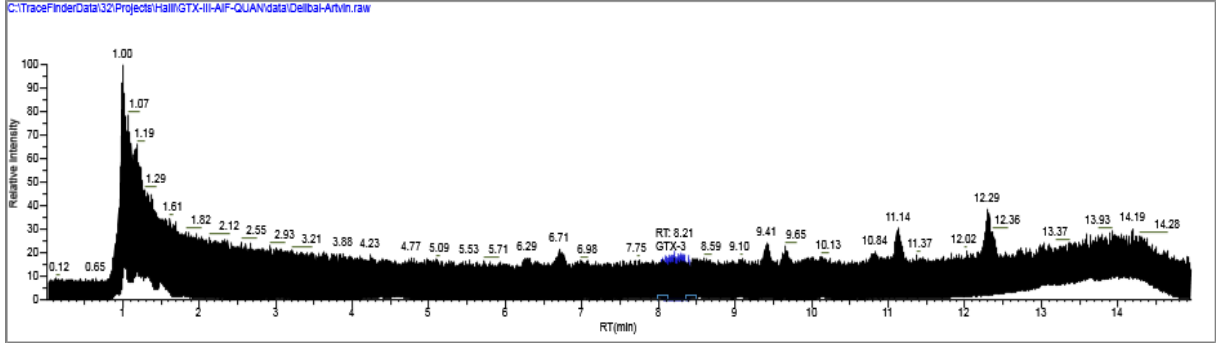
8. EKLER

Ek 1. Bal Örneklerinden Bazılarının GTX-III Kromatogramları

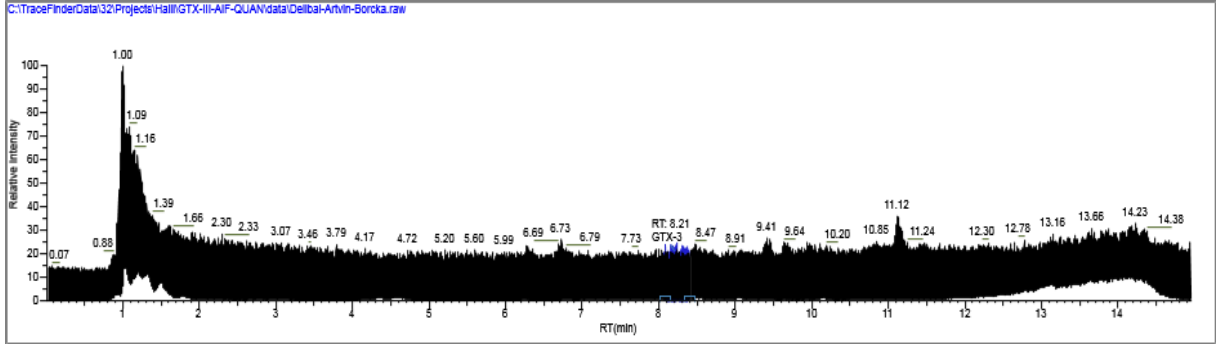
Ek Şekil 1. MH 1 - Artvin



Ek Şekil 2. MH 2 - Artvin Hopa

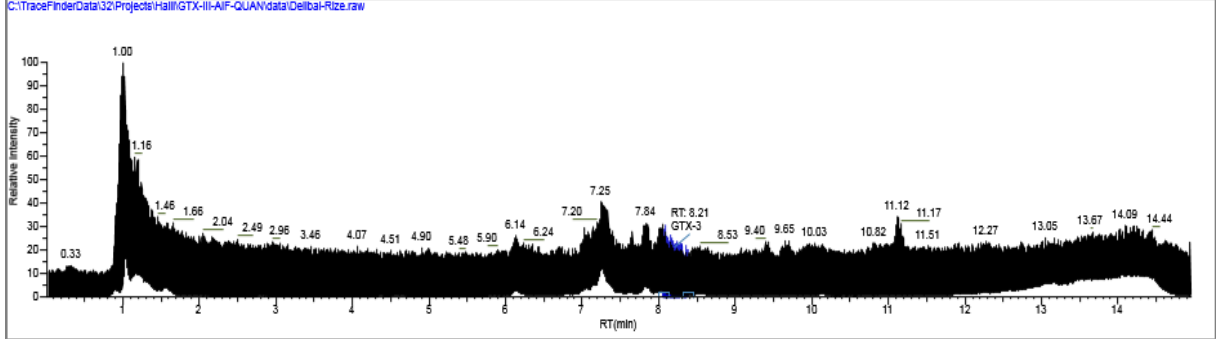


Ek Şekil 3. MH 3 - Artvin Borçka

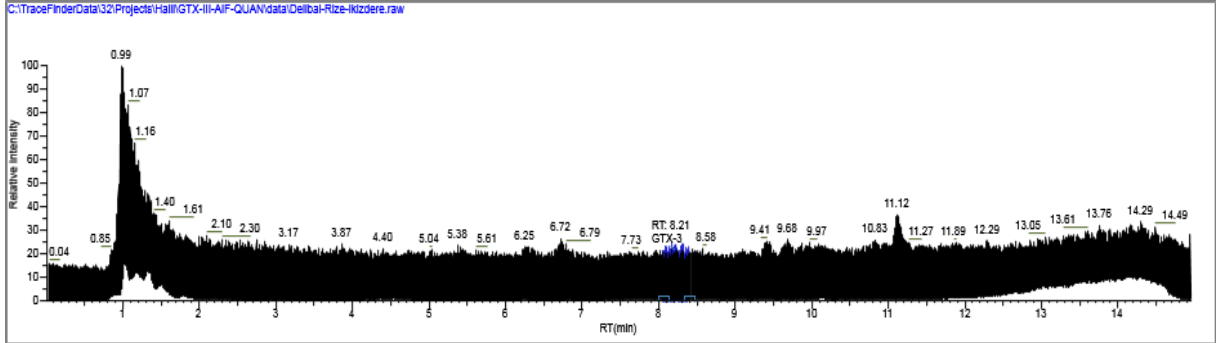


Ek 1'in devamı

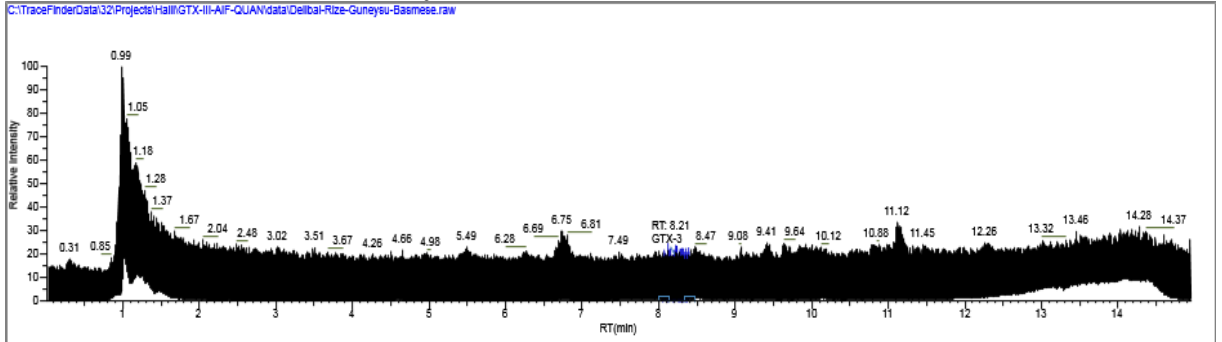
Ek Şekil 4. MH 4 - Rize



Ek Şekil 5. MH 5 – Rize, İkizdere

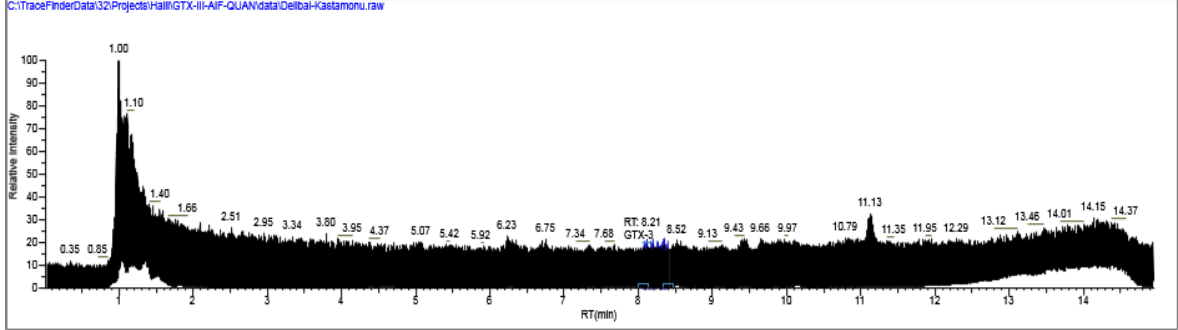


Ek Şekil 6. MH 6 – Rize, Güneysu

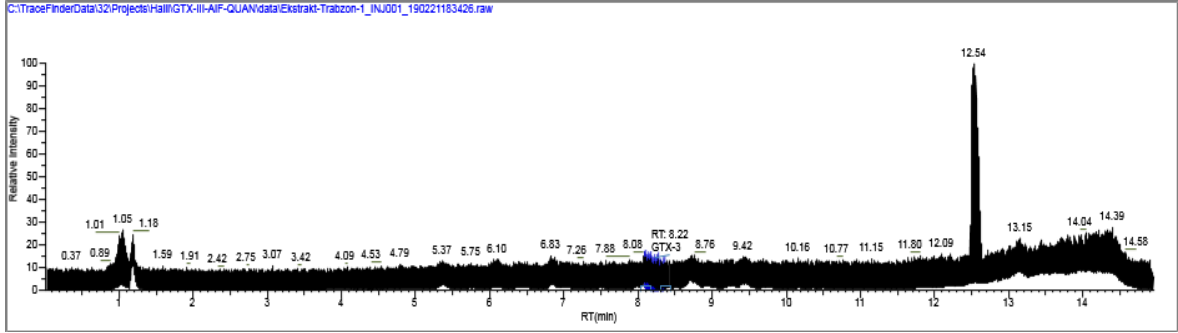


Ek 1'in devamı

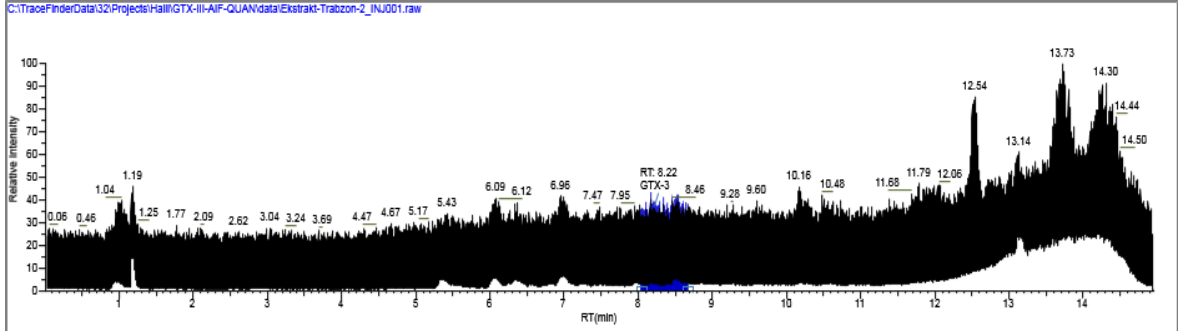
Ek Şekil 7. MH 9 - Kastamonu

Ek 2. *Rhododendron* Çiçeklerinin Bazılarının GTX-III Kromatogramları

Ek Şekil 8. Trabzon, Akçaabat, Mor Çiçek

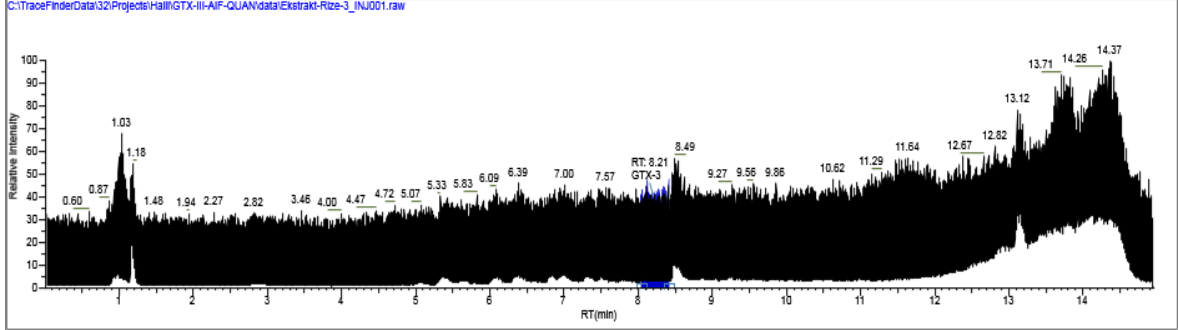


Ek Şekil 9. Trabzon, Köprübaşı, Sarı Çiçek

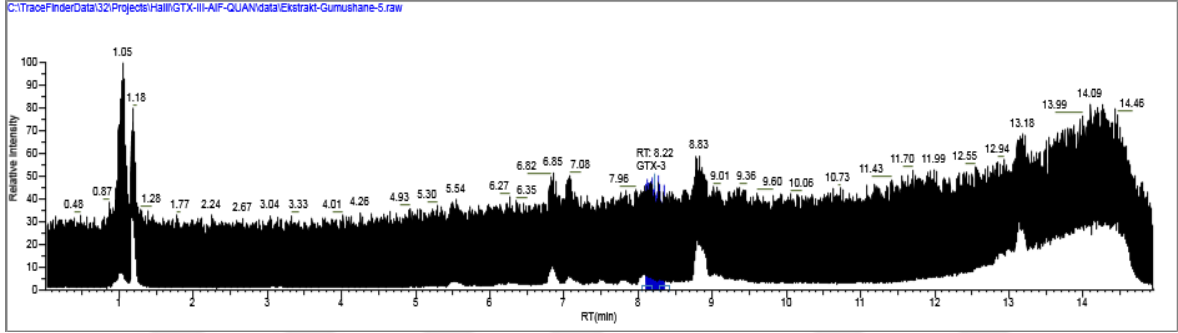


Ek 2'in devamı

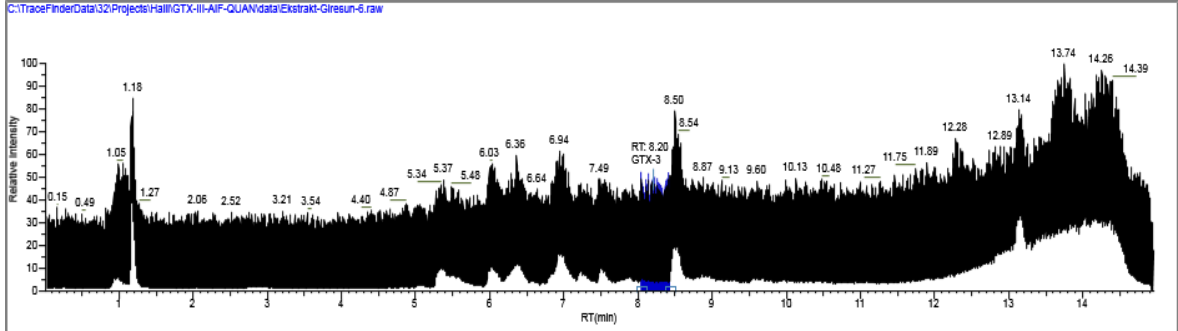
Ek Şekil 10. Rize, Çamlıhemşin, Sarı Çiçek



Ek Şekil 11. Gümüşhane, Kürtün, Beyaz Çiçek

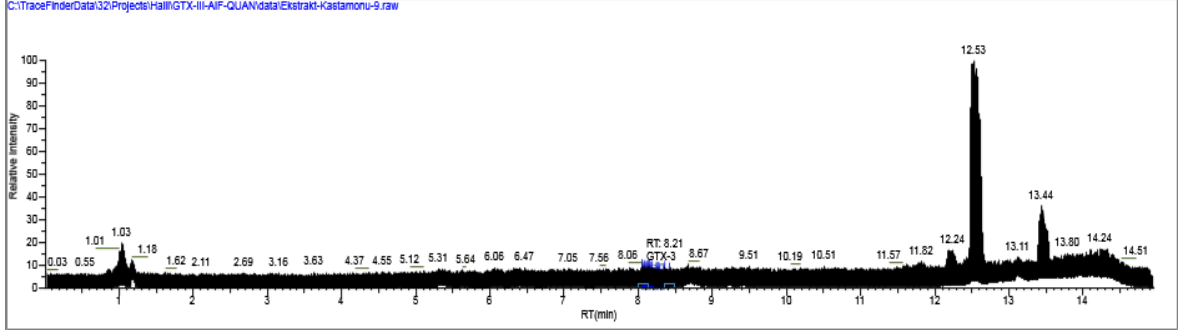


Ek Şekil 12. Giresun, Dereli, Sarı Çiçek

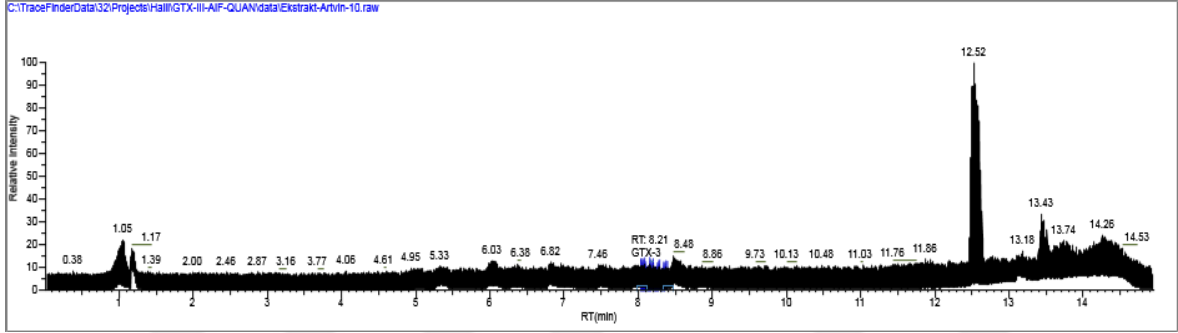


Ek 2'in devamı

Ek Şekil 13. Kastamonu, İnebolu, Mor Çiçek



Ek Şekil 14. Artvin, Borçka, Sarı Çiçek



ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu Akçaabat Mevlüt Selami YARDIM ilköğretim okulu, ortaokulu Trabzon Prof. Dr. İhsan KOZ ilköğretim okulu, liseyi Trabzon Fatih Lisesinde (2007) tamamladı. 2008'de Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya bölümünü kazandı. 2012'de kimyager ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya bölümünde tezli yüksek lisansa başladı. 2015 yılında Rize Recep Tayyip ERDOĞAN Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya bölümünden "Anzer Bal ve Poleninin Bazı Biyoaktif Özelliklerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi" başlıklı tezi ile yüksek lisansını tamamladı. 2015 Temmuz ayında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya bölümünde doktora programına kabul edildi. 2016 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi'ndeki yüksek lisans programını "Muğla İli Florasına Ait Püren Balının Karakterizasyonu" adlı tez çalışmasıyla tamamladı.

Ulusal ve uluslararası hakemli dergilerde toplam 10 bilimsel makale, 22 kongre bildirisinde ve "Antioksidanlar ve Tayin Yöntemleri" kitabının bir bölümünde ismine yer verilmiştir. Yabancı dili İngilizce'dir. Evli ve iki çocuk annesidir.